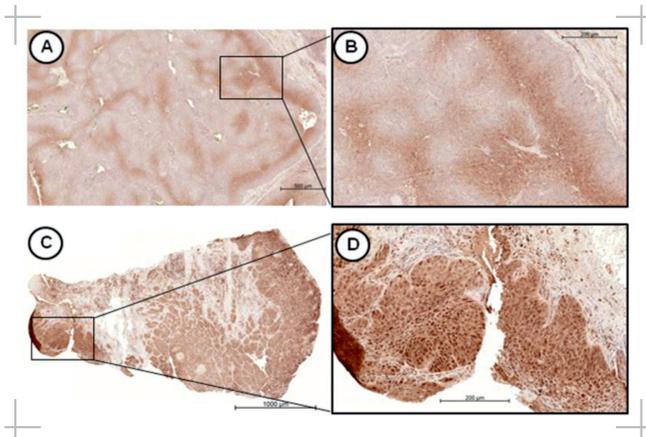


Einfluss der HPV-assoziierten Karzinogenese auf den Glukosemetabolismus am Beispiel der Expression von LDHA bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen und deren prognostische Bedeutung als histologischer Marker



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss der HPV-assoziierten Karzinogenese auf den
Glukosemetabolismus am Beispiel der Expression von LDHA bei
oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen und deren prognostische
Bedeutung als histologischer Marker**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sonja Südwasser, geb. Große-Grollmann
aus Aßlar

Gießen 2019

Aus dem medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Bernd Wöstmann

Tag der Disputation: 10. Dezember 2019

Für meinen Ehemann

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	IV
2. Einleitung	1
2.1 Humane Papillomaviren	1
2.1.1 Grundlagen.....	1
2.1.2 Molekulargenetischer Aufbau.....	3
2.1.3 Besondere Bedeutung der viralen Onkoproteine E6 und E7	4
2.2 Oropharynxkarzinome	8
2.2.1 Spezielle Anatomie	8
2.2.2 Ätiologie und Epidemiologie.....	9
2.2.3 Klassifikation des Oropharynxkarzinoms	10
2.2.4 Risikofaktoren	12
2.2.5 HPV-assoziierte und HPV-negative Tumore	13
2.2.6 Therapie und Prognose von HNSCC	15
2.3 Laktatdehydrogenase A	17
2.4 Hypoxie.....	20
2.4.1 Hypoxie und der physiologische Glukosemetabolismus.....	21
2.4.2 Hypoxie und der onkogene Glukosemetabolismus	22
3. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	24
4. Material und Methoden	25
4.1 Datenmaterial	25
4.2 HPV-Nachweis.....	26
4.3 Patientenkollektiv	27
4.4 Biometrische Merkmale.....	29
4.5 Tumordiagnosen	29
4.6 Therapie und Überleben	31
4.7 Immunhistochemie	32
4.7.1 Gewebeschnitte	32
4.7.2 Immunhistochemische Untersuchung.....	33

4.8	Statistische Methoden	36
5.	Ergebnisse	38
5.1	Überlebensanalyse des Patientenkollektivs	38
5.2	LDHA-Färbemuster	42
5.3	LDHA-Intensität	46
5.4	LDHA-positive Tumorfläche	50
5.5	LDHA-Score aus gefärbter Fläche und Intensität	53
6.	Diskussion	57
6.1	Diskussion der Ergebnisse	58
6.1.1	Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs	59
6.1.2	LDHA-Färbemuster	60
6.1.3	LDHA-Intensität	62
6.1.4	LDHA-positive Tumorfläche	65
6.1.5	gebildeter LDHA-Score aus gefärbter Fläche und Intensität	68
6.2	Therapeutische Bedeutung	69
7.	Zusammenfassung	71
8.	Summary	73
9.	Abkürzungsverzeichnis	75
10.	Abbildungsverzeichnis	77
11.	Tabellenverzeichnis	78
12.	Literaturverzeichnis	79
14.	Erklärung zur Dissertation	97
15.	Danksagung	98
16.	Lebenslauf	100

2. Einleitung

2.1 Humane Papillomaviren

2.1.1 Grundlagen

Humane Papillomviren (HPV) gehören der Familie der Papillomaviridae an (Phelps und Alexander 1995). Es handeln sich dabei um kleine (52-55 nm) gewebsspezifische DNA-Viren, welche in mittlerweile weit über 100 Typen unterteilt werden und die Epithelzellen von Haut und Schleimhaut infizieren (zur Hausen, H. 1989; Klussmann et al. 2004). Sie sind verantwortlich für eine Reihe von benignen Erkrankungen, so zum Beispiel für Haut – oder Genitalwarzen. Allerdings sind sie auch an der Entstehung maligner Krebserkrankungen beteiligt (vor allem das Zervixkarzinom und dessen Vorstufen).

Die Viren sind unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren (dsDNA), das Genom selbst besteht aus circa 8000 Basenpaaren. Die Genprodukte dieser Viren, vor allem die des E6- und E7-Gens, verhindern die Apoptose und behindern eine Reparatur des DNA-Doppelstranges (Beutner und Tyring 1997; Klussmann et al. 2004). Die Viren bringen ihr Genom als Episome in proliferierenden Basalzellen ein und rufen hier eine lokale Zellproliferation hervor. Die infizierte Zelle teilt sich und gibt dadurch die Virus-DNA an ihre Tochterzellen weiter (Bedell et al. 1991).

Im Gegensatz zu anderen Viren, die aufgrund ihrer Antigenstruktur in „Serotypen“ eingeteilt werden, typisiert man die Papillomaviren nach ihrer DNA-Homologie in „Genotypen“. Die verschiedenen Typen des Virus lassen sich in die Gruppen A-E einteilen. Da sowohl verhornte Epithelien als auch Schleimhäute (nicht verhornte Epithelien) betroffen sind, erfolgt zudem eine Unterteilung des Virus in kutanotrop (infizieren die äußere Haut) und mukosotrop (betroffen sind hierbei die Schleimhäute). Die Viren werden unterschieden in solche mit hoher onkogener Potenz (sogenannte high-risk-Typen) und in solche mit geringer transformierender Wirkung (niedriges malignes Potential, sogenannte low-risk-Typen). High-risk-Viren stehen in Zusammenhang mit der Entstehung von Malignomen, wo hingegen Viren aus der low-risk-Gruppe an der Ausbildung von benignen Warzen und Papillomen beteiligt sind. Zu den high-risk-Viren zählen unter anderem die Genotypen 16 und 18. Die wichtigen Genotypen 6 und 11 sind Teil der low-risk-Gruppe.

Der Eintritt des Virus in den Organismus erfolgt über Verletzungen der obersten Epithelschichten. Das Virus etabliert sich schließlich in der tiefer gelegenen Basalzellschicht. Nach Teilung der Basalzellen wandert eine Tochterzelle im Anschluss in die äußere Schicht des Epithels, während die andere in der Basalschicht verbleibt und durch weitere Zellteilungen ihrerseits infizierte Epithelzellen hervorbringen kann (Doorbar, J. 2006).

Im Allgemeinen handelt es sich bei Keratinozyten der äußeren Hautschicht um ausdifferenzierte Zellen. Das heißt sie befinden sich in der G₀-Phase und es erfolgt keine weitere Zellteilung. G₀-Zellen sind biochemisch aktiv, teilen sich aber nicht bis sie stimuliert werden und in den Zellzyklus zurückkehren. Die Expression der frühen E6 und E7 Virus-Onkogene führt in der infizierten Zelle unter anderem zu einem Übertritt der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus und die Zelle behält somit ihre proliferative Aktivität bei; der Eintritt in die G₀-Phase bleibt damit aus (zur Hausen, H. 2002). Während des Zellzyklus gibt es zwei wichtige Kontrollpunkte (siehe Abbildung 1): einen in der G₁-Phase (Restriktionspunkt), der durch das pRb-Protein reguliert wird und einen in der G₂-Phase, der durch das p53-Protein reguliert wird.

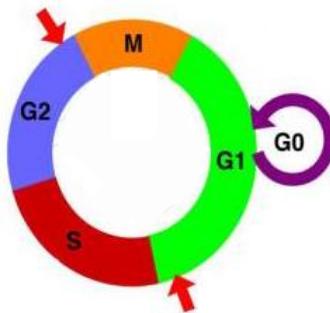


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus, die roten Pfeile stellen die Kontrollpunkte während des Zellzyklus dar.

2.1.2 Molekulargenetischer Aufbau

Das HPV-Kapsid besteht aus 72 pentamerisch geformten Kapsomeren. Es hat einen Durchmesser von 52-55 nm und gibt dem Virus eine kugelige Gestalt in Form eines Icosaeders (Beutner und Tying 1997).

Der Aufbau des doppelsträngige DNA-Moleküls gliedert sich wie folgt: Die Long Control Region (lange Kontrollregion, kurz LCR) dient der Regulation der HPV-Genexpression und enthält Kontrollelemente wie frühe Promotoren und Enhancer. Die Gene für die früh im Vermehrungszyklus gebildeten Proteine schließen sich im Uhrzeigersinn an die LCR an. Diese Region von früh im HPV-Replikationszyklus exprimierten Gene („early region“) beinhaltet circa 4500 Basenpaare und ist unter anderem für die Kontrolle der Replikation und die Transformation verantwortlich. Hier werden die Virusproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 kodiert. Die L-Region („late region“) enthält die Leserahmen L1 und L2 von den spät im HPV-Replikationszyklus exprimierten Proteinen. Sie kodieren für die Strukturproteine des Kapsids, die in den äußeren Zellschichten exprimiert werden. Zwischen dem 3'-Ende der L-Region und dem 5'-Ende der E-Region befindet sich eine nicht kodierende Region (NCR = noncoding region) oder auch „upstream regulatory region“ (URR) genannt. Sie enthält regulierende Elemente, die für die Replikation der viralen DNA notwendig sind (Phelps und Alexander 1995; Beutner und Tying 1997; Mürger et al. 2004) (siehe Abbildung 2).

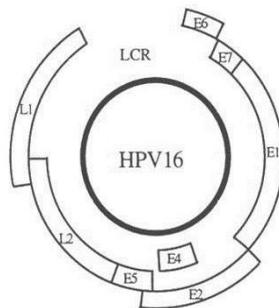


Abbildung 2: Aufbau eines HPV-Genoms mit seinen Abschnitten

Die Onkogene L1 und L2 kodieren für zwei verschiedene Strukturproteine aus denen das Viruskapsid aufgebaut wird. Mindestens 80% des Kapsids bestehen aus den Hauptkapsidproteinen L1, wobei L1 außen und L2 innen lokalisiert ist. Studien haben gezeigt, dass auch die Expression von L1 alleine ausreichend ist um ein Viruskapsid herzustellen. L2 scheint dabei nur den Vorgang zu beschleunigen (Hagensee et al. 1994; Zhou et al. 1994).

Das Protein E1 ist ein DNA-bindendes Phosphoprotein und interagiert mit dem Virusprotein E2. Gemeinsam sind sie an der viralen DNA-Replikation beteiligt (Blitz und Laimins 1991). Das E2-Gen kodiert für drei spezifische DNA-bindende Proteine. Sie sind in der Transkriptionsregulation des viralen Genoms involviert. Der Einbau der Virus-DNA in die Wirtszelle erfordert eine sogenannte „Linearisierung“, welche über eine Bruchstelle von E2 auftritt. Es kommt es zu einer Überexpression der Virusproteine E6 und E7, da E2 die Aktivität von E6 und E7 kontrolliert und eine Bruchstelle von E2 zu einer verstärkten Expression dieser Virusproteine führt (Lambert, P.F. 1991; Chiang et al. 1992; Wittekindt et al. 2018).

Die Onkoproteine E6 und E7 werden in unterschiedlich starken Konzentrationen in Tumoren gefunden und sind an der Tumorentstehung entscheidend involviert. E6 ist dabei unter anderem an der Apoptosehemmung beteiligt. Das Virusprotein E7 interagiert mit dem Retinoblastomprotein (pRb) und in der Folge führt dies zur Induktion der Synthesephase (kurz: S-Phase) (Scheffner et al. 1990; Phelps et al. 1992). Im folgenden Abschnitt wird die Funktion der beiden wichtigen Onkoproteine E6 und E7 genauer erläutert.

2.1.3 Besondere Bedeutung der viralen Onkoproteine E6 und E7

Durch ihre Wechselwirkung mit Proteinen die den Zellzyklus beeinflussen können, steht den Onkoproteine E6 und E7 bei der HPV-induzierten Onkogenese eine besondere Bedeutung zu. Der Tumorsuppressor p53 und das Retinoblastom-Protein (pRB) stellen dabei die hauptsächlichen Interaktionspartner dar (Scheffner et al. 1990; Boyer et al. 1996).

Das zelluläre Retinoblastomprotein (pRB) und das Protein p16 sind wichtige Tumorsuppressoren (Boyer et al. 1996). pRB wird von cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK=cyclin-dependent kinases) phosphoryliert und ist in diesem Zustand aktiviert. Bei gesunden Zellen wird am G1-Kontrollpunkt über CDKs pRB phosphoryliert und dadurch die Bindung von pRB zu E2F gelöst. Freies E2F aktiviert die Transkription einer Reihe von Genen, unter anderem von Cyclin E (Ohtani et al. 1995; Geng et al. 1996), welches nötig ist für den Eintritt in die S-Phase (Ohtsubo et al. 1995).

Als Reaktion auf zelluläre Stresssignale wird bei gesunden Zellen p16 produziert und verhindert den Eintritt der Zelle in die S-Phase. In der Folge der Aktivierung von p16 bleibt die Verbindung von pRB mit dem Transkriptionsfaktor E2F bestehen und dadurch wird der Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert.

Weiterhin liegt bei gesunden Zellen der Tumorsuppressor p53 als Genregulator nur in geringen Konzentrationen vor. Bei Zellschäden wird p53 vermehrt exprimiert und aktiviert in der Folge das Protein p21, welches wiederum den CDK-Komplex blockiert der dafür sorgt, dass pRB phosphoryliert werden kann und E2F frei wird. Die Zelle wird wiederum vor dem Übergang in die Synthesephase gestoppt (Dyson et al. 1989; Boyer et al. 1996; Bracken et al. 2004). Hauptregulator ist hierbei die Ubiquitin-Ligase Mdm2, welche p53 polyubiquitiniert und dadurch zum proteosomalen Abbau markiert (Yang et al. 2004). Durch eine Störung des Zellzyklus werden Proteinkinasen aktiviert, die p53 phosphorylieren und dadurch seine physiologische Affinität zu Mdm2 herabsetzen. Folglich kommt es zu einer Konzentrationssteigerung von p53. Dies führt dazu, dass durch Aktivierung zahlreicher Gene entweder die Zelle in Apoptose verfällt oder über einen Zellzyklusarrest an weiteren Zellteilungen gehindert wird (Kuerbitz et al. 1992; Brugarolas et al. 1995; Meek, D.W. 2009).

Die Wirkung der Onkoproteine E6 und E7 verändert den physiologischen Zellzyklus, was schließlich zur Entwicklung einer Neoplasie führt. Galloway und McDougall erklärten 1996 diese Beobachtungen an Hand der folgenden zwei Punkte:

1. Im Allgemeinen handelt es sich bei Suprabasalzellen eines Epithels um ausdifferenzierte Zellen. Dies bedeutet, dass keine weitere Zellteilung erfolgen kann; die Zellen befinden sich in der sogenannten G0-Phase und die Zellen werden daran gehindert wieder in die S-Phase einzutreten. E7 durchbricht nun dieses Signal. Dadurch ist der Kontrollpunkt blockiert, welcher eine Zelle daran hindert ohne vorangegangene Mitose wieder in die S-Phase einzutreten. In der

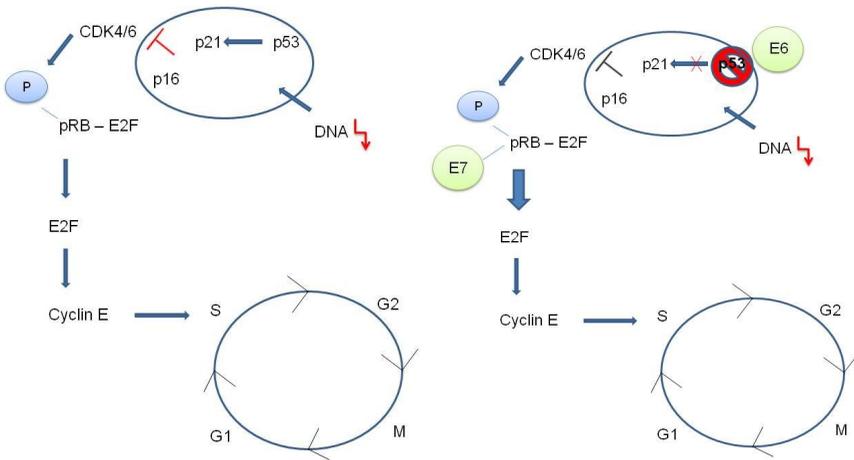
Folge entsteht ein Epithel, welches in all seinen Zellschichten Proliferation und Mitosen zeigt. Dies stellt einen Risikofaktor für die Entstehung von Neoplasien dar.

2. Zellen mit einer DNA-Schädigung verbleiben normalerweise in der G1 oder in der G2-Phase. E6 und E7 können dabei die G1- und G2-Kontrollpunkte umgehen und dadurch trotz geschädigter DNA einer Zelle zur Fortführung des Zellzyklus führen.

Die Invasivität eines Karzinoms erfordert die Durchbrechung der Basalmembran. E6 und E7 alleine sind dazu nicht in der Lage. Es werden zusätzliche genetische Veränderungen benötigt (Dürst et al. 1989). Deutlich wird dies dadurch, dass typischerweise Jahre oder sogar Jahrzehnte dazu notwendig sind um eine HPV-Infektion maligne entarten zu lassen (Beutner und Tyring 1997).

Bei HPV-infizierten Zellen werden durch die Funktion des E6 Proteins die Zellproliferation, sowie die Inhibierung der Apoptose begünstigt. E6 bindet an die zelluläre Protein-Ligase E6-AP und fördert dadurch den Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 durch eine Ubiquitin-abhängige Proteolyse, wodurch die Apoptose verhindert wird (Scheffner et al. 1990; Thomas et al. 1999). Das Virusprotein E7 ist in der Lage an das hypophosphorylierte pRB zu binden, sowie seinen Abbau zu induzieren. Dadurch wird vermehrt E2F frei und aktiviert die Zellproliferation.

Der CDK-Inhibitor p16 steht indirekt ebenfalls im Zusammenhang mit dem Onkoprotein E7. p16 wird in pRB-inaktiven Zellen (geschehen durch die Wirkung von E7) vermehrt synthetisiert und stellt dadurch einen möglichen Nachweis einer HPV-assoziierten Onkogenese dar (Wittekindt et al. 2005). Eine p16-Überexpression erfolgt dabei zwar bei vielen, aber nicht bei allen HPV-induzierten Karzinomen. Die PCR (HPV-Typisierung) dient daher weiterhin als Goldstandard für den Nachweis einer HPV-Infektion.



A

B

Abbildung 3: Die Wirkung von E6 und E7 und ihre Beeinflussung auf den Zellzyklus

A: DNA-Schäden führen bei gesunden Zellen zu einer erhöhten Expression des Tumorsuppressors p53 und zu einer Aktivierung unter anderem von p21 und p16. p16 inhibiert jene CDKs, welche die Phosphorylierung von pRB induzieren und so den Übergang in die S-Phase verhindern.

B: Hier interagiert das Virusprotein E6 und sorgt für den Abbau von p53 und inaktiviert dieses dadurch, sodass die Phosphorylierung von pRB über CDK4/6 ungehindert stattfinden kann. E7 bindet an pRB, dadurch wird E2F frei und so zu einem Übergang in die S-Phase führt.

HPV-negative Karzinome zeigen selten eine Expression des Proteins p16. Vermutet wird dies durch Noxen-induzierte Karzinogenese (Karsai et al. 2007). Dabei finden sich Mutationen in den Genen der Proteine p53, pRb und p16. Dies führt in der Folge zu einer vermehrten Expression von p53 und einer reduzierten Nachweisbarkeit von pRb und p16. Diese Mutationen sind bei einer HPV-assoziierten Kanzerogenese nicht zu finden.

2.2 Oropharynxkarzinome

2.2.1 Spezielle Anatomie

Die Kopf-Hals-Region besteht aus dem Kehlkopf (Larynx), der Luftröhre (Trachea), der Speiseröhre (Ösophagus), der Schilddrüse (Glandula thyroidea), einem Skelettsystem und Muskulatur. Er ist in fünf Lokalisationen untergliedert: Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx.

Der Pharynx ist ein fibro-muskulöser Schlauch und reicht von der Schädelbasis bis zum Ringknorpel (Teil des Kehlkopfskeletts) und besteht aus drei Abschnitten:

- 1) Epipharynx (Nasopharynx)
- 2) Mesopharynx (Oropharynx)
- 3) Hypopharynx (Laryngopharynx)

Das Gaumensegel stellt die Begrenzung von Naso- zu Oropharynx dar. Die Grenze des Oropharynx zur Mundhöhle beschreibt der vordere Gaumenbogen (Arcus palatoglossus). Der Oropharynx reicht kranial von einer auf Höhe des Velum palatinum gedachten horizontalen Linie bis an den oberen Epiglottisrand (kaudal).

Die Region des Oropharynx wird in vier Unterbezirke unterteilt:

- 1) Vorderwand mit Zungengrund und Vallecula epiglottica
- 2) Seitenwand mit Tonsillen, Fossa tonsillaris, Gaumenbögen und Glossotonsillarfurche
- 3) Hinterwand
- 4) Obere Wand mit oraler Fläche des weichen Gaumens und Uvula.

Die Wand des Oropharynx besteht aus fibro-muskulärem Gewebe und ist nach innen bedeckt von Schleimhaut. Die Schleimhaut besteht aus einem unverhornten, mehrschichtigen Plattenepithel mit rascher Regenerationsfähigkeit. In dieser ist zusätzlich zwischen vorderem und hinterem Gaumenbogen (Arcus palatinus anterior und – posterior) die paarige Gaumenmandel (Tonsilla palatina) eingelassen. Die lamina propria der Gaumenmandeln zeigt eine deutliche Ansammlung von lymphoretikulärem Gewebe. Dieses bildet zusammen mit den Tonsillen den sogenannten Waldeyer-Rachenring.

Der Hypopharynx (hypo-, *griechisch* für „unter“) stellt den unteren Teil des Rachens dar und reicht an seinem unterem Abschnitt an den Larynx heran und geht in Höhe des 6. Halswirbels in die Speiseröhre über. Unter den Rachentumoren haben Patienten mit Hypopharynxkarzinomen die schlechteste Prognose, da sie meist erst in weit fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert werden und zudem durch eine frühe Metastasierung aufgrund des ausgedehnten lymphatischen Gewebes in diesem Teil des Rachens charakterisiert sind.

Der Larynx stellt die Verbindung vom Pharynx zur Luftröhre (Trachea) dar. Er umfasst die Stimmbänder und -lippen, sowie die Teile oberhalb (supra-) und unterhalb der Stimmbänder (subglottisch). Der Kehldeckel (Epiglottis) ist eine mit Schleimhaut überzogene Knorpelplatte und liegt dorsal des Zungengrunds über dem Eingang des Larynx (Witt, M. 2006; Samandari und Mai 2008; Liebertz et al. 2010; WHO, World Health Organization).

2.2.2 Ätiologie und Epidemiologie

Kopf-Hals-Tumore gehören zu den sechsthäufigsten Tumorentitäten weltweit (Bray et al. 2018). Weltweit werden jedes Jahr circa 640.000 neue Fälle von Kopf-Hals-Karzinomen diagnostiziert, zwei Drittel davon in Entwicklungsländern. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Malignome die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. 38,5% der Männer und 48% der Frauen sterben an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung, 29% der Männer und 23% der Frauen an einer Krebserkrankung. Männer sind dabei häufiger und, bei einem mittleren Erkrankungsalter von 61 Jahren, auch früher betroffen als Frauen (65 Jahre). Prognostisch relativ günstige 5-Jahres-Überlebensraten weisen dabei Erkrankungen von Lippe und Speicheldrüsen auf, vergleichsweise ungünstige Prognosen durch ihre relativ späte Entdeckung sind mit Malignomen des Rachens verbunden (Robert-Koch-Institut, 2013).

Nach Ihrer Lokalisation werden die Kopf-Hals-Tumore unterteilt in Mundhöhlenkarzinome, Naso-, Oro-, Hypopharynxkarzinome, Larynxkarzinome, Karzinome der Speicheldrüsen und der Nasennebenhöhlen. Die größten Untergruppen der Kopf-Hals-Karzinome bilden die Mundhöhlentumore (Rund 40% aller Kopf-Hals-

Karzinome) und die Oropharynxkarzinome (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OSCC). Histologisch handelt es sich bei den Kopf-Hals-Tumoren bei ca. 90% um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) (Robert-Koch-Institut, 2013).

2.2.3 Klassifikation des Oropharynxkarzinoms

Die Klassifikation der Karzinome des Oropharynx erfolgt jeweils nach der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aktuellsten Version des international anerkannten System der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Greene und Sobin 2002). Die Einteilung erfolgt dabei für jede Lokalisation gesondert. Berücksichtigt werden bei diesem System die Ausdehnung und die Größe des Primärtumors (aufsteigend von T1 bis T4), das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (zunehmend von N0 bis N3) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M0 oder M1) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von OSCC nach UICC (7. Auflage 2010)

T	Definition
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
Tis	Carcinoma in situ
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm , aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Fläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen oder Unterkiefer

T4b Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die Arteria carotis interna

N	Definition
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, mindestens 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten mit mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

Definition	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastase(n) vorhanden, kann ergänzt werden durch die Bezeichnung des Organs (zum Beispiel <i>pul</i> für Lunge)

Dabei werden alle Aspekte in eine international anerkannte Tumorformel übernommen, welche eine prognostische Einteilung in sieben Schweregrade ermöglicht (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung bei HNSCC (2010) (T=Größe und Ausdehnung des Primärtumors, N=Lymphknotenbefall (Nodes), M=Fernmetastasen ja (M1) oder nein (M0))

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV a	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
IV b	Jedes T	N3	M0
IV c	Jedes T	Jedes N	M1

Zudem erfolgt eine histopathologische Einteilung nach dem Differenzierungsgrad (Grading). Diese gibt Auskunft über den Malignitätsgrad eines Tumors. G1 bedeutet dabei eine gute Differenzierung des Tumors, das heißt das Gewebe ist histologisch und zytologisch dem normalen Plattenepithel des Oropharynx sehr ähnlich. G2 zeigt eine mäßige oder mittelgradige Differenzierung. G3 bedeutet ein schlecht oder wenig differenziertes Karzinom, welches nur leichte Ähnlichkeit mit dem normalen Epithel zeigt, dafür reichlich Mitosen und auch atypische, deutliche Zell- und Kernpolymorphien aufweist. G4 schließlich kennzeichnet ein un- oder entdifferenziertes Karzinom (UICC 7. Auflage 2010).

2.2.4 Risikofaktoren

Laut IARC (*International Agency for Research on Cancer*) gilt Tabakrauch als Karzinogen der Klasse 1, welches „sicher krebserzeugend bei Menschen“ bedeutet. Er

enthält mehr als 50 bekannte Karzinogene (IARC 1978, 2002). Als weiterer Hauptrisikofaktor ist der chronische Alkoholkonsum zu nennen (Lewin et al. 1998). Treten beide Faktoren gemeinsam auf verhält sich der Effekt multiplikativ (Olsen et al. 1985). Laut Nibu und Inoue aus dem Jahre 1998 bewirkte der Alkoholkonsum durch eine verminderte Speichelproduktion einen direkten Zellschaden und erleichtert als Lösungsmittel zusätzlich die Diffusion von im Tabakrauch enthaltenen Karzinogenen in die Schleimhaut (so zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine). Des Weiteren wird Alkohol zu Acetaldehyd metabolisiert, welches wiederum die Reparaturmechanismen in den Zellen stört (Morse et al. 2010).

Auch virale Infektionen sind bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen beteiligt. So stellt beispielsweise das Epstein-Barr-Virus bei der Entwicklung eines Malignoms im Nasopharynx einen wichtigen Faktor dar. Eine Infektion mit HPV wird mit oropharyngealen Neoplasien in Verbindung gebracht (de Souza et al., 2012). HPV können das gesamte Epithel des oberen Aerodigestivtraktes infizieren, doch findet man sie besonders häufig in Tumoren des Oropharynx und dabei vor allem in den Gaumentonsillen (Kluschmann et al. 2001).

Des Weiteren gelten unzureichende Mundhygiene und langandauernde mechanische Irritationen, zum Beispiel durch schlecht sitzende Zahnprothesen, als mögliche Risikofaktoren. Eine übermäßige UV-Exposition spielt bei der Entstehung von Karzinomen an den Lippen eine Rolle. Menschen mit Diabetes Typ 2, ausgeprägter Immunschwäche sowie einigen seltenen Vorerkrankungen weisen ebenfalls ein gesteigertes Risiko auf. Es gibt zudem deutliche Hinweise, dass auch eine genetische Veranlagung bei der Karzinomentstehung im Kopf-Hals-Bereich eine Rolle spielt (RKI, 2013).

2.2.5 HPV-assoziierte und HPV-negative Tumore

Einige der über 100 Typen des Humanen Papillomvirus, so genannte ‚high-risk‘ Typen, können Plattenepithelkarzinome induzieren (zur Hausen, H. 2002). Die HPV-DNA des häufigsten ‚high-risk‘ Typen, HPV16, wird auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, vor allem in der Region des Oropharynx, gefunden (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000). Bis zu der Hälfte der Tumoren des Oropharynx sind durch eine

Infektion mit onkogenen HPV-Viren verursacht. In zahlreichen Untersuchungen konnte unter anderem der Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und der besseren Prognose von Patienten gegenüber HPV-negativen Karzinomen des Oropharynx gezeigt werden (Klussmann et al. 2004; Wittekindt et al. 2005). Eine kausale Beteiligung von HPV16 am Tumorgeschehen gilt jedoch nur für einige dieser Tumoren mit aktiver Expression der Onkogene E6 und E7 (Wiest et al. 2002; Jung et al. 2010).

Die HPV-induzierten und die HPV-negativen Kopf-Hals-Karzinome, insbesondere derer im Oropharynx, zeigen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf (siehe Tabelle 3). Patienten mit HPV-positiven OSCC sind meist jünger (Capone et al. 2000) und häufiger weiblichen Geschlechts (Lindel et al. 2001). Alkohol- und Tabakkonsum sind bei Patienten mit HPV-induzierten Karzinomen geringer oder sogar überhaupt nicht vorhanden (Andl et al. 1998). Laut Klussmann et al. aus dem Jahre 2001 spielen konventionelle Risikofaktoren bei HPV-assoziierten Tumoren eine untergeordnete Rolle. HPV-positive Patienten sind durch eine erhöhte Anzahl von Sexualpartnern und durch oral-genitalen oder oral-analen Kontakt charakterisiert (Smith et al. 2004).

Andere Studien zeigen eine Assoziation zwischen HPV-induzierten Karzinomen und einer undifferenzierten Histologie, einer kleinen Größe des Primärtumor (< T2) und häufig das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Smith et al. 2004; Hafkamp et al. 2008).

Molekularpathologische Unterschiede wurden bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben.

Vor allem aber wurde ein verbessertes Überleben für die Patienten mit HPV-positiven OSCC gezeigt. HPV-assoziierten Tumoren sprechen dabei vor allem besser auf die Radio-Chemotherapie (kurz RCT) an und zeigen dadurch ein deutlich bessere Prognose (Ang et al. 2010).

Tabelle 3: Vergleich von Faktoren bei HPV-induzierten und HPV-negativen Karzinomen

	HPV-positive OSCC	HPV-negative OSCC
Patientenabhängig		
Alter / Geschlecht	jünger, häufiger weiblichen Geschlechts	älter (> 60 Jahre)
Risikofaktoren	hohe Anzahl Sexualpartner	übermäßiger Alkohol und/oder Tabakkonsum
Tumorabhängig		
Größe / Metastasierung	kleine Tumorgröße (T1-T2), häufig N+	große Tumoren (>T2) häufig(er) N0
Lokalisation	Oropharynx, v.a. Tonsillen	auch Regionen außerhalb des Oropharynx
Histologie	undifferenziert	moderat bis gut differenziert
Molekularpathologisch	p53 und pRb Funktionsverlust durch Expression der viralen Onkogene E6 und E7	p53 Mutationen, zyto-genetische Instabilität
Therapieansprechen auf RCT	gut	schlecht
Prognose	gut	schlecht
Inzidenz	ansteigend	sinkend

2.2.6 Therapie und Prognose von HNSCC

Die Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen ist international bis heute uneinheitlich. Es ist dabei allerdings grundsätzlich therapeutisch ein multidisziplinärer Ansatz erforderlich. Therapieverfahren bestehen in chirurgischen, strahlentherapeutischen oder chemotherapeutischen Maßnahmen, welche alleinig oder in Kombination untereinander eingesetzt werden können (Kessler et al. 2008).

Die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren besteht zumeist aus der operativen Entfernung des Tumors, sowie unter Umständen aus einer Ausräumung der Halslymphknoten mit umgebendem Gewebe (Neck-Dissection) und einer anschließende Radio- und/oder Chemotherapie. Die operative Resektion des Tumors als primäre Therapie soll die Toxizität einer anschließenden Radio-Chemotherapie verringern, sowie die physische und psychische Belastung einer alleinigen Radio-Chemotherapie so klein wie möglich halten. Im Falle von inoperablen Tumoren ist die kombinierte Radio-Chemotherapie die Therapie der Wahl. Versucht wird dabei den Tumor so weit zu verkleinern, dass er anschließend gegebenenfalls noch operativ vollständig entfernt werden kann. Letztendlich ist die Wahl der Therapie von verschiedenen Faktoren abhängig. Tumorstadium und -lokalisierung, Alter und allgemeiner Gesundheitszustand des Patienten sowie individuelle Patientenwünsche spielen dabei eine Rolle (Jemal et al. 2008).

HPV-induzierte und HPV-nicht-induzierte Tumore werden bis heute gleichermaßen behandelt. Zu erwähnen ist aber die Studie von Lindel et al., in der alle Patienten dasselbe Schema einer Strahlentherapie erhielten. Hier war das günstige Ansprechverhalten der HPV-positiven Tumoren auf die Therapie besonders deutlich. Vermutet wird dabei eine erhöhte Radiosensitivität HPV-assoziiertes Karzinome. Entsprechend zeigen HPV-induzierte Oropharynxkarzinome eine deutlich bessere Prognose (Lindel et al. 2001; Ang et al. 2010; Wittekindt et al. 2018).

Nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert-Koch-Instituts beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für die Jahre 2013/2014 bei Männern rund 48% und bei Frauen 59% für nicht-HPV-induzierte Karzinome des Rachens und der Mundhöhle.

Weitere Prognosefaktoren sind die Lokalisation des Primärtumors sowie Stagingparameter (N0 / N+). Auch die klinische Studie von Fakhry et al. (Fakhry et al. 2008) zeigt eine verbesserte Überlebensrate von Patienten mit HPV-induzierten Tumoren im Gegensatz zu solchen mit einer HPV-negativen Karzinogenese. Des Weiteren folgt bei Patienten mit HPV-positiven OSCC ein verlängertes krankheitsfreies Intervall als bei nicht HPV-induzierten Tumoren und es zeigte sich ein signifikant verringertes Rezidivrisiko (Ragin und Taioli 2007).

2.3 Laktatdehydrogenase A

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches folgende reversible Reaktion in der anaeroben Glykolyse katalysiert:

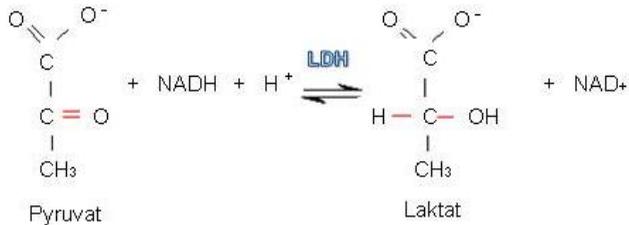


Abbildung 4: Die chemische Reaktion von Pyruvat zu Laktat mit Hilfe der Laktatdehydrogenase (LDH)

In menschlichem Gewebe gibt es 5 aktive Isoenzyme der Laktatdehydrogenase. Das Enzym ist ein Tetramer, welches aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten M und H (auch A und B genannt) zusammengesetzt ist. Diese Einheiten verbinden sich in unterschiedlicher Weise, so dass 5 Enzymkomplexe entstehen. Diese werden nach ihrer Zusammensetzung H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ und M₄ genannt (Tabelle 4). H-Ketten dominieren im Herzmuskel, während M-Isoformen vor allem im Skelettmuskel vorkommen. In Muskelzellen ist die hauptsächliche Form der LDH das Isoenzym A (LDHA), bestehend aus vier A-Untereinheiten. Liegen mehr A als B-Ketten vor, so wird das Enzym effizienter bei der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat (LDHA beziehungsweise LDH₅). Bei einem überwiegenden Vorliegen von B-Einheiten (LDH₁ beziehungsweise LDHB) wird vor allem die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert (Krebs-Zyklus). Jedes Monomer besitzt dabei seine eigene NADH-Bindungsstelle.

Tabelle 4: Zusammensetzung der 5 Isoenzyme der Laktatdehydrogenase. Die Untereinheiten werden von den Genen LDHA und LDHB codiert

Isoenzym	Enzymkomplexe	
LDH-1	H4	4 x LDHB
LDH-2	H3M1	3 x LDHB / 1 x LDHA
LDH-3	H2M2	2 x LDHB / 2 x LDHA
LDH-4	H1M3	1 x LDHB / 3 x LDHA
LDH-5	M4	4 x LDHA

Anders als normale Zellen gewinnen Tumorzellen auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung ihre Energie primär aus Glukose durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat und nicht durch vollständige Oxidation mit Hilfe von Sauerstoff während des Krebs-Zyklus. Dieses Phänomen wird als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (siehe Abbildung 5). Nach Aufnahme über den Glukosetransporter GLUT1 wird Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. In normalen Zellen wird Pyruvat in die Mitochondrien geschleust, wo es mit Hilfe von Sauerstoff in der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Synthese verwendet wird. Tumorzellen gewinnen Energie überwiegend in der Glykolyse. Dabei entstehendes Laktat wird über den Monocarboxylattransporter MCT1 aus der Zelle ausgeschleust und sorgt so für einen Abfall des pH-Wertes im Blut.

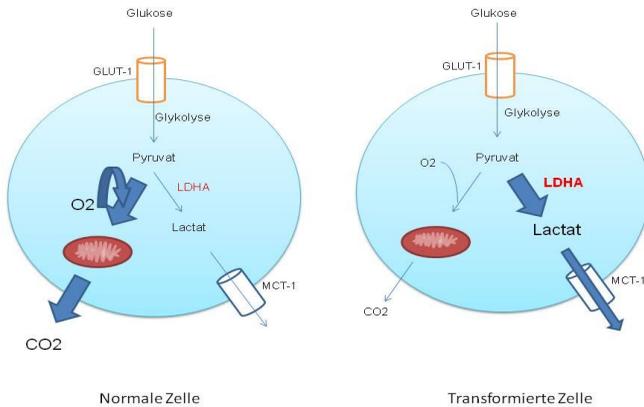


Abbildung 5: Vergleich des Glukosemetabolismus einer gesunden mit einer transformierten Zelle („Warburg Effekt“)

Eine klinische Relevanz erfährt der Glukosemetabolismus dahingehend, dass die erhöhte Expression von Glukosetransportern (GLUT1, GLUT3) seit langem in der medizinischen Diagnostik genutzt wird. Die Glykolyserate eines Tumors kann mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sichtbar gemacht werden.

Bei gesunden Epithelzellen steigt der LDH-Level bei einer Zellantwort auf Hypoxie, Nekrose, Hämolyse und Myokardinfarkten an. Da LDHA eine Schlüsselrolle bei der Regulation der anaeroben Glykolyse spielt, sind Tumorzellen für ihr Wachstum durch eine Hochregulation von LDHA nicht mehr auf die Versorgung mit Sauerstoff angewiesen, sondern sie nutzen die Energie durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat in der anaeroben Glykolyse.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen und gesundes menschliches Gewebe eine gleiche Konzentration von LDHB zeigen. LDHA hingegen ist in Tumorzellen deutlich erhöht (Miao et al. 2013; Shi und Pinto 2014). So untersuchte Koukourakis et al. die Expression von LDHA im kolorektalen Adenokarzinom. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen dessen Überexpression und schlechter

Überlebensrate der Patienten. Koukourakis et al. konnten auch im Lungenkarzinom eine erhöhte Expression von LDHA finden. Diese korrelierte mit der Tumoraggressivität und schlechter Prognose für die Patienten. Dies spiegelte sich auch in den erhöhten LDH-Konzentrationen im Serum der Patienten wieder (Koukourakis et al. 2003; Koukourakis et al. 2009; Koukourakis et al. 2009).

Auch bei Kopf-Hals-Tumoren konnte diese Arbeitsgruppe eine Überexpression von LDHA feststellen. Hier zeigten sich eine erhöhte Bildung von Metastasen und eine stärkere Infiltration des Tumors in umliegende Gewebe. Außerdem wurden vermehrt Rezidive festgestellt (Koukourakis et al. 2009).

2.4 Hypoxie

Unter Hypoxie werden sowohl in gesunden Zellen als auch in veränderten Zellen über HIF-1- α verschiedene Gene reguliert. Der Transkriptionsfaktor HIF-1- α steht dabei im Zentrum eines komplexen Netzwerkes. Unter Normoxie wird HIF-1- α an Prolinresten von spezifischen Prolyhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert. Dies führt zu einer Ubiquitinierung von HIF-1- α über das Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen (kurz VHL-Gen) und in der Folge zu dessen proteosomalen Degradation. Ein hypoxisches Milieu stabilisiert wiederum den Transkriptionsfaktor da die PHD-Aktivität Sauerstoffabhängig ist. Die Prolinreste können nicht mehr hydroxyliert werden und es kommt zu einer Dimerisierung von HIF-1- α und HIF-1- β . Der hieraus entstehende HIF Komplex kann nun in den Zellkern wandern und dort verschiedene Gene, unter anderem der Glukoseaufnahme, Glykolyse, Laktatproduktion, pH-Regulation und Angiogenese regulieren (Airley et al. 2007) (siehe Abbildung 6). Dies führt zu einer Induktion von Enzymen der anaeroben Glykolyse für die ATP-Synthese unter hypoxischen Bedingungen. Zu diesen Enzymen gehören die Laktatdehydrogenase A (LDHA) und Glukosetransporter wie GLUT-1 und GLUT-3. Auch die HP-Virusproteine E6 und E7 beeinflussen den Zellmechanismus dahingehend, dass selbst ohne das Vorliegen von hypoxischen Bedingungen HIF-1 α stabilisiert wird und als Dimer in den Zellkern wandern kann.

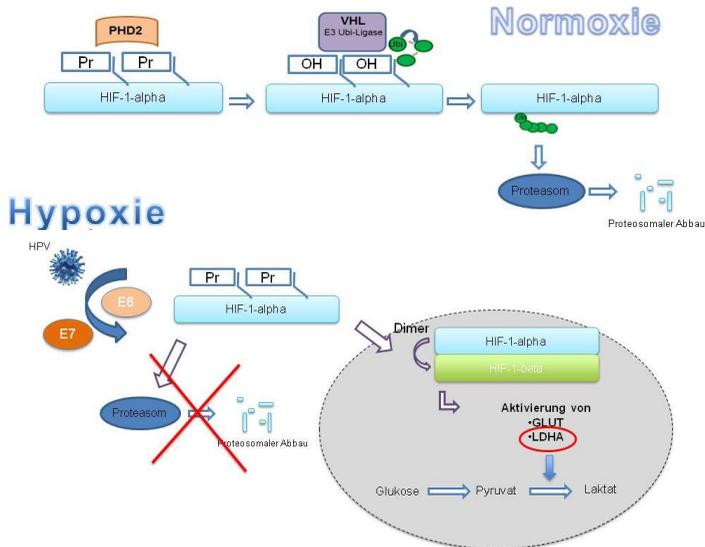


Abbildung 6: Der Abbau von HIF-1-alpha unter Normoxie und dessen Stabilisierung unter Hypoxie (Pr = Prolinreste; OH = Hydroxylgruppen; Ubi = Ubiquitinreste)

2.4.1 Hypoxie und der physiologische Glukosemetabolismus

Die Konzentration der Laktatdehydrogenase A ist unter hypoxischen Zellbedingungen erhöht. Dabei erfüllt die Bildung von Laktat den Zweck, das in der Glykolyse benötigte Nicotinamadadenindinukleotid+ (kurz NAD+) zu generieren. Physiologisch zeigt sich dieser Effekt vor allem unter einem intensiven und langandauernden Muskeltraining. Laktat reichert sich in den Muskeln an wenn der Verbrauch von Sauerstoff dessen Vorrat übersteigt. Das Laktat selbst ist für den Organismus nicht weiter nutzbar und wird von der Zelle ausgeschieden. Es wird anschließend über den Blutstrom in die Leber transportiert. Dort läuft in Gegenwart von NAD+ die umgekehrte Reaktion ab und

Laktat wird dabei zu Pyruvat oxidiert. Die Reaktion läuft auch in einigen Muskelgeweben ab, sofern NAD^+ verfügbar ist (Bensaad und Harris 2014).

2.4.2 Hypoxie und der onkogene Glukosemetabolismus

Auch Onkoproteine können HIF-1-alpha stabilisieren und somit die Energieversorgung eines Tumors auch unter Hypoxie gewährleisten (Semenza, G.L. 2007; Miao et al. 2013; Shi und Pinto 2014). Weiterhin stimuliert HIF-1a die Angiogenese und führt durch eine erhöhte Sauerstoffversorgung des Tumors zu einer verstärkten Radiosensitivität von HPV-positiven Tumorzellen (Lindquist et al. 2007; Semenza, G.L. 2007; Arenz et al. 2014).

Die Forschungsgruppe der Tumorforschung der Hals-, Nasen- Ohrenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen (Knuth et al. 2017) untersuchte den Einfluss von HIF-1a bei HPV-positiven Zelllinien von HNSCC unter Normoxie und unter hypoxischen Bedingungen. Die Ergebnisse zeigten eine vermehrte Expression von HIF-1a und PHD2 bei HPV-positiven HNSCC sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien. HIF-1a zeigte dabei unter Normoxie ein bis zu 7-fach höheres Proteinlevel bei den HPV-positiven Zelllinien als bei HPV-negativen. Unter Normoxie wird HIF-1a hydroxyliert und abgebaut, dabei spielt PHD2 offenbar eine wichtige Rolle. In der Arbeit von Knuth et al. wurde weiterhin die Wundheilung in vitro untersucht, um die zelluläre Anpassungsreaktion auf Hypoxie zu vergleichen. Eine Inhibition von HIF-1a führte zu einer verminderten Migration und Proliferation in HPV-positiven Zelle, nicht so bei HPV-negativen Zelllinien. Zellen ohne HPV-Assoziation änderten ihr Proliferations- und Migrationsverhalten nicht unter HIF-1a-Inhibition, allerdings verschlechterte sich die wundheilende Zellaktivität unter chemisch induzierter Hypoxie. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen in der Immunfluoreszenz von HPV-positiven Zellen eine verringerte Färbung von E-Cadherin vorliegt. E-Cadherin ist ein transmembranöses Protein welches vor allem in Epithelien vorkommt. Cadherine dienen der Zell-Zell-Adhäsion und sind somit entscheidend an Zellkontakten und Gewebeverbunden beteiligt. Der Verlust von E-Cadherin wird in Zusammenhang mit erhöhtem Metastasierungsrisiko von HPV-assoziierten HNSCC gebracht. Zusammenfassend zeigt die Arbeit von Knuth et al., dass in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Hypoxie vermehrt HIF-1a

exprimiert wird und der PHD2-Level hingegen verringert ist. Zusätzlich fand die Arbeitsgruppe heraus, dass HIF-1a bei HPV-assoziierten Zelllinien vor allem im Zellkern lokalisiert ist. Von daher wird weiterführend angenommen, dass HIF-1a einen funktionellen Einfluss auf die Zellregulation und Tumorzellwachstum hat und das Überleben von Zellen fördert.

Die Arbeitsgruppe führte in diesem Bereich weiterführende Untersuchungen durch und verglich den Zellmetabolismus von HPV-positiven und HPV-negativen Tumorzellen, diesmal im Bereich des Glukosestoffwechsels von OSCC (Sharma et al. 2017). Mittels eines PET-CT (einer Kombination aus Positronen-Emissions-Tomografie und Computertomografie) können zuvor verabreichte Radiopharmaka detektiert und Rückschlüsse unter anderem auf die Stoffwechselaktivität von Tumoren gezogen werden. Sharma et al. nutzen dabei die mit Fluor markierte Fluordesoxyglucose (F-FDG), welche aus der Blutbahn mittel Glukosetransportern in die Zelle aufgenommen wird und dort Rückschlüsse auf den Glukosemetabolismus erlaubt. Tumorzellen zeichnen sich dabei durch einen besonders hohen Glukosestoffwechsel (verstärkte Glukoseaufnahme und Glykolyse, vermehrte Laktatproduktion) aus. Entgegen der Annahme einer unterschiedlichen Glukoseaufnahme bei HPV-positiven und negativen OSCC zeigten sich im PET-CT keine signifikanten Unterschiede. Die Glukoseaufnahme war allerdings bei HPV-positiven Lymphknotenmetastasen signifikant höher als bei HPV-negativen Metastasen. Es zeigte sich weiterhin ein erhöhter Glukosemetabolismus bei HPV-negativen Primärtumorproben mit einer Größe T3 und T4. Dies wird mit hypoxischen Tumorbereichen durch eine verringerte Sauerstoffversorgung bei großen Tumoren in Verbindung gebracht. Die Arbeitsgruppe stellt aus diesen gewonnen Erkenntnissen die Hypothese auf, dass die Glukoseaufnahme bei HPV-assoziierten OSCC an die Interaktion von viralen Onkoproteinen mit Zellproteinen gekoppelt ist. Dies würde zu einer HPV-induzierten Glykolyse führen, hervorgerufen durch eine Hypoxie-unabhängige Induktion von HIF-1a.

Auf Grund der bereits veröffentlichten und in den Kapiteln zuvor erläuterten Daten bezüglich der LDHA-Expression bei Tumoren und den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Knuth et al. und Sharma et al.), sollte in dieser Arbeit die LDHA-Expression als essentieller Teil des Glukosemetabolismus bei HPV-assoziierten OSCC untersucht werden.

3. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Der Schwerpunkt der HNO-Tumorforschung in Gießen liegt darin, den Zusammenhang von humanen Papillomaviren mit Mechanismen der Karzinogenese, dem Ansprechen auf verschiedene Therapiemöglichkeiten und der Prognose von Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren zu untersuchen. Dabei spielt besonders der Transkriptionsfaktors HIF und dessen Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden innerhalb der HPV-assoziierten Tumorzelle eine Rolle. Der Einfluss viraler Onkoproteine auf HIF-1-a und dadurch bedingter Expression von Enzymen der anaeroben Glykolyse soll in dieser vorliegenden Arbeit weiterführend untersucht werden.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine veränderte LDHA-Expression einen Einfluss auf die Karzinogenese und auf das Therapieansprechen von malignen Tumoren hat (Sheng et al 2012; Rong et al 2013; Huang et al 2016). Im Bereich der Oropharynxkarzinome wurde dies bisher allerdings wenig untersucht. Allerdings zeigen dabei vor allem die Arbeitsgruppe um Knuth und Sharma die Bedeutung von HIF-1a bei der Karzinogenese von HPV-assoziierten OSCC und den Einfluss auf den Glukosemetabolismus der transformierten Zelle (Knuth et al. 2017; Sharma et al. 2017).

Auf Grund der zuvor beschriebenen Erkenntnisse liegt dieser Arbeit die Fragestellung zugrunde, ob bei HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen im Oropharynx ein Unterschied in der Expression von LDHA im Vergleich zu einer Noxen-assoziierten Karzinogenese festgestellt werden kann. Dafür wurden das immunhistochemische Färbemuster, die LDHA-Intensität und die Größe der stark gefärbten LDHA-Fläche ausgewertet. Zudem soll untersucht werden, ob eine veränderte Expression von LDHA Einfluss auf das Überleben der Patienten hat.

4. Material und Methoden

4.1 Datenmaterial

Die Patienten des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs befanden sich wegen eines histologisch gesicherten OSCC in Behandlung in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Grundlage der Patientenauswahl war ein Untersuchungszeitraum vom 01.01.2000 bis zum 31.12.2016. Zur Datenerfassung wurden folgende Dokumente ausgewertet:

- poliklinische Patientenakte
- stationäre Patientenakte
- histo-pathologische Untersuchungsberichte und –befunde

Das aufgenommene Datenmaterial enthält folgende Informationen:

- biometrische Merkmale:
 - Geschlecht
 - Alter: Die Patienten des Kollektivs wurden eingeteilt in „jung“ (Alter bei Diagnosestellung unter 60 Jahren) und „alt“ (Patienten ≥ 60 Jahre)
 - Alkohol- und Tabakkonsum
 - Die Einteilung des Alkoholkonsums erfolgte in der Maßeinheit des sogenannten „Standardglas“. Diese Maßeinheit der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung gibt den Alkoholgehalt unabhängig von der aufgenommenen Menge an Flüssigkeit an. Ein Standardglas entspricht dabei zehn Gramm reinem Alkohol.
Für die statistische Auswertung wurden die Patienten aufgeteilt in < 2 Standardgläsern und ≥ 2 Standardgläsern pro Tag.
 - Als Raucher wurden Patienten mit einem Nikotinkonsum von mindestens 3 Zigaretten pro Tag eingestuft. Bei weniger als dieser Anzahl pro Tag galten diese Patienten als Nichtraucher. Ebenfalls als Nichtraucher wurden Patienten eingestuft, wenn der Nikotinabusus seit mindestens 16 Jahren eingestellt wurde.

- Tumordiagnose
 - Diagnosedatum
 - TNM-Klassifikation
 - anatomische Lokalisation
 - UICC-Stadium
 - histologische Klassifizierung
 - Residualstadium
- Therapie
 - Therapiedatum
 - Art der angewandten Therapiemaßnahme(n)
- Prognose
 - Patient lebendig oder verstorben
 - Überleben nach Erstdiagnose
 - Dauer der Tumorfreiheit
 - Auftreten eines Rezidivs

Die Daten wurden in eine IBM-SPSS-Datei eingepflegt und ausgewertet.

4.2 HPV-Nachweis

Der Nachweis der HPV-DNA in allen Gewebeproben erfolgte am Institut für angewandte Tumorbologie des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums in Heidelberg. Dies geschah mit einer PCR zur HPV-Genotypisierung. Zusätzlich erfolgte die immunhistochemischen Untersuchung von p16 an den einzelnen Gewebeschnitten. Die Kombination beider Testverfahren ist heutzutage als obligat anzusehen. Laut Hoffmann et al. (2010) kann ein geringer Anteil von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich eine p16-Überexpression trotz HPV-Negativität aufweisen. Eine alleinige immunhistochemische Untersuchung auf eine p16-Überexpression kann somit zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Nur die Kombination von positiver HPV-DNA und dem Nachweis einer Überexpression von p16 führen zur sicheren Diagnose eines HPV-positiven Gewebes.

4.3 Patientenkollektiv

Aus den aufgenommenen Daten wurden Patienten mit einem HPV-positiven Untersuchungsbefund eines OSCC und ohne nodalen Metastasen (N=0) ausgewählt. Wie bereits erläutert liegt im Zentrum des Tumornestes bei großen Tumoren eine verringerte Sauerstoffversorgung vor und durch diese hypoxischen Tumorbereiche kann es bereits zu einem immunhistochemischer Nachweis von LDHA ohne Beteiligung von HPV kommen. Aus diesem Grund kamen für die vorliegende Arbeit nur Patienten mit einem histologisch gesicherten OSCC der Größen T1 bis einschließlich T3 in Frage. Zu diesen ausgewählten Patienten wurden passende weitere Patienten gewählt (HPV-positiv und N+ sowie HPV-negativ und N0 beziehungsweise N+, Alter, Geschlecht) und so ein sogenanntes „matched-pair“-Kollektiv erstellt, so dass insgesamt 74 Patientinnen und Patienten eingeschlossen werden konnten. 34 Patienten (entspricht 46 %) zeigten einen HPV-positiven Befund, wohingegen die andere Hälfte des Patientenkollektivs keine HPV-assoziierte Tumorgenese aufwies.

Eine ausführliche Aufstellung des Patientenkollektivs findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Detaillierte Aufstellung des Patientenkollektivs

<i>Patientencharakteristika</i>		Gesamt- kollektiv n = 74	HPV- negativ n = 40	HPV- positiv n = 34	p-Wert
Geschlecht	männlich	53 (72%)	32 (80%)	21 (62%)	0,083
	weiblich	21 (28%)	8 (20%)	13 (38%)	
Alter	jung (<60 Jahre)	26 (35%)	15 (38%)	11 (32%)	0,644
	alt (>=60 Jahre)	48 (65%)	25 (62%)	23 (68%)	
ECOG	gesund (0-1)	61 (82%)	34 (85%)	27 (79%)	0,529
	krank (2-4)	13 (18%)	6 (15%)	7 (21%)	
Alkohol	>2 Standardgläser	33 (45%)	29 (73%)	4 (12%)	0,000
	<2 Standardgläser	39 (53%)	10 (25%)	28 (82%)	
	2	2 (2%)	1 (2%)	2 (6%)	
	keine Angabe				

Nikotin	ja	47 (64%)	32 (80%)	15 (44%)	0,002
	nein	24 (32%)	7 (18%)	17 (50%)	
	keine Angabe	3 (4%)	1 (2%)	2 (6%)	

Tumorcharakteristika

Lokalisation	Vorderwand	22 (30%)	9 (23%)	13 (38%)	0,119
	Seitenwand	42 (57%)	22 (55%)	20 (59%)	
	Hinterwand	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	
	Dach	9 (12%)	8 (20%)	1 (3%)	
UICC-Stadium	1-3	44 (59%)	23 (57%)	21 (62%)	0,297
	4a	25 (34%)	13 (33%)	12 (35%)	
	4b-c	5 (7%)	4 (10%)	1 (3%)	
T-Stadium	1-2	54 (73%)	29 (72%)	25 (74%)	0,921
	3	20 (27%)	11 (28%)	9 (26%)	
N-/M-Stadium	N0 und M0	29 (39%)	20 (50%)	9 (26%)	0,154
	N>0 / M>0	45 (61%)	20 (50%)	25 (74%)	

Therapie

sanierende OP	60 (81%)	33 (83%)	27 (80%)	alle Patienten bekamen eine/mehrere kurative Therapien
Neck-Dissection	53 (72%)	31 (78%)	22 (65%)	
Bestrahlung	56 (75%)	28 (70%)	28 (82%)	
Chemotherapie	31 (42%)	15 (38%)	16 (47%)	

*p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

Anmerkung zur Therapie:

Zeilen ergeben nicht 100%, da bei Patienten auch mehrere Therapieansätze in Kombination erhalten konnten.

4.4 Biometrische Merkmale

Von den untersuchten Patienten (n = 74) sind 21 weiblich (entspricht 28,4%) und 53 Patienten männlich (entspricht 71,6%)

Die Altersverteilung zum Zeitpunkt der Diagnose liegt zwischen 42,9 und 82,3 Jahren. Zur statistischen Auswertung wurde die Altersspannweite in „jung“ (unter 60 Jahren) und „alt“ (≥ 60 Jahre) unterteilt. 26 Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 60 Jahre, 48 sind älter.

Es lässt sich weiterhin erkennen, dass nur bei 16 (entspricht 21,6%) der insgesamt 74 Patienten weder ein Nikotin-, noch an einem Alkoholabusus festgestellt wurden. 7 Patienten mit einem HPV-negativen Status (dies entspricht 9,5% des Gesamtkollektivs und 17,5% der HPV-negativen OSCC) litten weder an einer Alkohol-, noch an einer Nikotinabhängigkeit, wohingegen Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC häufiger weder einen Nikotin-, noch einen Alkoholabusus angaben (15 Patienten, entspricht 20,3% des Gesamtkollektivs und 44,1% der HPV-positiven OSCC).

4.5 Tumordiagnosen

Der Zeitpunkt der Erstdiagnose eines OSCC ereignete sich bei den 74 Patienten über einen Zeitraum von 14 Jahren (24.07.2000 bis 29.04.2014).

Bezüglich der Lokalisation wurde aufgenommen in welchem anatomischen Bereich der Tumor vorzufinden war (Zungengrund, Vallecula, Tonsillen, Glossotonsillarfurche, Weichgaumen, Uvula, Hinterwand und mehrere Bereiche überlappend). Anschließend erfolgte eine weitere Gruppierung in vier Abschnitte (Vorder- und Hinterwand, Dach, Seitenwand). Zungengrund und Vallecula gehören dabei zur Vorderwand, Tonsillen und Glossotonsillarfurche jeweils zur Seitenwand, Weichgaumen und Uvula zum Dach des Oropharynx. Der Bereich der Tonsillen (Seitenwand des Oropharynx) macht dabei mit knapp 40% den größten Teil der Tumorlokalisierung aus (siehe Abbildung 7).

Die Verteilung der Lokalisation der Primärtumore bei Erstdiagnose lässt sich weiterhin Abbildung 8 entnehmen.

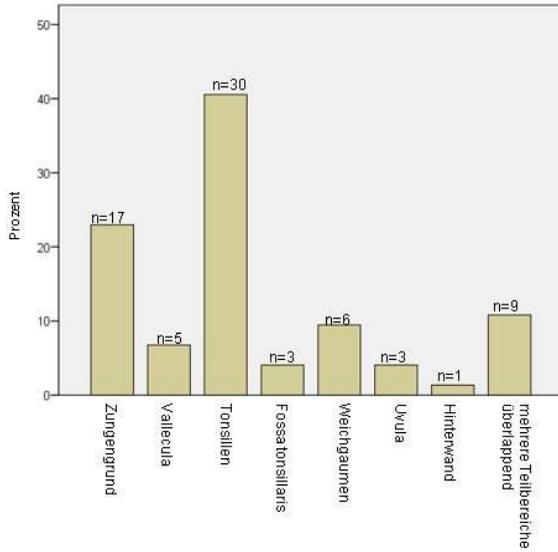


Abbildung 7: Detaillierte Lokalisation der Primärtumore bei Erstdiagnose

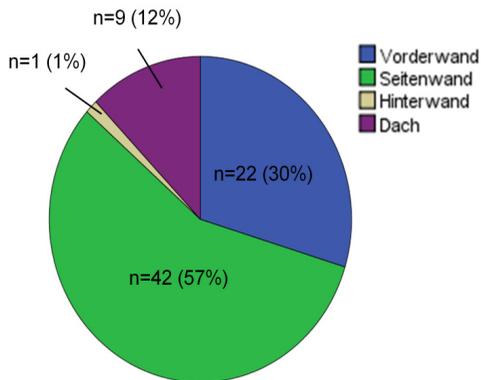


Abbildung 8: Kategorisierte Lokalisation der Primärtumore bei Erstdiagnose

Es erfolgte weiterhin eine Analyse der UICC-Stadien bei Erstdiagnose. Nach Vorgaben der UICC lassen sich Stadien von Krebserkrankungen nach der TNM-Klassifikation zu folgenden Stadiengruppierungen zusammenfassen (UICC Stadien 7. Auflage (gültig ab 2010)).

- Stadium I T1 N0 M0
- Stadium II T2 N0 M0
- Stadium III T3 N0 M0
 bis T3 N1 M0
- Stadium IV
 IV a: T1-3 N2 M0 oder T4a N0-2 M0
 IV b: jedes T N3 M0 oder T4b N0-3 M0
 IV c: jedes M1

Die Stadien III und IVa sind mit jeweils über 30% am häufigsten vertreten. Es folgt das Stadium II (15%) und Stadium I (13,5%). Die Stadien IVb und IVc sind seltener vertreten (4% beziehungsweise 3%).

4.6 Therapie und Überleben

Bei den Therapiemöglichkeiten wird zwischen der kurativen und der palliativen Therapie unterschieden.

Palliativmedizin beinhaltet lindernde Behandlungen unheilbar kranker Patienten (zum Beispiel in der Onkologie).

Bei einer Behandlung spricht man dann von Kuration, wenn sie auf eine vollständige Wiederherstellung der Gesundheit („restitutio ad integrum“) beziehungsweise auf eine definitive Tumorkontrolle eines Patienten abzielt und so auch gleichzeitig eine Verschlechterung verhindern soll. Zu der kurativen Therapie gehören bei der Behandlung eines Plattenepithelkarzinoms im Oropharynx die chirurgische Entfernung des Tumors, die Bestrahlung und die Chemotherapie. Zudem findet sich im Bereich der operativen Entfernung die Möglichkeit der Neck-Dissection. Neck-Dissection (zu Deutsch „Halspräparation“) bezeichnet eine Radikaloperation mit Ausräumung aller

Lymphknoten des Halses. Dies erfolgt zusammen mit einer Tumoroperation im Kopf-Hals-Bereich um Metastasen des Tumors zu entfernen und eine weitere Streuung von Tumorzellen im Körper zu verhindern. Die verschiedenen kurativen Therapiemöglichkeiten können zudem miteinander kombiniert werden.

Bis zum Ende der Auswertung der gesammelten Patientenparameter (Stand 31.12. 2016) sind 28 der insgesamt 74 Patienten verstorben. Dies entspricht 37,8 %. Der Mittelwert des Gesamtüberlebens nach Erstdiagnose liegt dabei bei 4,4 Jahren. Nur bei vier der 74 Patienten wurde im Nachbehandlungszeitraum das Auftreten eines Rezidivs festgestellt. Im Schnitt dauerte es bei diesen vier Patienten dabei 2,8 Jahre bis zum Auftreten des Tumorrezidivs.

4.7 Immunhistochemie

Die Überprüfung der Hypothese dieser Dissertationsarbeit erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung von Gewebeschnitten HPV-positiver und HPV-negativer OSCC. Diese wurden im Anschluss auf unterschiedliche LDHA-Expression mikroskopisch untersucht und die gewonnenen Daten ausgewertet.

4.7.1 Gewebeschnitte

Aus Paraffin-Gewebeblöcken wurden mit einem Schlitzenmikrotom der Firma Leica (Modell SM2010R) 2,5 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf Superfrost-Plus Objektträger aufgezogen. Nach der 24-stündigen Trocknung bei 37 Grad Celsius in einem Wärmeschrank konnten die Gewebeschnitte in einer immunhistochemischen Färbung untersucht werden.

Für den Nachweis der HPV-DNA ist eine Untersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion notwendig. Dafür wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 µm hergestellt und in DNA-LoBind-Tubes der Firma Eppendorf überführt.

4.7.2 Immunhistochemische Untersuchung

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Methode, mit welcher spezifische chemische Verbindungen, insbesondere Peptide und Proteine, mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können. In der Regel soll ein Antigen in einem Gewebeschnitt nachgewiesen werden. Dabei wird der Gewebeschnitt mit einer Lösung inkubiert, in der ein spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Antigen enthalten ist. In einem zweiten Schritt bindet ein enzymkonjugierter sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. In dieser Arbeit erfolgte dies über die Verwendung der ABC-Methode (ABC = Avidin-Biotin Enzyme Complex) (Hsu et al. 1981). Die ABC-Methode ist ein Test zur Sichtbarmachung der Bindung von Antikörpern an Antigenen. Dabei reagiert der Primärantikörper mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, an den sich der vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplex bindet. Zum Ende erfolgten die Detektion der erfolgten Reaktionen mit einem passenden Farbsubstrat und gegebenenfalls eine Kernfärbung. Der letzte Schritt der Färbung stellte die Dehydrierung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol und die Eindeckelung dar.

Zunächst werden alle Schnitte vor der Färbung in Xylol und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Als nächstes erfolgte die Antigendemaskierung über die sogenannte „heat induced epitope retrieval“. Die feuchte Hitze sorgt für eine schonende Antigendemaskierung, die anschließende langsame Abkühlungsphase ist dabei entscheidend für die Rekonstituierung der Epitope. Im Anschluss erfolgt die Hemmung der endogenen Peroxidase zur Reduktion des Hintergrundsignals bei der Farbentwicklung. Danach wird ein Proteinblock mit einem für den Primärantikörper spezifischem Serum auf die Schnitte aufgebracht, welches in einer Herabsetzung der unspezifischen Antikörperbindung resultiert. Verhindert wird damit, dass Antigene binden könnten, die gar nicht nachgewiesen werden sollen. Darauf folgend werden die Gewebeschnitte mit dem 1. Antikörper inkubiert.

Der nächste Schritt der immunhistochemischen Färbung ist die Verwendung des sekundären Antikörpers. Dafür werden die gesuchten Antigene im Schnitt mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus inkubiert. Im Anschluss werden diese mit markierten Anti-Maus-Ig-Antikörpern (anti-mouse-biotin antibody) markiert. Der Nachweis erfolgt durch die Verwendung der ABC-Methode. Zum Ende erfolgen die Detektion der Reaktionen mit einem passenden Farbsubstrat und gegebenenfalls eine

Kernfärbung. Der letzte Schritt der Färbung stellt die Dehydrierung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol und die Eindeckelung dar.

Das Färbeprotokoll für diese Arbeit stellt sich folgendermaßen dar:

- Alle Schnitte zu Beginn entparaffinieren :

1x Xylol (älteres)	10 Minuten
1x Xylol (frischeres)	10 Minuten
2x Ethanol 100%	5 Minuten
2x Ethanol 96%	5 Minuten
1x Ethanol 70%	5 Minuten
- Spülen in VE-H₂O
- Target Retrieval Solution (pH 6) in Küvette füllen und Objektträger in der Küvette platzieren, Antigendemaskierung über die feuchte Hitze mittels eines nicht vorgewärmten Dampfgarers für 45 Minuten
- 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 5 Minuten in 1:1 Mischung aus TRS und TBST stellen
- 3x waschen in einer Küvette mit VE-H₂O, je 2 Minuten
- Hydrophobe Barriere auftragen
- 20 Minuten in 3% H₂O₂ inkubieren
- 2x2 Minuten mit VE-H₂O waschen in Küvette
- 5 Minuten mit TBST-Puffer waschen
- **Proteinblock:** 2% BSA in TBST für mindestens 60 Minuten
- 1 Minute mit TBST waschen
- **1. Antikörper:** LDHA Antibody (© 2010 Cell Signaling Technology, Inc.) (Semenza et al. 1996; Semenza, G.L. 2007) über Nacht inkubieren; Verdünnung: 1:200
- 2x 5 Minuten mit TBST
- **2. Antikörper:** Anti-mouse-Biotin-Antikörper (1:180) in TBST verdünnen, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Während der Inkubation ABC-Mix vorbereiten:
 - Mouse (1:125 A; 1:125 B; + TBST)
- Waschen auf Objektträger mit TBST für 5 Minuten
- Waschen in Küvette mit TBST für 5 Minuten
- ABC-Mix auftragen, 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Waschen auf Objektträger mit TBST für 5 Minuten
- Waschen in Küvette mit TBST für 5 Minuten

Detektion:

mittels Nova Red Substrat, für 10 Minuten bei Raumtemperatur

(Reagenz 1 1:76 + Reagenz 2 1:81 + Reagenz 3 1:81+ H₂O₂ 1:76 + HPLC-H₂O)

- 5 Minuten waschen in VE-H₂O auf Objektträger
- 5 Minuten waschen in VE-H₂O in Küvette
- für die Kernfärbung Hämalaun für 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 Min bläuen in leicht fließendem, kaltem Leitungswasser
- Dehydrieren:
 - 1x 1 Minute 70% Ethanol
 - 2x 1 Minute 96% Ethanol
 - 2x 1 Minute 100% Ethanol
 - 2x 3 Minuten Xylol
- Gewebeschnitte eindeckeln und aushärten

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Geräte in der immunhistochemischen Färbung

Material/Chemikalie	Zusammensetzung	Hersteller
ABC-Mix (Mouse)	A Avidin DH B Biotinylated Horseradish Peroxidase H	Vector Laboratories Inc.
anti-mouse IgG-HRP (1:180)		Cell Signaling Technology, Inc.
BSA-Block (bovine serumalbumine)		Sigma-Aldrich
Ethanol 100%, 96%, 70%		Otto Fischer
Hämalaun RT		Carl Roth
LDHA Antibody		Cell Signaling Technology Inc.
Mikroskop (DMI3000B)		Leica

NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Reagent 1 Reagent 2 Reagent 3 Hydrogen Peroxid Solution	Vector Laboratories Inc
Reiskocher		Tefal
TBS (Tris-buffered saline)10x	HCl (mit 10% oder höher konzentriertem HCl titrieren) NaCl 40g Tris 12,1g	AppliChem
TRS (Target Retrieval Solution) pH 6		Dako
TBS-T-Puffer (englisch Tris- buffered saline with Tween20)	H ₂ O 500ml TBST 10x 50ml Tween 20 500µl	AppliChem
Vortexer (Lab dancer)		IKA
Wasserstoffperoxid 3%		AppliChem
Xylol		Carl Roth

4.8 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der in der immunhistochemischen Untersuchung gewonnenen Ergebnisse wurde mit dem Softwareprogramm IBM-SPSS-Statistics Version 24 und Excel-Office 2010 gearbeitet.

Bei der deskriptiven Statistik erfolgte eine Auswertung des Log-Rank und des Chi-Quadrat Tests. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ ist das Ergebnis als statistisch signifikant anzusehen, bei einem Wert $\leq 0,1$ kann von einem Trend ausgegangen werden.

Die Überlebensanalyse in Abhängigkeit des HPV-Statuts erfolgte nach der Methode von Kaplan-Meier. Bei der Kaplan-Meier-Analyse wird dargestellt, wie häufig ein

bestimmtes Ereignis während des Untersuchungszeitraums aufgetreten ist. In dieser Arbeit wurde die Kaplan-Meier-Analyse genutzt, um für die Patienten des Kollektivs das Überleben in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Erstdiagnose des Primärtumors zu berechnen.

Da die Untersuchung via Kaplan-Meier eine univariante Analyse dargestellt, wurde zusätzlich eine multivariante Analyse mit dem Cox-Regression-Modell erstellt. Das genutzte Konfidenzintervall (confidence interval CI) (Konfidenzniveau 95%) gibt die Präzision der Lageschätzung der genutzten Parameter wieder. Die Hazard Ratio (HR) ist ein Maß des Risikoverhältnisses von zwei Gruppen, unter Berücksichtigung mehrerer Faktoren der Modellanalyse.

5. Ergebnisse

Als notwendige Vorarbeit erfolgte durch das Institut für angewandte Tumorbologie des Universitätsklinikums in Heidelberg die Analyse einer HPV-Beteiligung an der Karzinogenese der OSCC erfolge an Gewebeschnitten. Dazu erfolgte die PCR/Multiplex HPV-Genotypisierung und die immunhistochemische Untersuchung von p16. Nur bei einem Vorliegen des Nachweises der HPV-DNA und der positiven Immunreaktion gegen p16 wurde die Gewebeprobe als „HPV-positiv“ deklariert. Sind die Ergebnisse beider Untersuchungen negativ ausgefallen (HPV-DNA negativ und p16-Immunreaktion negativ) wurde der HPV-Status als „negativ“ bezeichnet. Sollte nur einer der beiden Parameter positiv sein, so kann der HPV-Status nicht endgültig festgelegt werden. Diese Patienten wurden nicht in das Kollektiv mit aufgenommen. Somit führt nur die Kombination von positiver HPV-DNA und dem Nachweis einer Überexpression von p16 zu der Diagnose eines HPV-positiven Tumors.

Grundlage des Patientenkollektivs bildet das Untersuchungs- und Datenmaterial von insgesamt 74 Patientinnen und Patienten. Diese befanden sich wegen eines histologisch gesicherten OSCC in Behandlung in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Ausgewählt wurden die Patienten auf Grund ihres HPV-Status. 34 Patienten (entspricht 45,9 %) zeigten einen HPV-positiven Befund, wohingegen 40 Patienten des Kollektivs eine nicht HPV-assoziierte Tumorgenese aufwiesen (entspricht 54,1 %).

5.1 Überlebensanalyse des Patientenkollektivs

Die Überlebensanalyse zeigt, dass Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC ein signifikant besseres Überleben gegenüber Patienten mit einem HPV-negativen Karzinom haben (Log-Rank-Test, $p=0,002$) (Abbildung 9).

Die mediane Überlebenszeit für HPV-negative Patienten beträgt 5,64 Jahre. Für HPV-positive Patienten kann die mediane Überlebenszeit nicht ermittelt werden, da das mediane Überleben dieser Patienten für den gesamten Untersuchungszeitraum bei über 50 % liegt. Deshalb wurde die 2-, 5- und die 10-Jahres-Überlebensrate berechnet (siehe Tabelle 8).

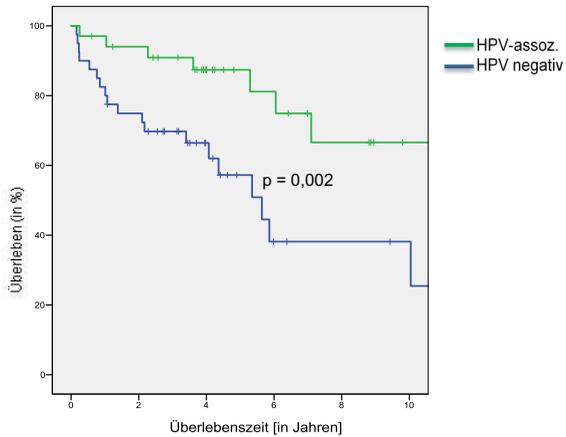


Abbildung 9: Überlebensanalyse anhand des HPV-Status beim OSCC

Zusätzlich zum Überleben abhängig vom HPV-Status wurden auch für alle anderen Risikofaktoren des Patientenkollektivs die mediane Überlebenszeit (siehe Tabelle 7) und die Überlebensraten errechnet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Mediane Überlebenszeit des Patientenkollektivs
(Gesamtkollektiv n=74; Alkohol n=72, Nikotin n=71)

		Mediane Überlebenszeit (Jahre)				p-Wert (Log-Rank)
		n	OS	95% CI		
				Untere Grenze	Obere Grenze	
Gesamtkollektiv		74	10,0	3,5	16,7	
Rezidiv		4	3,6	0,6	6,6	
HPV	HPV-negativ	40	5,6	3,6	7,7	0,002
	HPV-positiv	34	n.d.	n.d.	n.d.	
Alter	jung (<60 Jahre)	26	11,2	2,1	20,2	0,143
	alt (>=60 Jahre)	48	5,6	3,6	7,7	
Geschlecht	weiblich	21	10,0	3,3	16,8	0,177
	männlich	53	6,1	0,4	7,9	
ECOG	gesund (0-1)	61	10,0	3,7	16,4	0,551
	krank (2-4)	13	n.d.	n.d.	n.d.	
Alkohol	Standardgläser <2	33	5,9	0,007	11,7	0,282
	>2 Standardgläser	39	n.d.	n.d.	n.d.	
Nikotin	nein	24	n.d.	n.d.	n.d.	0,199
	ja	47	6,1	2,1	9,9	
Lokalisation	Tonsille	30	7,1	2,5	11,7	0,311
	nicht-Tonsille	44	11,3	4,0	18,6	
UICC-Stadien	4b-c	5	1,4	0,6	2,2	0,064
	4a	25	7,1	2,2	12,0	
	1-3	44	11,3	3,8	18,9	
T-Stadium	1-2	54	10,0	5,8	14,3	0,014
	3	20	5,6	0,8	10,5	
N-/M-Stadium	N0 und M0	29	11,3	3,3	19,4	0,350
	N>0 / M>0	45	6,1	4,1	8,0	

* n.d. = nicht durchführbar; p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

Tabelle 8: Überlebensraten des Patientenkollektivs
(Gesamtkollektiv n=74; Alkohol n=72, Nikotin n=71)

		Überlebensraten					
		n	2Y-OS (95% CI) (in %)	5Y-OS (95% CI) (in %)	10Y- OS (95% CI) (in %)	HR (95%CI)	p- Wert (Log- Rank)
Gesamtkollektiv		74	83,6	71,1	51,2		
Rezidiv		4	75,0	25,0	0		
HPV	HPV-negativ	40	74,9	57,2	38,2	1	0,002
	HPV-positiv	34	94,0	87,4	66,6	0,273	
Alter	jung (<60 Jahre)	26	88,1	83,9	66,1	1	0,143
	alt (>=60 Jahre)	48	81,2	63,8	42,0	1,855	
Geschlecht	weiblich	21	90,2	90,2	78,9	1	0,177
	männlich	53	81,1	64,1	41,2	1,930	
ECOG	gesund (0-1)	61	86,7	75,5	50,3	1	0,551
	krank (2-4)	13	69,2	53,8	53,8	1,318	
Alkohol	<2 Standardgläser	33	87,0	77,5	58,1	1	0,282
	>2 Standardgläser	39	78,7	61,6	47,9	1,544	
Nikotin	nein	24	87,3	77,8	66,6	1	0,199
	ja	47	82,8	67,6	47,8	1,804	
Lokalisation	Tonsille	30	79,6	65,4	49,8	1	0,311
	nicht-Tonsille	44	86,2	74,5	52,7	1,477	
UICC- Stadien	4b-c	5	40,0	40,0	20,0	1	0,06
	4a	25	92,0	66,7	48,6	0,375	
	1-3	44	83,9	76,8	58,5	0,275	
T-Stadium	1-2	54	90,6	76,1	56,7	1	0,014
	3	20	65,0	59,1	29,5	2,789	
N-/M- Stadium	N0 und M0	29	79,3	70,2	63,8	1	0,350
	N>0 / M>0	45	86,4	70,9	39,4	1,449	

* p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

5.2 LDHA-Färbemuster

Nach immunhistochemischer Färbung des Kollektivs zeigte sich unter dem Mikroskop eine unterschiedliche Verteilung der stark LDHA-gefärbten Zellen. Bei einem Teil der Gewebeschnitte ($n = 24$) ließ sich innerhalb des Tumors ein Färbemuster erkennen. Bei diesem Färbemuster liegen die am stärksten gefärbten Zellen zentral des Tumornestes. Dieses wird im Folgenden als „Hypoxiemuster“ bezeichnet. Bei 50 Gewebeschnitten konnte dieses Muster nicht festgestellt werden. Die stark gefärbten Zellen verteilen sich gleichmäßig in den Tumornestern. Dieses Färbemuster wird weiterhin als „uniformer Typ“ bezeichnet (Abbildung 10).

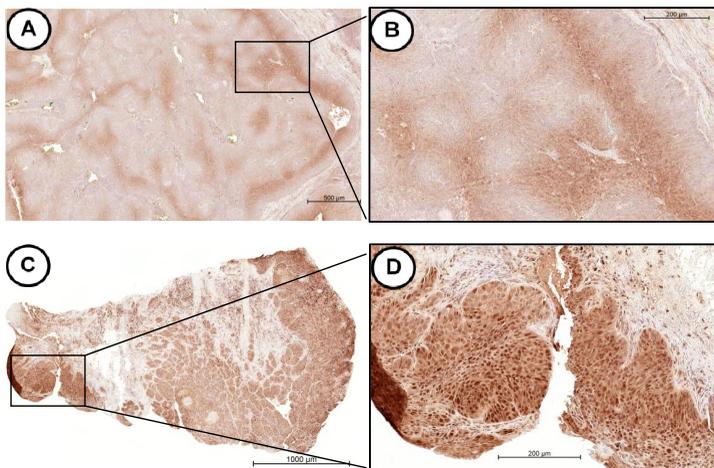


Abbildung 10: Die Ansicht der verschiedenen Färbetypen im Mikroskop:
A Hypoxiemuster Übersichtsaufnahme, B Hypoxiemuster Detailaufnahme
C uniformer Färbetyp Übersichtsaufnahme, D uniformer Typ Detailaufnahme

Es zeigt sich, dass bei HPV-assoziierten OSCC signifikant häufiger ein Hypoxiemuster in der immunhistochemischen Färbung von LDHA zu sehen ist als in HPV-negativen Geweben (Chi-Quadrat-Test, $p=0,048$). Bei HPV-negativen Tumorproben liegt LDHA dagegen vermehrt gleichmäßig verteilt vor (Abbildung 11 A). Bei größeren Tumoren (T3) ließ sich bei HPV-assoziierten OSCC signifikant häufiger ein Hypoxiemuster in der Färbung erkennen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,024$) (Abbildung 11 B). Bei kleineren Tumorgößen (T1 und T2) zeigte sich dies nicht. Patienten mit einem Primärtumor größer als T3 wurden nicht in das Patientenkollektiv für diese Arbeit mit aufgenommen. Des Weiteren konnte im Bezug auf das Alter der Patienten ein Unterschied erkannt werden. Tumorproben von Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigten in der immunhistochemischen Färbung häufiger ein Hypoxiemuster als die Gewebeproben von jüngeren Patienten (Chi-Quadrat-Test, $p=0,074$). Es wurde weiterhin das LDHA-Färbemuster bei Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der immunhistochemischen Färbung der Gewebeproben häufiger der uniforme Färbetyp vorkommt. Bei Rauchern ist dies signifikant häufiger (Chi-Quadrat-Test, $p=0,023$), bei Patienten mit erhöhtem Alkoholkonsum ist in der Häufigkeit ein Trend erkennbar (Chi-Quadrat-Test, $p=0,072$) (Abbildung 11 C und D). Bezüglich der Überlebensanalyse ließ sich bei den verschiedenen Färbemustern kein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit feststellen. Weder HPV-unabhängig noch aufgeteilt in HPV-positive und -negative OSCC ließ sich ein signifikanter Unterschied im 2-, 5, sowie auch im 10-Jahres-Überleben feststellen (Tabelle 9).

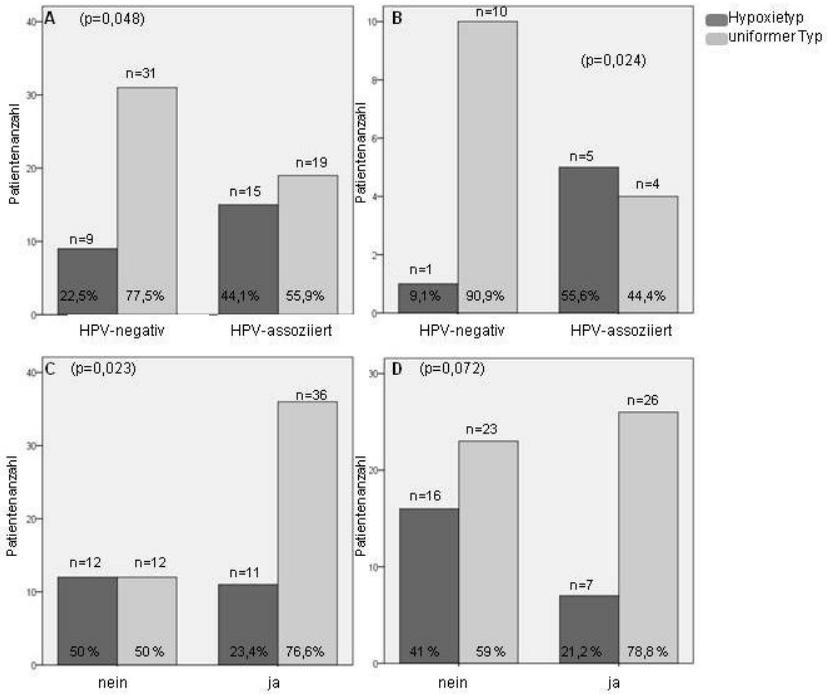


Abbildung 11: Verteilung der LDHA-Färbetypen bei verschiedenen Patienten- beziehungsweise Tumorkriterien

A: HPV-Status bei allen Patienten; B: HPV-Status, nur Tumorgroße T3

C: Nikotinabusus ja oder nein; D: vermehrter Alkoholkonsum ja oder nein

Tabelle 9: Überlebensanalyse anhand des LDHA-Färbemusters

LDHA-Färbemuster										
		uniformer Typ		Hypoxie-muster		HPV-negativ		HPV-positiv		
		uniformer Typ		Hypoxie-muster		uniformer Typ		Hypoxie-muster		
n		50	24	31	9	19	15			
Mediane Überlebenszeit (Jahre)	OS	10,0	5,3	5,9	4,4	n.d.	n.d.			
	95% CI	untere Grenz	3,5	n.d.	2,5	3,1	n.d.	n.d.		
		obere Grenz	16,7	n.d.	9,2	5,6	n.d.	n.d.		
	p-Wert (Log-Rank)	0,997		0,658		n.d.				
Überlebensraten	2Y-OS (95% CI) (in %)	83,8	83,3	74,2	77,8	100	86,7			
	5Y-OS (95% CI) (in %)	72,1	69,2	63,0	46,7	87,8	86,7			
	10Y-OS (95% CI) (in %)	52,5	46,2	45,0	23,3	65,9	65,0			
	HR (95%CI)	1	0,999	1	1,264	1	1,290			
	p-Wert	0,997		0,658		0,742				

* n.d. = nicht durchführbar; p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

5.3 LDHA-Intensität

Als weiterer Faktor zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung von LDHA konnte unter dem Mikroskop eine unterschiedlich starke Färbintensität innerhalb der Gewebeprobe erkannt werden. Dabei ließen sich schwächer und stärker gefärbte Bereiche deutlich unterscheiden. Im Vergleich zu gesundem Gewebe war die Färbintensität innerhalb eines Tumornestes immer als stärker anzusehen. Da sich innerhalb eines Tumorbereichs auch unterschiedlich stark gefärbte Bereiche vorfinden lassen (siehe Abbildung 11 bei Hypoxiemuster), wurde der untersuchte Gewebeschnitt der höchsten vorliegenden LDHA-Färbintensität zugeordnet (Abbildung 12).

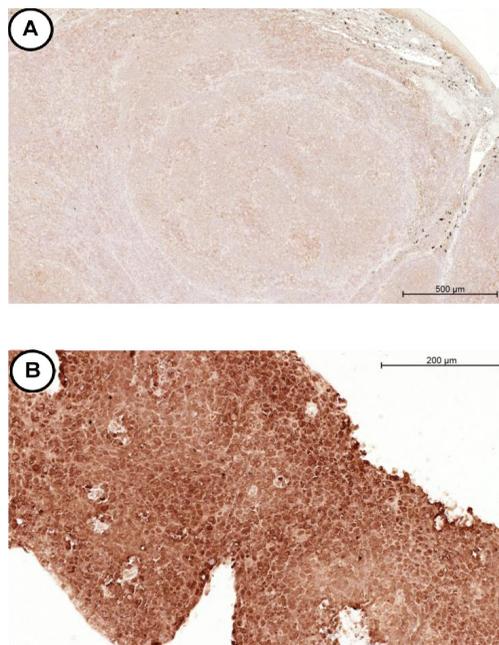


Abbildung 12: Die Ansicht der verschieden stark gefärbten Tumorfäche im Mikroskop
A: schwache LDHA-Intensität; B: starke LDHA-Intensität

Bei der Betrachtung des HPV-Status und der Färbeintensität zeigt sich, dass bei HPV-assoziierten Tumorseiten LDHA häufig schwächer exprimiert ist (Chi-Quadrat-Test, $p=0,077$) (Abbildung 13 A). Es stellt sich heraus, dass bei keiner der 21 weiblichen Patienten eine stärkere LDHA-Expression festgestellt werden konnte. Bei Gewebeprobe von männlichen Patienten zeigten 7 Proben (entspricht 13,4 %) eine vermehrt stärkere Färbeintensität. Somit ist bei Männern LDHA häufig stärker exprimiert als bei Frauen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,08$). Gewebeprobe von histologisch gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen zeigen signifikant häufiger eine stärkere Intensität der gefärbten Gewebebereiche (Chi-Quadrat-Test, $p=0,035$). Auch bei der Auswertung der Expressionsstärke von LDHA wurde der Zusammenhang zu externen Noxen untersucht. Es zeigt sich, dass Tumorseitenprobe von Patienten mit einem angegeben erhöhten Alkoholkonsum signifikant häufiger eine stärkere LDHA-Expression aufzeigen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,026$) (Abbildung 13 B). Es ließ sich kein Zusammenhang zu einem möglichen Nikotinabusus feststellen. Sowohl bei HPV-positiven, als auch bei HPV-negativen OSCC zeigte sich vermehrt eine schwache LDHA-Expression. Diese ist allerdings nicht als statistisch signifikant anzusehen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,25$). Bei Patienten mit einer schwächeren LDHA-Expression konnte unabhängig des HPV-Status ein signifikant besseres Überleben festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p=0,005$). Bei der Betrachtung der Überlebensanalyse anhand des HPV-Status scheint es so zu sein, dass die LDHA-Expression bei HPV-negativen Patienten einen Einfluss auf das Überleben hat (Log-Rank-Test, $p=0,045$), im Vergleich dazu bei HPV-positiven Patienten nicht (Log-Rank-Test, $p=0,711$) (Abbildung 14). Allerdings hat nur eine der HPV-positiven Gewebeprobe eine stärkere Intensität von LDHA innerhalb des Tumornestes gezeigt. HPV-unabhängig betrachtet zeigt sich, dass nur einer der insgesamt sieben Patienten mit einer stärkeren LDHA-Expression ein Überleben von über fünf Jahren aufweist (entspricht 14,3%), kein Patient mit einer stärkeren LDHA-Expression erreicht eine Überlebenszeit von 10 Jahren. Bei einer schwächeren Intensität liegt die 5-Jahres-Überlebenszeit bei knapp 75 %, die 10-Jahres-Überlebenszeit noch bei über 50 % (HPV-unabhängig) (Tabelle 10).

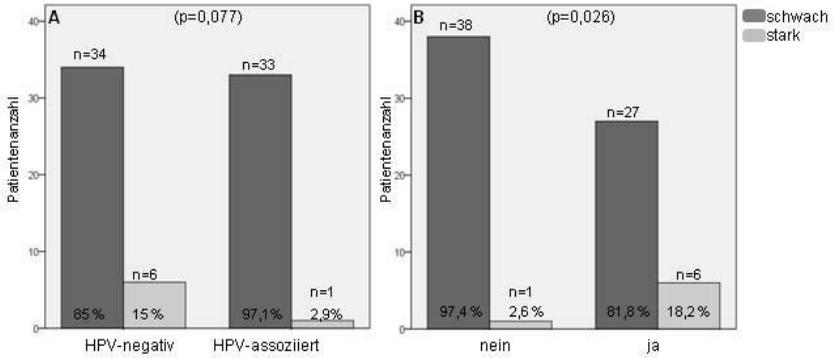


Abbildung 13: Verteilung der Färbeintensität bei verschiedenen Patienten- beziehungsweise Tumorkriterien

A: HPV-Status bei allen Patienten; B: vermehrter Alkoholkonsum ja oder nein

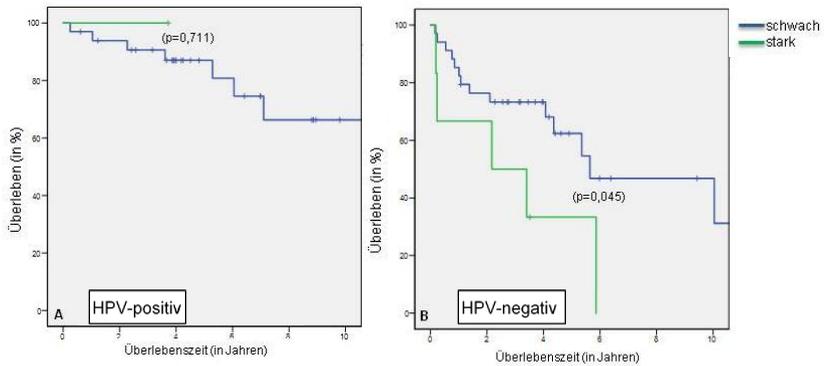


Abbildung 14: Überlebensanalysen in Anbetracht einer schwächeren oder stärkeren LDHA-Expression im Vergleich:

A: HPV-positive OSCC, B HPV-negative OSCC

Tabelle 10: Überlebensanalyse anhand der LDHA-Intensität

		LDHA-Intensität						
				HPV-negativ		HPV-positiv		
		stark	schwach	stark	schwach	stark	schwach	
	n	7	67	6	34	1	33	
Mediane Überlebenszeit (Jahre)	OS	3,4	10,0	2,1	5,6	n.d.	n.d.	
	95% CI	untere Grenz	0,2	5,9	0	1,4	n.d.	n.d.
		obere Grenz	6,6	14,2	6,0	10,0	n.d.	n.d.
	p-Wert (Log-Rank)	0,005		0,045		n.d.		
Überlebensraten	2Y-OS (95% CI) (in %)	71,4	84,9	66,7	76,4	100	93,8	
	5Y-OS (95% CI) (in %)	42,9	74,5	33,3	62,4	0	87,0	
	10Y-OS (95% CI) (in %)	0	56,1	0	46,8	0	66,3	
	HR (95%CI)	1	0,262	1	0,362	1	0,047	
	p-Wert	0,005		0,045		0,711		

* n.d. = nicht durchführbar; p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

5.4 LDHA-positive Tumorfläche

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Tumorproben zeigte sich ein quantitativer Unterschied der stark positiv gefärbten Zellen. So erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen: Die zytoplasmatisch stark LDHA-positiv gefärbte Fläche macht mehr oder weniger als 75% der gesamten Tumorfläche aus (Abbildung 15).

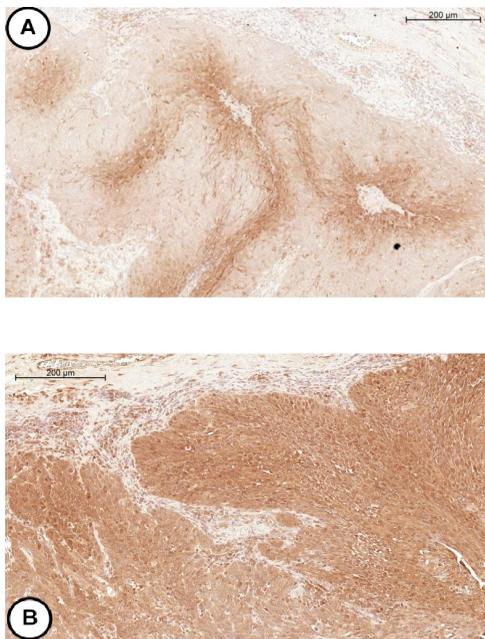


Abbildung 15: Die Ansicht der verschiedenen positiven Tumorfläche im Mikroskop
A weniger als 75 %, B mehr als 75 % stark gefärbte Tumorfläche

Es lässt sich erkennen, dass bei HPV-positiven Gewebeschnitten weniger zytoplasmatisch gefärbte Tumorfläche vorliegt (Chi-Quadrat-Test, $p=0,112$) (Abbildung 16 A). Bei der Auswertung der LDHA-positiven Fläche zeigt sich im gesamten Patientenkollektiv ein Zusammenhang mit einer vermehrten Alkoholaufnahme, nicht allerdings mit einem möglichen Nikotinabusus. Patienten mit einem erhöhten Alkoholkonsum haben signifikant häufiger über 75 % positiv gefärbte Tumorfläche (Chi-Quadrat-Test, $p=0,026$) (Abbildung 16 B). Die Auswertung des Zusammenhangs der LDHA-positiv gefärbten Tumorfläche zu einem Nikotinabusus ergab kein statistisch signifikantes Ergebnis (Chi-Quadrat-Test, $p=0,97$). Es lag sowohl bei Rauchern, als auch bei Nicht-Rauchern vermehrt eine positiv gefärbte Tumorfläche von unter 75% vor.

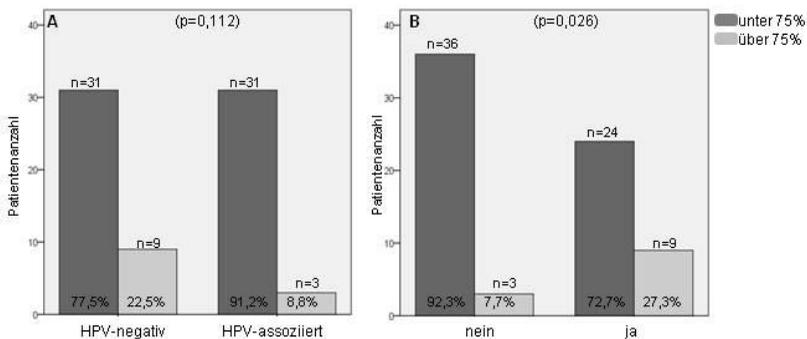


Abbildung 16: Verteilung der positiv gefärbten Tumorfläche
A: HPV-Status bei allen Patienten; B: vermehrter Alkoholkonsum ja oder nein

Bei der HPV-unabhängigen Analyse des Überlebens konnte ein geringer Unterschied dahingehend festgestellt werden, dass eine LDHA-positive Tumorfläche von unter 75% ein leicht besseres Überleben zu zeigen scheint (Log-Rank-Test, $p=0,310$). Bei der Betrachtung des Überlebens von Patienten mit einer LDHA-positiven Tumorfläche von über oder unter 75 % zeigt sich bei HPV-abhängiger Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen HPV-assoziierten OSCC und HPV-negativen Tumorproben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Überlebensanalyse anhand der LDHA-positiven Tumorfläche

LDHA-positive Tumorfläche								
				HPV-negativ		HPV-positiv		
		< 75%	> 75%	< 75%	> 75%	< 75%	> 75%	
Mediane Überlebenszeit (Jahre)	n	62	12	31	9	31	3	
	OS	11,2	5,9	5,6	5,4	n.d.	n.d.	
	95% CI	untere Grenz	4,0	4,8	1,2	0	n.d.	n.d.
		obere Grenz	18,4	6,9	10,1	11,2	n.d.	n.d.
	p-Wert (Log-Rank)	0,310		0,494		n.d.		
Überlebensraten	2Y-OS (95% CI) (in %)	83,9	85,5	74,2	77,8	93,5	100	
	5Y-OS (95% CI) (in %)	70,8	73,3	54,8	66,7	86,4	100	
	10Y-OS (95% CI) (in %)	54,0	36,7	45,6	22,2	64,0	100	
	HR (95%CI)	1	1,601	1	1,401	1	0,044	
	p-Wert	0,3		0,5		0,437		

* n.d. = nicht durchführbar; p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

5.5 LDHA-Score aus gefärbter Fläche und Intensität

Zur besseren Vergleichbarkeit mit bereits veröffentlichten Daten zu LDHA in Karzinomen unterschiedlicher Organe und zur gleichzeitigen Auswertung der von LDHA gefärbten Fläche und deren Intensität wurde aus beiden Kategorien ein Score gebildet. Die mikroskopische Auswertung der quantitativ gefärbten Tumorfläche erfolgte zunächst in vier Kategorien (bis 25 %, bis 50 %, bis 75 % und über 75 %), die Intensität der Färbung in drei Kategorien (schwach, mittel und stark). Für den Score wurden die Kategorien miteinander multipliziert, so dass eine maximale Punktzahl von zwölf erreicht werden konnte.

A LDHA-positive Tumorfläche

B LDHA-Intensität

A

Gefärbte Bereiche in %:

bis 25 % = 1 Punkt

bis 50 % = 2 Punkte

bis 75 % = 3 Punkte

über 75 % = 4 Punkte

B

Intensität der Färbung:

schwach = 1 Punkt

mittel = 2 Punkte

stark = 3 Punkte

→ $A \times B =$ maximal 12 Punkte möglich

Zunächst wurde festgestellt, dass der Medianwert des Scores bei sechs liegt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Unterteilung in einen Score ≤ 6 beziehungsweise > 6 der möglichen zwölf Punkte. In Anbetracht des HPV-Status lässt sich erkennen, dass HPV-positive OSCC bei der Untersuchung signifikant häufiger einen geringeren Score zeigen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,004$) (Abbildung 17 A). Bei Betrachtung des Scores im Zusammenhang mit dem Vorhandensein nodaler Metastasen ist erkennbar, dass bei einem hohen Score häufiger Metastasen vorliegen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,066$). Bei Patienten die unter einem erhöhten Alkoholkonsum leiden ist signifikant häufiger ein hoher LDHA-Score zu erkennen (Chi-Quadrat-Test, $p=0,002$) (Abbildung 17 B), nicht so bei einem Nikotinabusus. Es zeigt sich bei Rauchern und bei Nicht-Rauchern vermehrt ein niedriger Score, dies allerdings ohne statistische Signifikanz (Chi-Quadrat-Test, $p=0,479$).

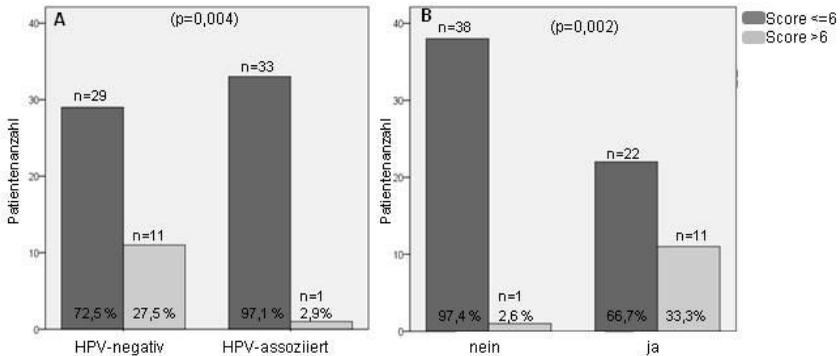


Abbildung 17: Anzahl der Patientenfälle bei der Bildung von zwei Score-Gruppen

A: HPV-abhängig; B: erhöhter Alkoholkonsum ja oder nein

Für Patienten mit einem geringen Score konnte HPV-unabhängig eine signifikant bessere Überlebenszeit festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p=0,044$) (Abbildung 18).

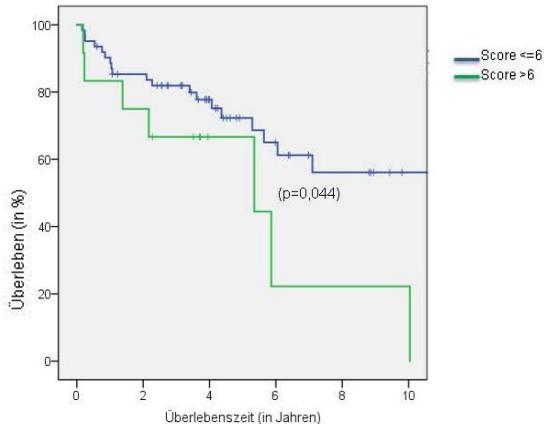


Abbildung 18: HPV-unabhängige Überlebensanalyse

Diese bessere Überlebenszeit zeigte sich HPV-unabhängig, nur bei einer Probe mit einer HPV-positiven Testung konnte ein hoher LDHA-Score gezeigt werden (siehe Kapitel 12, Tabelle 6). Bei HPV-negativen OSCC scheint die schwächere und/oder geringere LDHA-Expression mit einem kleineren Score einen Einfluss auf das Überleben zu haben (Log-Rank-Test, $p=0,344$, im Vergleich dazu bei HPV-positiven OSCC $p=0,711$) (Abbildung 19). Bei Patienten mit einem HPV-negativen OSCC ist die 5-Jahres-Überlebenszeit mit einem geringen LDHA-Score zunächst ähnlich der 5-Jahres Überlebensrate eines OSCC mit LDHA-Score >6 . Die 10-Jahres-Überlebensrate ist bei Patienten mit einem HPV-negativen OSCC und einem geringen LDHA-Score mit knapp 50% allerdings mehr als doppelt so hoch als bei HPV-negativen OSCC mit einem hohen LDHA-Score (siehe Tabelle 12).

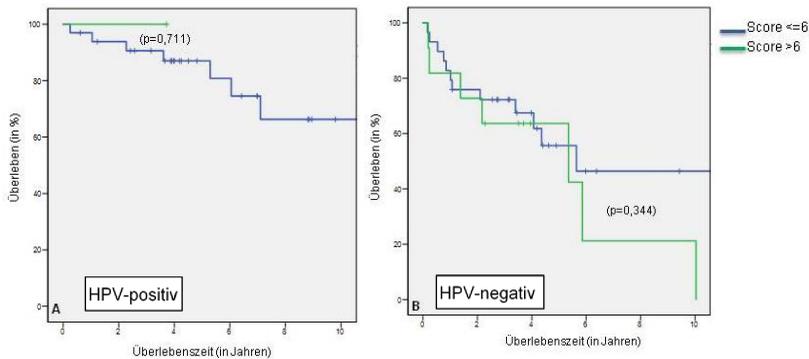


Abbildung 19: Vergleich der Überlebensanalyse in Anbetracht des HPV-Status;
 A: HPV-positive OSCC, B: HPV-negative OSCC

Tabelle 12: Überlebensanalyse anhand des LDHA-Score

		LDHA-Score						
				HPV-negativ		HPV-positiv		
		<= 6	> 6	<= 6	> 6	<= 6	> 6	
n		62	12	29	11	33	1	
Mediane Überlebenszeit (Jahre)	OS	11,2	5,3	5,6	5,4	n.d.	n.d.	
	95% CI	untere Grenz	3,3	0	0,6	0	n.d.	n.d.
		obere Grenz	19,1	11,0	10,7	11,2	n.d.	n.d.
	p-Wert (Log-Rank)	0,044		0,344		n.d.		
Überlebensraten	2Y-OS (95% CI) (in %)	85,3	75,0	75,9	72,7	93,8	100	
	5Y-OS (95% CI) (in %)	72,3	66,7	55,6	63,6	87,0	0	
	10Y-OS (95% CI) (in %)	56,1	22,2	46,4	21,2	66,3	0	
	HR (95%CI)	1	2,382	1	0,362	1	0,047	
	p-Wert	0,04		0,344		0,711		

* n.d. = nicht durchführbar; p-Wert ermittelt via Log Rank (Mantel-Cox)-Test

6. Diskussion

Ein veränderter Stoffwechsel von Tumorgewebe, dabei vorrangig die verstärkte Glykolyse der Tumorzellen, ist bereits bekannt und untersucht worden. Dabei steht zunehmend die Frage im Raum, ob dieser veränderte Glukosemetabolismus von Tumorzellen ein Ziel für die Tumorthherapie darstellen kann.

Es ist bekannt, dass Tumore durch eine hohe Glukoseaufnahme charakterisiert sind und oft eine hohe glykolytische Aktivität zeigen. Diese Eigenschaft wird bereits in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Tumordiagnostik genutzt (Ruiz Hernández et al. 2005). Anders als normale Zellen gewinnen Tumorzellen ihre Energie primär durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat unter der Nutzung von LDHA. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine erhöhte Konzentration von LDHA mit einer stärkeren Aggressivität des Tumors in Verbindung bringen. Es zeigten sich unter anderem vermehrt Rezidive, eine erhöhte Bildung von Metastasen und eine stärkere Infiltration des Tumors in umliegende Gewebe (Koukourakis et al. 2009; Rong et al. 2013).

Vorangegangene Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe Tumorforschung der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik Gießen zeigten veränderte Glykolyseparameter im PET-CT in HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen OSCC (Sharma et al. 2017). Des Weiteren zeigten HPV-assozierte HNSCC-Zelllinien eine verstärkte Aktivierung von HIF und eine Anpassungsreaktion an eine erhöhte Expression von HIF-1-alpha (Knuth et al. 2017). Auf Grund dieser Erkenntnisse untersuchten wir ob bei HPV-assozierten OSCC im Vergleich zu einer noxen-assozierten Karzinogenese ein Unterschied im Glukosemetabolismus im Bezug auf ein Schlüsselenzym der Glykolyse, LDHA, festgestellt werden kann.

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an FFPE-Gewebebeobachten durchgeführt. Diese Proben zeichnen sich durch einen guten Erhalt der morphologischen Strukturen aus. Immunhistochemische Färbemethoden sind seit Jahren etablierte Nachweisverfahren für die Darstellung von Antigenen in Gewebebeobachten (Sternberger et al. 1970; DeLellis et al. 1979). Zur immunhistochemischen Untersuchung verwendeten wir kommerziell erhältliche Färbekits, um einen Einfluss von unterschiedlicher Zusammensetzung der Substanzen möglichst auszuschließen und eine große Anzahl an Proben mit konstant gleichen Methoden untersuchen zu können.

Das als Vergleichsgewebe betrachtete „Normalgewebe“ findet sich in der Regel auf den gleichen Gewebeschnitten. Zwar wurden nur sicher vom Normalgewebe abgrenzbare Bereiche in die Auswertung mit einbezogen, trotzdem ist nicht auszuschließen, dass an das pathologisch veränderte Gewebe angrenzendes Normalgewebe bereits nicht sichtbare Veränderungen aufweist. Somit können sich unter Umständen verfälschte Werte ergeben, was es bei zukünftigen Untersuchungen bei der Wahl der Methodik und der Auswertung zu beachten gilt. Zudem erfolgte die Eingruppierung der Expression von LDHA mittels visueller Überprüfung durch das Mikroskop. Vor allem bei Grenzfällen erscheint die Einteilung der Präparate einer teilweise erheblichen Beobachter-Variabilität zu unterliegen. Trotz aller Bemühungen um Objektivität unterliegt die Auswertung immunhistochemischer Färbungen subjektiven Einflüssen und ist deshalb insgesamt als semiquantitativ zu bezeichnen. Vor allem die Quantität der stark LDHA-positiven Tumorfläche und die Farbeintensität sind Größen, welche in der mikroskopischen Betrachtung subjektiv bewertet werden könnten (Cardesi und Galliano 2013; Markaki und Harz 2017; Ryan et al. 2017). In dieser Arbeit wurden die gefärbten Tumorproben von LDHA mittels mikroskopischer Untersuchung von einer zusätzlichen Untersucherin (Frau C.B.) überprüft um größere Abweichungen in den Ergebnissen zu erkennen. Es lagen allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Einschätzung von Färberegebnissen vor. Trotz allem ist die Bestimmung objektiverer Größen im Bezug auf Farbequantität und –intensität in zukünftigen Untersuchungen wenn möglich vorzuziehen. Die Auswertung der immunenzymatischen Färbungen dieser Arbeit erfolgte mittels Lichtmikroskopie im konventionellen Durchlichtverfahren. Ein alternatives Verfahren stellt die Immunfluoreszenzfärbungen dar. Durch letzteres Verfahren gelingt die Färbung mehrerer Antigene in einem Schnitt. Der Vorteil dabei wäre eine gleichzeitige Bestimmung mehrerer biochemisch unterschiedliche Antigene eines Gewebes in ein

und demselben Analyseansatz. Andererseits klingen Fluoreszenzsignale in kurzer Zeit ab, da Fluoreszenzfarbstoffe relativ instabil sind.

Die Fallzahlen der in dieser Arbeit untersuchten Gewebe sind relativ gering, insbesondere durch die Unterteilung in HPV-positive und HPV-negative Tumorproben. Durch die immer weiter steigende Inzidenz der HPV-positiven Tumore könnten zukünftig mehr Präparate für immunhistochemische Untersuchungen genutzt werden, sodass die Ergebnisse mit höheren Fallzahlen untermauert würden. Dieser Aspekt findet ebenfalls Einfluss bei der statistischen Auswertung. Zum einen können nicht signifikante Unterschiede bedeuten, dass tatsächlich keine statistisch signifikanten Unterschiede vorhanden sind oder dass die Fallzahl zum Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds zu gering ist. Deshalb sollte bei kleineren Kohorten das Fehlen von signifikanten Unterschieden, aber vor allem auch das Vorhandensein solcher generell zurückhaltend interpretiert werden.

6.1.1 Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs

Nach der Analyse des Überlebens ergab sich für Patienten mit einer HPV-assoziierten Onkogenese ein signifikant besseres kumulatives Überleben als bei Patienten mit HPV-negativem oropharyngealem Plattenepithelkarzinom (Log-Rank-Test, $p = 0,002$). Die mediane Überlebenszeit für HPV-negative Patienten mit einem OSCC beträgt 5,64 Jahre. Für HPV-positive Patienten kann die mediane Überlebenszeit nicht ermittelt werden, da sie für den gesamten Untersuchungszeitraum bei über 50 % liegt. Die ausgewählten Patienten des Kollektivs dieser Arbeit sind Teil einer bereits 2017 veröffentlichten größeren Kohorte (Wagner et al. 2017). Auch dort zeigte sich ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit einer HPV-assoziierten Karzinogenese und einem 5-Jahres-Überleben von über 75% bei einem kurativen Therapieansatz. Dies ist stimmig mit weiteren in der Literatur veröffentlichten Daten (Gillison, M.L. 2006; Fakhry et al. 2008). In der retrospektiven Analyse von Ang et al. aus dem Jahre 2010 konnte ebenfalls ein signifikant besseres Überleben von Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC bestätigt werden. Auch in einer prospektiven Arbeit wurde dieses Ergebnisse gezeigt (Fakhry et al. 2008). Die Ursachen für diesen signifikant besseren Verlauf sind als multifaktoriell anzusehen. Unter anderem beschreiben Lindel et al. im Jahre 2001 eine günstigere Prognose aufgrund einer höheren Sensitivität gegenüber einer Therapie mit ionisierenden Strahlen. 56 der

Patienten unseres Kollektivs erhielten eine Strahlentherapie (entspricht 75,7 %, siehe Kapitel 12, Tabelle 5). Ang et al. führt den Überlebensvorteil von Patienten mit einem OSCC der UICC-Grade III und IV auf ein besseres Ansprechen auf Strahlen- und Chemotherapie und damit auf eine bessere lokoregionäre Kontrolle zurück (Ang et al. 2012).

6.1.2 LDHA-Färbemuster

Bei der Auswertung der LDHA-Expression im Gewebeschnitt wurde zunächst das Vorhandensein eines Färbemusters untersucht. Hypoxie stellt ein verbreitetes Merkmal von Tumoren dar. Ein schnelles Tumorwachstum hat eine schlechtere Gefäßversorgung und dadurch bedingt eine unzureichende Versorgung mit Sauerstoff zur Folge. Wie bereits erläutert führt diese verminderte Sauerstoffversorgung dazu, dass LDHA vermehrt exprimiert wird. Bei HPV-assoziierten oropharyngealen Karzinomen konnten wir signifikant häufiger ein Hypoxiemuster in der immunhistochemischen Färbung erkennen. Das Färbemuster in HPV-negative Tumorproben stellen sich vermehrt gleichmäßig verteilt vor. Knuth et al. konnten zeigen, dass HPV-positive HNSCC Zellkulturen eine erhöhte Expression des HPV-induzierenden-Faktors 1-alpha unter Hypoxie sowie unter Normoxie aufweisen (Knuth et al. 2017). Unter Hypoxie werden in gesunden Zellen normalerweise über HIF-1-alpha verschiedene Gene reguliert. Der Transkriptionsfaktor HIF-1-alpha steht dabei im Zentrum einer Reihe von Signalwegen. Ein hypoxisches Milieu stabilisiert den Transkriptionsfaktor. Spezifische Prolinreste des Proteins können nicht mehr hydroxyliert werden und es kommt zu einer Dimerisierung von HIF-1-alpha und HIF-1-beta. Unter Normoxie wird HIF-1-a an Prolinresten hydroxyliert. Dies führt zu einer Ubiquitinierung von HIF-1-a und dadurch zu dessen proteosomalen Degradation (siehe dazu auch Kapitel 2.4). Der Komplex aus HIF-1-alpha und HIF-1-beta wandert in den Zellkern und reguliert dort verschiedene Gene. Diese sind unter anderem in Glukoseaufnahme, Glykolyse, Laktatproduktion, pH-Regulation und Angiogenese involviert (Airley et al. 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit mit einem vermehrten Vorliegen eines Hypoxiemusters bei HPV-assoziierten OSCC bauen somit auf den bisher veröffentlichten Literaturergebnissen auf.

Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ließ sich bei größeren Tumoren (T3) signifikant häufiger ein Hypoxiemuster in der Färbung erkennen. Der Sauerstoffbedarf von Tumorzellen wächst stetig mit der Zunahme der Tumorgroße. Wächst der Tumor dabei zu schnell, kann der erhöhte Sauerstoffbedarf nicht mehr gedeckt werden und es kommt zu einer lokalen Hypoxie. Durch die Hypoxie kommt es erwartungsgemäß zu einer Aktivierung von hypoxie-induzierbaren Faktoren wie zum Beispiel HIF-1-alpha und damit zur Erhöhung des Glukosemetabolismus (Semenza, G.L. 2003; Mohamed et al. 2004). Aus diesem Grund wurden Tumoren größer T3 auch nicht in das Patientenkollektiv mit aufgenommen.

Des Weiteren konnte im Bezug auf das Alter der Patienten ein Unterschied in der statistischen Auswertung erkannt werden. Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigten in der immunhistochemischen Färbung häufiger ein Hypoxiemuster als jüngere Patienten. Durch altersbedingte Veränderungen in den Bereichen des respiratorischen und des Herz-Kreislauf-Systems lässt sich ein Anstieg von hypoxischen Gewebearealen erklären. Die verminderte Lungenparenchymsteifigkeit führt zu einem erhöhten Risiko für eine generelle Hypoxie und eine altersbedingt verminderte zerebrale Ansprechbarkeit auf CO₂ und Hypoxie erhöht die Inzidenz einer allgemeinphysiologischen Hypoxie (Kochs et al. 2008). Das maximal erreichbare Atemminutenvolumen fällt im Alter ab. Hollmann und Hettinger diskutieren als Ursache des verminderten Atemminutenvolumens zusätzlich eine limitierende Rolle seitens physiologischer Altersveränderungen in den Luftwegen und einer relativen Hypoventilation, hervorgerufen durch die erhöhte CO₂-Sensibilitätsschwelle (Hollmann und Hettinger 2000). Mit zunehmender Lebensdauer vermindert sich sowohl die maximal erreichbare Herzfrequenz, als auch die Höhe des Schlagvolumens. Die Reduktion des Schlagvolumens wird auf eine verringerte Kontraktilität und Elastizität des Herzmuskels zurückgeführt (Weisser et al. 2003). Die beschriebenen Effekte des Alterns auf die Körperfunktionen und eine dadurch bedingte erhöhte Inzidenz für eine Hypoxie können das vermehrt aufgetretene Hypoxiemuster in der immunhistochemischen Färbung von LDHA erklären.

Bei der Auswertung untersuchten wir zudem das LDHA-Färbemuster bei Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei Patienten mit Nikotinabusus, als auch bei solchen mit erhöhtem Alkoholkonsum häufiger der uniforme Färbetyp von LDHA vorkommt. Bei Rauchern ist dieses Ergebnis statistisch signifikant, bei Gewebeproben von Patienten mit erhöhtem Alkoholkonsum erreicht der Unterschied kein statistisch signifikantes Resultat.

Der Abbau des Alkohols gliedert sich in drei Schritte:

1. Oxidation von Alkohol zu Acetaldehyd
2. Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat
3. Aktivierung von Acetat durch Acetyl-CoA und Oxidation im Tricarbonsäure-Zyklus zu CO₂ und Wasser

Für den ersten Schritt benötigt die Zelle als Enzym die Alkoholdehydrogenase (ADH). ADH benötigt für die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd das Co-Enzym NAD als Reduktionspartner. NAD wird dabei zu NADH umgewandelt. Die Produktion von NADH während des Alkoholabbaus kann den Redoxstatus der Zelle verändern. Dieser lässt sich direkt durch das NADH+H⁺/NAD⁺-Verhältnis charakterisieren (Mitka, M. 2005). Wenn bei einer hohen Konzentration von Ethanol viel NADH anfällt, verändert sich unter anderem das Gleichgewicht von Pyruvat und Laktat, der Pyruvat/Laktat-Quotient wird zugunsten von Laktat verschoben (Batra et al. 2010). Durch den Anstieg des Laktat müsste folglich auch ein erhöhter Umbau zu Pyruvat durch LDHA erfolgen, so dass die Expression von LDHA unter Alkohol erhöht sei. Es lässt sich allerdings kein Zusammenhang zu einem bestimmten Färbemuster beziehungsweise einer veränderten Expression von Parametern des Glukosemetabolismus in Tumorzellen erkennen und auch in der Literatur nicht finden.

Ähnlich verhält es sich bei Patienten mit einem Nikotinabusus. Zigarettenrauch sorgt für die Freisetzung von Sauerstoffradikalen von bronchialen und alveolären Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten. Diese Sauerstoffradikale sorgen für einen sogenannten oxidativen Stress innerhalb einer Zelle. Oxidativer Stress ist mitverantwortlich für den nekrotischen Zelluntergang, welcher wiederum zur Freisetzung von LDHA führt (Batra et al. 2010). Hier lässt sich weder in der bereits veröffentlichten Literatur noch bezüglich unserer Ergebnisse ein Zusammenhang zu einem bestimmten LDHA-Färbemuster finden.

6.1.3 LDHA-Intensität

Bei der Betrachtung des HPV-Status und der Färbeintensität zeigt sich in dieser Arbeit, dass bei HPV-assoziierten Tumorzellen LDHA schwächer exprimiert ist. Dies deckt

sich mit den vorangegangenen Ergebnissen, dass bei HPV-positiven OSCC LDHA auch quantitativ weniger gebildet wurde.

Wie im vorherigen Kapitel bereits gezeigt, entspricht dies nicht den veröffentlichten Forschungsergebnissen von anderen Arbeitsgruppen. Allerdings gibt es bisher auch noch keine Veröffentlichung über die genaue Untersuchung von LDHA bei HPV-assoziiertem Tumorigenese. Alle Studien untersuchten entweder den generell veränderten zellulären Tumorstoffwechsel unter HPV oder den Einfluss der LDHA-Expression auf die Tumorentwicklung, die Metastasierung oder das Überleben der Zellkulturen oder Patienten ohne Einbeziehung des HPV-Status. Dadurch ist es schwer, die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studiengruppen zu vergleichen.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit war, dass bei keiner der weiblichen Patienten ($n = 21$, dies entspricht 28,4% des Kollektivs) eine starke LDHA-Expression festgestellt werden konnte und Patientinnen mit einem OSCC ein besseres Überleben zeigten. Es ist zudem der prognostische Vorteil des weiblichen Geschlechts im Bezug zur LDHA-Expression und der Annahme der daraus resultierenden besseren Prognose aufgefallen (siehe Kapitel 12, Tabelle 5). Das Geschlecht ist ein in der Literatur oft betrachteter Prognosefaktor. So hat eine Vielzahl von Autoren das weibliche Geschlecht als prognostisch relevanten Faktor zum Beispiel für das Lungenkarzinom gefunden (Harpole et al. 1995; Muley et al. 2004; Sawabata et al. 2004; Kobayashi et al. 2007; Sawabata et al. 2007). Im Gegensatz dazu gibt es ebenso einige Autoren, die diesen Zusammenhang nicht zeigen konnten (Suzuki et al. 2007, Moro et al. 1995; Bréchet et al. 1997). Warum dies genau der Fall ist, lässt sich auch durch eine umfassende Literaturrecherche nicht erklären. So konnte auch die Arbeitsgruppe um Arriarán keinen Zusammenhang zum Geschlecht zwischen einer erhöhten LDHA-, LDHB- oder Laktatproduktion in einem Tierexperiment herstellen (Arriarán et al. 2015). Somit kann auch in dieser Arbeit nur konstatiert werden, dass das Geschlecht ein wesentlicher Prognosefaktor zu sein scheint.

Ein in der vorliegenden Arbeit untersuchter Faktor war außerdem der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes und eine mögliche Assoziation zu einer veränderten LDHA-Expression. Gesundes Plattenepithel besteht aus organotypisch differenzierten Zellen, wohingegen Zellen von bösartigen Tumoren mehr oder weniger stark ent- oder undifferenziert sind. Gut differenzierte Tumoren haben somit eine hohe Ähnlichkeit zum Ausgangsgewebe. Je höher der Differenzierungsgrad der Zellen, sprich je niedriger die Grading-Stufe, desto langsamer und weniger aggressiv ist das

Wachstum des Tumors. Es wäre zu erwarten gewesen, dass Tumore mit einem hohem Differenzierungsgrad keine beziehungsweise nur eine geringfügig veränderte LDHA-Expression verglichen mit Normalgewebe vorweisen. In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich allerdings eine signifikant verstärkte LDHA-Intensität bei gut differenzierten Gewebeschnitten. Dazu ließen sich in der Literatur leider keine vergleichbaren Untersuchungen finden. Die Ergebnisse diesbezüglich lassen sich somit nicht in einen weiterführenden Kontext bringen.

Auch bei der Auswertung der Expressionsstärke von LDHA wurde der Zusammenhang zu externen Noxen untersucht. Es zeigt sich, dass sich auch bei der Intensität OSCC-Gewebeschnitte von Patienten mit einem erhöhten Alkoholkonsum signifikant häufiger eine starke LDHA-Expression aufzeigen. Dies lässt sich ebenfalls mit den im folgenden Kapitel erläuterten Punkten zu einer vermehrten LDHA-Expression von über 75% bei Patienten mit einem erhöhten Alkoholkonsum erklären.

Des Weiteren konnte bei Patienten mit einer schwachen LDHA-Expression unabhängig des HPV-Status ein signifikant besseres Überleben festgestellt werden. Diverse Studien zeigen, dass eine verringerte Expression von LDHA mit einem geringeren Tumorwachstum assoziiert ist. So wurden Tumorzellen einem LDHA-Knockdown unterzogen. Resultat war eine Steigerung der Zellatmung in den Mitochondrien, eine Reduktion der Proliferation unter hypoxischen Bedingungen sowie ein verzögertes Tumorwachstum in vivo (Fantin et al. 2006). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein Knockdown von LDHA in vitro mit einer geringeren Proliferation und Invasion assoziiert war. Die entsprechenden in vivo Daten zeigten ein langsames Wachstum von Primärtumoren und eine verzögerte Metastasierung (Rizwan et al. 2013). Eine geringere Expression von LDHA scheint mit einem geringeren Tumorwachstum zu korrelieren. Zudem konnte in vitro eine Steigerung der mitochondrialen Aktivität gezeigt werden (Xie et al. 2014). Ein Knockdown von LDHA führt zu einer dramatischen Verringerung des Tumorzellwachstums. Eine erhöhte LDHA-Expression führt zu vermehrten Metastasen und ein erhöhtes Level von LDHA sei verantwortlich für ein schlechteres Überleben (Koukourakis et al. 2009; Miao et al 2013; Rong et al. 2013). All diese Studien unterstreichen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass eine schwache LDHA-Expression mit einer verbesserten Überlebensrate korreliert. Nur einer der insgesamt sieben Patienten mit einer starken LDHA-Expression hat ein Überleben von über fünf Jahren. Bei einer schwachen Intensität liegt die 10-Jahres-Überlebenszeit bei über der Hälfte. Es scheint weiterhin so zu sein, dass die LDHA-Expression vor allem bei HPV-negativen Patienten einen Einfluss auf das Überleben

hat. Allerdings hat nur einer der HPV-positiven Patienten eine starke Intensität innerhalb des Tumornestes gezeigt.

6.1.4 LDHA-positive Tumorfläche

Bei der Untersuchung der HPV-assoziierten und der HPV-negativen Tumorproben lässt sich erkennen, dass bei HPV-positiven Gewebeschnitten weniger zytoplasmatisch gefärbte Tumorfläche vorliegt. Dies ist insofern interessant, da wie bereits beschrieben bei HPV-positiven HNSCC HIF-1-alpha stabilisiert wird und über eine Dimerisierung mit HIF-1-beta regulatorische Funktionen im Zellkern übernimmt. Über diesen Komplex wird unter anderem die Expression von LDHA induziert. In der Literatur findet sich ein Zusammenhang zwischen HPV und LDHA: Eine Herabregulation des HPV-Onkoproteins E6 führt zu einer reduzierten Expression von LDHA (Zhang et al. 2016). Auch daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei HPV-assoziierten OSCC LDHA generell vermehrt exprimiert werden sollte als bei HPV-negativen Karzinomen. Dies ist in dieser Arbeit nicht der Fall, unabhängig davon welches Färbemuster (uniform oder Hypoxiemuster) vorliegt.

Die Arbeitsgruppen um Walenta fanden bei Biolumineszenzmessungen erhöhte Laktatspiegel in malignen Tumoren des Zervixkarzinoms, Kolonkarzinoms sowie Tumoren des Kopf- und Halsbereichs, jedoch nicht in umliegendem Normalgewebe (Walenta et al. 2000; Walenta et al. 2004). Eine immunhistochemische Untersuchung von Koukourakis et al. zeigte im Lungenkarzinom und im kolorektalen Adenokarzinom eine erhöhte Expression der LDHA, die mit erhöhter Aggressivität und Invasivität der Tumore korrelierte (Koukourakis et al. 2003; Koukourakis et al. 2006). Weiterhin konnte in vivo im Serum von Patienten mit Brust- und Ovarialkarzinomen eine erhöhte LDH-Konzentrationen unabhängig eines möglichen HPV-Status gemessen werden (Koukourakis et al. 2009). Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die LDHA-Expression im Tumorgewebe immer höher war als im umliegenden, als gesund anzusehendem, Gewebe.

Größere Tumore zeigen durch ihr schnelles Wachstum im Vergleich zum umliegenden Gewebe ein vermehrtes Maß an intratumoraler Hypoxie. Der dieser Arbeit zugrunde liegenden These, dass eine HPV-bedingte Stabilisation von HIF-1-alpha und ein

dadurch für die Zelle „simuliertes“ hypoxisches Milieu die Expression von LDHA fördert, passt zu der ausgewerteten vermehrten Expression von LDHA bei größeren Tumoren. Das Auftreten von spezifischen Färbemustern allerdings ließ sich nicht vorhersehen. Es lag zunächst die Annahme zugrunde, dass sich durch eine vermehrte Expression von LDHA ein gleichmäßiges Expressionsmuster in allen HPV-positiven Gewebeproben darstellt. In 44% der in dieser Arbeit untersuchten HPV-positiven Gewebeproben findet sich allerdings anstatt einer uniformen Färbung ein Hypoxiemuster. Dies ist allerdings nicht alleinig auf das Vorhandensein einer HPV-assoziierten Karzinogenese zurückzuführen. Auch HPV-negative Gewebeproben zeigten in dieser Arbeit in 9 von 40 Fällen ein Hypoxiemuster. Des Weiteren ist es so, dass auch HPV-positive Gewebeschnitte nicht in jedem Fall ein Hypoxiemuster zeigten (uniforme Färbung in 19 von 34 Fällen). Dies kann sich dadurch erklären lassen, dass eine Hypoxie ein verbreitetes Merkmal von Tumoren ist (schnelles Tumorwachstum führt zu einer schlechteren Gefäß- und Sauerstoffversorgung). Wie bereits erläutert führt diese verminderte Sauerstoffversorgung dazu, dass LDHA auch HPV-unabhängig vermehrt exprimiert werden kann.

Dass eine erhöhte LDHA-Expression mit Metastasierung und schlechter Prognose korreliert, konnte von Walenta et al. im Zervixkarzinom (Walenta et al. 2000) und von Koukourakis et al. im Kolon- und Lungenkarzinom nachgewiesen werden (Koukourakis et al. 2006; Koukourakis et al. 2007). Dies konnte auch eine weitere Veröffentlichung aus dem Jahre 2017 bestätigen. Dort korrelierte eine Aktivierung von LDHA ebenfalls mit einer verstärkten Metastasierung (Jin et al. 2017). Eine weitere große Studie um LDHA veröffentlichten Miao et al. im Jahre 2013. Diese zeigte eine Zunahme von Lungenmetastasen bei einer erhöhten LDHA-Expression von 66,7%. Die Anzahl von Lungenmetastasen in der Gruppe ohne LDHA war um das 10-fache verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Miao et al. 2013).

Weiterhin ließ sich in der hier vorliegenden Arbeit bei der Auswertung der LDHA-positiven Fläche ein Zusammenhang mit einem Alkoholabusus feststellen. Patienten mit einer erhöhten Alkoholaufnahme haben signifikant vermehrt eine positiv gefärbte Tumorphäche von über 75 %. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben sind durch Alkohol bedingte Stoffwechselstörungen auf den erhöhten $NADH+H^+ / NAD^+$ -Quotienten zurückzuführen. Dadurch bedingt wird Pyruvat verstärkt in Laktat umgewandelt und dem entsprechend muss vermehrt LDHA bereitgestellt werden. Dieses Ergebnis der immunhistochemischen Färbung stimmt somit mit der bereits

veröffentlichten Datenlage über LDHA bei vermehrter Zunahme von Alkohol überein (Mitka M. 2005; Batra et al.2010).

Bei der Betrachtung des Überlebens von Patienten mit einer LDHA-positiven Tumorfläche von über oder unter 75 % zeigt sich kein Unterschied zwischen HPV-assoziierten OSCC und HPV-negativen Tumorproben. Lediglich bei der HPV-unabhängigen Analyse des Überlebens konnte ein Unterschied dahingehend festgestellt werden, dass eine größere LDHA-positive Tumorfläche mit einem leicht verbesserten 5-Jahres-Überleben zu korrelieren scheint. Hier stellt sich erneut ein Unterschied zu bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Studien dar. Ein erhöhter LDH-Spiegel sei ein Prognosefaktor für ein schlechteres Überleben (Miao et al. 2013). Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das gebildete Laktat selbst einen Einfluss auf erhöhte Sterblichkeit, Progression und auf die Bildung von Metastasen hat (Gillies et al. 2008). Auch bei der Untersuchung um die Arbeitsgruppe Huang et al. aus dem Jahre 2016 zeigte sich eine signifikante Korrelation von der vermehrten LDHA-Expression zu einem Anstieg der Anzahl von gebildeten Metastasen und der Verschlechterung der Überlebensrate (Huang et al. 2016). Daraus ergibt sich ebenfalls ein verringertes Überleben bei verstärkter LDHA-Expression gegenüber Patienten mit einer geringeren LDHA-Produktion. Allerdings findet sich dies auch in unseren Ergebnissen bezüglich der 10-Jahres-Überlebensrate wieder, sodass sich alleinig aus der quantitativ positiv gefärbten LDHA-Fläche kein Rückschluss auf ein besseres, respektive schlechteres Überleben ziehen lässt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Vergleich mit der Literatur sind auch dahingehend interessant, dass die zu untersuchende Theorie von einer erhöhten LDHA-Expression bei hypoxischem intrazellulärem Milieu durch eine HPV-Assoziation nicht bestätigt werden konnte. Patienten mit HPV-assoziierte OSCC zeigen bei unserer Untersuchung allerdings ein verbessertes Überleben, welches mit der Literatur übereinstimmt (Klussmann et al. 2009; Ang et al. 2010). Im Bezug auf eine verändertes Überleben im Zusammenhang mit einer veränderten LDHA-Expression kann rein für eine quantitativ LDHA-positive Tumorfläche keine abschließende Aussage getroffen werde. Dazu werden in Zukunft mehr Studien nötig sein.

6.1.5 LDHA-Score aus gefärbter Fläche und Intensität

In der Medizin versteht man unter einem Score einen Punktwert, welcher sich aus verschiedenen Parametern zusammensetzt. Dadurch kann sich über ein Forschungsergebnis oder auch eine Diagnose schnell ein Überblick verschafft werden, ohne zunächst viele Details auswerten zu müssen. Zudem dienen Scoresysteme auch der statistischen Erfassung vieler Daten. Im klinischen Alltag evaluiert man über gebildete Scores Verletzungs- oder Dysfunktionsschweregrade, Verlaufbeurteilungen oder mögliche Therapieverfahren. Allerdings können aus Scoreergebnissen nicht uneingeschränkt therapeutische Konsequenzen gezogen werden. Es gilt zu berücksichtigen, dass ein Scoresystem als Messverfahren auch systemischen Fehlern oder Störfaktoren unterliegt, da ein bestimmter Scorewert auf unterschiedliche Weise zustande kommen kann. Ein Punktwert kann sich durch mehrere geringe Einzelparameter oder aber durch wenige gravierende Abweichungen zusammensetzen. Scores oder Punktwerte sind daher nur als Hilfsmittel und Näherungswerte für ein Forschungsergebnis oder eine Diagnose anzusehen. Ein Vorteil von Scoresystemen ist deren gute Vergleichbarkeit bei Forschungsarbeiten, zumindest dann wenn ähnliche Punktwerte verwendet werden.

In dieser Forschungsarbeit gibt ein hoher Scorewert eine vermehrte LDHA-Expression und/oder starke LDHA-Intensität wieder. Es wurden die LDHA-Intensität und die LDHA-positiv gefärbte Fläche miteinander kombiniert und multipliziert, so dass eine maximale Punktzahl von zwölf vorliegen konnte. Demnach spiegelt sich eine Aktivierung des Glukosemetabolismus über LDHA in einem hohen Score wieder.

Es ließ sich zeigen, dass entgegen der Anfangshypothese bei HPV-positiven OSCC signifikant häufiger niedrige Score-Werte vorliegen. Bei Betrachtung des Score im Zusammenhang mit dem Vorhandensein nodaler Metastasen ist erkennbar, dass bei einem großen Score häufiger solcher Metastasen vorhanden sind. Erneut zeigt sich, dass in den Gewebeproben von Patienten mit einer erhöhten Alkoholaufnahme signifikant häufiger ein großer LDHA-Score zu erkennen ist. Für Patienten mit einem geringen Score konnte eine signifikant bessere Überlebenszeit beobachtet werden. Nur eine HPV-positive Gewebeprobe zeigte einen großen Score, sodass hierbei auf das Überleben keine Rückschlüsse gezogen werden konnten.

Leider findet sich in der aktuellen Literatur bisher keine vergleichbaren Scoresysteme bezogen auf LDHA. Forschungen des Glukosemetabolismus könnten zukünftig gehäuft auch in Scoresystemen ausgewertet werden, um vor allem auch international

Ergebnisse besser vergleichen zu können. Betrachtet man die beiden Einzelkomponenten des Scores, so sind die Ergebnisse der Scoreauswertung dahingehend mit den Erkenntnissen der vorherigen Kapiteln passend, dass eine verringerte beziehungsweise weniger intensive LDHA-Expression vor allem bei HPV-positiven Gewebeproben und bei Patienten mit einem besseren Überleben vorliegen. Zudem ist ein großer Score verknüpft mit einer starken und/oder hohen Expression und findet sich bei Tumorproben von Patienten mit einer vermehrten Alkoholaufnahme.

6.2 Therapeutische Bedeutung

Seit langem wird versucht, den Warburg-Effekt therapeutisch zu nutzen. Inhibitoren der Schlüsselenzyme der Glykolyse wie der Hexokinase, der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase sind in Zellkulturen und teilweise auch im Tierversuch getestet worden (Jang et al. 2013; Elf und Chen 2014). Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit stellen LDHA als einen interessanten Ansatzpunkt für die Tumorthherapie dar. Vor allem für Patienten bei denen ein chirurgischer Therapieansatz (zunächst) nicht in Frage kommt oder bei denen eine vollständige Tumoresektion nicht durchführbar ist, könnte eine Beeinflussung des LDHA-Metabolismus eine vielversprechende Alternative sein.

Ein in der Literatur untersuchter Inhibitor von LDHA ist Dihydroxynaphthoinsäure. Gemeinsam mit Oxamat, ebenfalls einem LDH-Inhibitor, konnte bei Mammakarzinomen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Auch Dichloracetat, bekannt aus der Behandlung der Laktatazidose, wurde im Zusammenhang mit Tumoren mit erhöhter Laktatproduktion untersucht. Im Zellkulturmodell mit oralen Plattenepithelkarzinomlinien konnte eine Apoptoseinduktion beziehungsweise ein Proliferationsstop beobachtet werden (Jang et al. 2013; Ruggieri et al. 2015).

Das in Tumorzellen gebildete Laktat wird mit einer Änderung des Migrationsverhaltens von Tumor- und Immunzellen in Zusammenhang gebracht (Hirschhaeuser et al. 2011; Arseneault et al. 2013; Seliger et al. 2013). In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass Laktat inhibitorische Effekte auf Immunzellen hat (Gottfried et al. 2006; Fischer et al. 2007; Dietl et al. 2010). Diese Daten deuten darauf hin, dass die verstärkte LDHA-

Expression von Karzinomen die Infiltration von T-Zellen negativ beeinflussen kann. Eine verringerte Glukosekonzentration, hervorgerufen durch die verstärkte Glukoseaufnahme des Tumors, könnte die Infiltration von T-Zellen im Tumormilieu modulieren, da T-Zellen zur Aktivierung und Proliferation erhöhte Mengen an Glukose benötigen (Cham und Gajewski 2005). Ein Eingreifen in den Glukosemetabolismus als therapeutisches Ziel könnte hier sowohl die Tumormalignität verringern, als auch die T-Zellaktivierung begünstigen. Darüber hinaus könnte nach Zhou et al eine Verringerung der Laktatsekretion den Tumor sensibler für Chemo- und Immuntherapien machen (Zhou et al. 2010). Des Weiteren stellten Koukourakis et al. fest, dass glykolytische Tumorzellen auch Tumor-assoziierte Fibroblasten modulieren (Koukourakis et al. 2007). All diese Beobachtungen machten den Glukosemetabolismus von Tumoren zu einem interessanten Ziel für die Tumortherapie. Die Arbeitsgruppe um Bonnet et al. zeigte in vivo mittels eines Rattenmodells, dass das Tumorwachstum mit Dichloracetat durch Hemmung der Glykolyse inhibierbar ist (Bonnet et al. 2007). In deren Arbeitsmodell bekamen Ratten zunächst Tumorzellen subkutan injiziert und anschließend wurde über mehrere Wochen Dichloracetat oral über das Trinkwasser verabreicht. Diese Tiere entwickelten wesentlich kleinere Tumore als die Kontrollengruppe. Die Auswirkung einer inhibierten LDHA-Expression konnten Xie et al. an Nierenkarzinomzellen in einem Modell zeigen. Aufgrund einer Mutation im Gen für die Bildung der Fumarathydase, welche wie HPV zu einer Stabilisation von HIF-1-alpha führt, wird in den Tumorzellen vermehrt LDHA exprimiert. Hier führte eine Inhibition der LDHA zu einem verringerten Wachstum der Tumorzellen in vitro sowie auch in vivo (Xie et al. 2009).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Beeinflussung des Glukosemetabolismus bezogen auf LDHA in vitro und auch teilweise bereits in vivo am Rattenmodell gute und vielversprechende Ergebnisse für die Tumortherapie darstellt. Dieser Ansatzpunkt müsste nach den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen über LDHA für eine HPV-assoziierten Tumorgenese noch erweitert und untersucht werden, um in Zukunft einen möglichen weiteren Therapieansatz generieren zu können.

7. Zusammenfassung

Eine HPV-assoziierte Karzinogenese gilt als günstiger Prognosefaktor bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus nimmt Einfluss auf den Zellmetabolismus und interagiert auch unter Normoxie mit dem sonst nur unter hypoxischen Bedingungen stabilisierten Hypoxie-induzierten Faktor 1-alpha. Dieser dimerisiert und wandert in den Zellkern der betroffenen Zelle. Dort werden verschiedene Gene des Zellmetabolismus und –zyklus reguliert, unter anderem betroffen ist dabei der Glukosemetabolismus mit seinen Glukosetransportern (GLUT) und Enzymen (zum Beispiel LDHA). Dieser Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass die HPV-induzierte Veränderung des Glukosemetabolismus zu einer erhöhten Expression der Laktatdehydrogenase A führt.

Die Überprüfung dieser Anfangshypothese erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung von insgesamt 74 Gewebeproben mit oder ohne HPV-assoziiertes Onkogenese. Die ausgewählten Patienten stammten allesamt aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen und befanden sich während eines Zeitraums vom 01.01.2000 bis zum 31.12.2016 dort in Behandlung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein verringertes Überleben von Patienten deren Gewebeproben eine starke und/oder quantitativ hohe LDHA-Expression aufwiesen. Dies spiegelt die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen über LDHA und die Auswirkungen auf Tumorzellen und Überlebensraten von Patienten wieder. In der Literatur lassen sich bisher aber nur sehr wenige Zusammenhänge zwischen LDHA und einer HPV-assoziierten Karzinogenese finden. Dahingehend können unsere Ergebnisse einen neuen Ansatzpunkt für weitere Forschungen in dieser Richtung sein. Die Vermutung einer verstärkten Bildung von LDHA bei einer HPV-assoziierten Onkogenese ließ sich nicht in jedem Punkt bestätigen. Bei HPV-positiven Tumorproben konnte immunhistochemisch zwar häufiger ein Hypoxiemuster erkannt werden, allerdings war LDHA schwächer und quantitativ geringer exprimiert. Deutlich zeigte sich allerdings eine vermehrte LDHA-Expression in Gewebeproben bei erhöhtem Alkohol- und /oder Nikotinkonsum von Patienten des Kollektiv.

Da die LDHA-Expression, sowie die HPV-assoziierte Onkogenese von OSCC einen interessanten Ansatz für Therapiemaßnahmen bilden, sollten zukünftig weitere

Untersuchungen in diesem Bereich erfolgen. Dabei sind vor allem weiterführend der Zusammenhang einer HPV-assoziierten Tumorentwicklung und der LDHA-Expression interessant. LDHA stellt ein potentielles und vielversprechendes Ziel für die antitumorale Therapie dar. Trotz der großen Anzahl pharmakologisch möglicher Inhibitionswege und verschiedener Untersuchungen für LDHA-Inhibitoren in vitro, konnten nur wenige LDHA-inhibitorische Pharmazeutika klinisch überprüft werden. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen für klinisch relevante und zukünftig auch nutzbare Therapeutika nötig, die auch eine mögliche virale Karzinogenese in der Forschung berücksichtigen.

8. Summary

HPV-associated carcinogenesis is considered a favorable prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinoma. Infection with the human papillomavirus influences the cell metabolism and the hypoxia-induced factor 1-alpha, which is otherwise stabilized only under hypoxic conditions. HIF-1-alpha dimerizes and migrates to the nucleus of the affected cell. There, various genes of cell metabolism and cell cycle are regulated, i.a. glucose metabolism with its glucose transporters (GLUT) and enzymes (e.g. LDHA) is affected. This work is based on the assumption that HPV-induced changes in glucose metabolism lead to increased expression of lactate dehydrogenase A.

The examination of this initial hypothesis was carried out by immunohistochemical staining of a total of 74 tissue samples with or without HPV-associated oncogenesis. The selected patients all came from the Department of Otolaryngology of the University Hospital of the Justus Liebig University in Giessen and were there in treatment for a time period between 01/01/2000 and 12/31/2016.

The results of this work show a reduced survival of patients with tissue samples showing a strong and/or quantitatively high LDHA expression. This reflects the findings of other groups on LDHA and its impact on tumor cells and patient survival. However, in the literature only very few correlations between LDHA and HPV-associated carcinogenesis can be found so far. In this regard, our results may be a new starting point for further research in this direction. However, our assumption of increased formation of LDHA in HPV-associated oncogenesis could not be confirmed in all aspects. In HPV-positive tumor samples a hypoxia pattern was more frequently detected immunohistochemically, but LDHA-staining intensity was weaker and in area quantitatively less expressed. LDHA expression was significantly increased in tissue samples of patients with increased alcohol and/or nicotine consumption in our collective.

Since the LDHA expression as well as the HPV-associated oncogenesis of OSCC constitutes to be an interesting approach for therapeutic measures, further investigations in this area should be carried out in the future. In particular, the context of HPV-associated tumor development and LDHA expression are interesting. LDHA represents a potential and promising target for antitumoral therapy. Despite the large

number of pharmacologically possible inhibition pathways in vitro and various assays for LDHA inhibitors, few LDHA inhibitory pharmaceuticals have been clinically evaluated. In this regard, further investigations are needed for clinically relevant and in the future also usable therapeutics, which also consider possible viral carcinogenesis in research.

9. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex (<i>englisch</i>), deutsch „Avidin-Biotin-Komplex“
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ADH	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-Dependent Kinases (<i>englisch</i>), deutsch „Cyclin-abhängige-Kinasen“
CI	Confidence Interval (<i>englisch</i>), deutsch „Konfidenzintervall“
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (<i>englisch</i>), deutsch DNS für „Desoxyribonukleinsäure“
dsDNA	Double-stranded Deoxyribonucleic Acid (<i>englisch</i>), deutsch „doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure“
e.g.	exempli gratia (<i>lateinisch</i>), bedeutet auf Englisch „for example“, deutsch „zum Beispiel“
E2F	E2-Faktor
E6-AP	E6-Associated Protein (<i>englisch</i>), deutsch „E6-assoziiertes Protein“
F-FDG	F-Fluordesoxyglukose
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue (<i>englisch</i>), deutsch „Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe“
GLUT	Glukosetransporter
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1-α	Hypoxie-Induzierender-Faktor-1-alpha
HNO	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (<i>englisch</i>), deutsch „Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom“
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
i.a.	inter alia (<i>lateinisch</i>), deutsch „unter anderem“
IARC	International Agency for Research on Cancer
Inc.	Incorporated (<i>englisch</i>), für „Incorporated company“, deutsch „eingetragene Aktiengesellschaft“
LCR	Long Control Region (<i>englisch</i>), deutsch „lange Kontrollregion“
LDH	Laktatdehydrogenase

M.	Musculus (<i>lateinisch</i>), deutsch „Muskel“
MCT1	Monocarboxylattransporter 1
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog (<i>englisch</i>), deutsch „Doppel-Minute-2-Homolog der Maus“
µm	Mikrometer
NCR	Noncoding Region (<i>englisch</i>), deutsch „nicht kodierende Region“
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
n.d.	nicht durchführbar
nm	Nanometer
OSCC	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma (<i>englisch</i>), deutsch „oropharyngeales Plattenepithelkarzinom“
PCR	Polymerase Chain Reaction (<i>englisch</i>), deutsch „Polymerasekettenreaktion“
PHD	Prolylhydroxylase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pRb	Retinoblastomprotein
RCT	Radio-Chemotherapie
RKI	Robert-Koch-Institut
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween20
TNM	T = Tumor, N = Nodus (<i>lateinisch</i> Nodus lymphoideus, deutsch „Lymphknoten“), M = Metastasen
TRS	Target Retrieval Solution
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (<i>französisch</i>), deutsch „Internationale Vereinigung gegen Krebs“
URR	Upstream regulatory region (<i>englisch</i>), deutsch „vorgelagerte regulatorische Region“
UV	Ultraviolette Strahlung
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
VHL-Gen	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen
ZfKD	Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus	2
Abbildung 2: Aufbau eines HPV-Genoms mit seinen Abschnitten	3
Abbildung 3: Die Wirkung von E6 und E7 und ihre Beeinflussung auf den Zellzyklus...	7
Abbildung 4: Die chemische Reaktion von Pyruvat zu Laktat	17
Abbildung 5: Warburg Effekt.....	19
Abbildung 6: Der Abbau von HIF-1-alpha	21
Abbildung 7: Detaillierte Lokalisation der Primärtumore bei Erstdiagnose	30
Abbildung 8: Kategorisierte Lokalisation der Primärtumore bei Erstdiagnose	30
Abbildung 9: Überlebensanalyse anhand des HPV-Status beim OSCC	39
Abbildung 10: Die Ansicht der verschiedenen Färbetypen.....	42
Abbildung 11: Verteilung der LDHA-Färbetypen.....	44
Abbildung 12: Die Ansicht der verschieden stark gefärbten Tumorfläche	46
Abbildung 13: Verteilung der Färbeintensität	48
Abbildung 14: Überlebensanalysen bei einer schwachen/starken LDHA-Expression .	48
Abbildung 15: Die Ansicht der verschieden positiven Tumorfläche.....	50
Abbildung 16: Verteilung der positiv gefärbten Tumorfläche.....	51
Abbildung 17: Anzahl der Patientenfälle bei der Bildung von zwei Score-Gruppen.....	54
Abbildung 18: HPV-unabhängige Überlebensanalyse	55
Abbildung 19: Vergleich der Überlebensanalyse in Anbetracht des HPV-Status	56

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von OSCC	10
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung bei HNSCC (2010)	12
Tabelle 3: HPV-induzierte und HPV-negative Karzinomen	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der Laktatdehydrogenase	18
Tabelle 5: Detaillierte Aufstellung des Patientenkollektivs	27
Tabelle 6: Verwendete Materialien in der immunhistochemischen Färbung.....	35
Tabelle 7: Mediane Überlebenszeit des Patientenkollektivs	40
Tabelle 8: Überlebensraten des Patientenkollektivs	41
Tabelle 9: Überlebensanalyse anhand des LDHA-Färbemusters	45
Tabelle 10: Überlebensanalyse anhand der LDHA-Intensität	49
Tabelle 11: Überlebensanalyse anhand der LDHA-positiven Tumorfläche	52
Tabelle 12: Überlebensanalyse anhand des LDHA-Score	56

12. Literaturverzeichnis

Airley, R.E.; Mobasheri, A. (2007):

Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. In: *Chemotherapy*. 2007;53(4):233-56

Andl, T.; Kahn, T.; Pfuhl, A.; Nicola, T.; Erber, R.; Conrath, C.; Klein, W.; Helbig, M.; Dietz, A.; Weidauer, H.; Bosch, F.X. (1998)

Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. In: *Cancer Res*. 58(1):5-13.

Ang, K.K.; Harris, J.; Wheeler, R.; Weber, R.; Rosenthal, D.I.; Nguyen-Tân, P.F.; Westra, W.H.; Chung, C.H.; Jordan, R.C.; Lu, C.; Kim, H.; Axelrod, R.; Silverman, C.C.; Redmond, K.P.; Gillison, M.L. (2010):

Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. In: *N Engl J Med*. 363(1):24-35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217

Ang, K.K.; Sturgis, E.M. (2012):

Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Semin Radiat Oncol*. 2012 Apr;22(2):128-42. doi: 10.1016/j.semradonc.2011.12.004

Arenz, A.; Ziemann, F.; Mayer, C.; Wittig, A.; Dreffke, K.; Preising, S.; Wagner, S.; Klussmann, J.P.; Engenhart-Cabillic, R.; Wittekindt, C. (2014):

Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. In: *Strahlenther Onkol*. 190(9):839-46. doi: 10.1007/s00066-014-0605-5

Arriarán, S.; Agnelli, S.; Sabater, D.; Remesar, X.; Fernández-López, J.A.; Alemany, M. (2015):

Evidences of basal lactate production in the main white adipose tissue sites of rats. Effects of sex and a cafeteria diet. In: *PLoS One*. 2015 Mar 5;10(3):e0119572. doi: 10.1371/journal.pone.0119572

Arseneault, R.; Chien, A.; Newington, J. T.; Rappon, T.; Harris, R.; Cumming, R.C. (2013):

Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration. In: *Cancer Lett.* 338(2):255-66. doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.034

Batra, A.; Mann, K.; Singer, M. V. (Herausgeber) (2010):

Alkohol und Tabak: Grundlagen und Folgeerkrankungen“; Thieme; Auflage: 1; ISBN-10: 3131466715 ; ISBN-13: 9783131466716

Bedell, M. A.; Hudson, J. B.; Golub, T.R.; Turyk, M. E.; Hosken, M.; Wilbanks, G.D.; Laimins, L. A. (1991):

Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. In: *J Virol.* 65(5):2254-60

Bensaad, K.; Harris, A. L. (2014):

Hypoxia and metabolism in cancer. In: *Adv Exp Med Biol.* 2014;772:1-39. doi: 10.1007/978-1-4614-5915-6_1

Beutner, K. R.; Tying, S. (1997):

Human papillomavirus and human disease. In: *Am J Med.* 102(5A):9-15

Blitz, I. L.; Laimins, L. A. (1991):

The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. In: *J Virol.* 1991 Feb; 65(2): 649–656

Bonnet, S.; Archer, S. L.; Allalunis-Turner, J.; Haromy, A.; Beaulieu, C.; Thompson, R.; Lee, C. T.; Lopaschuk, G. D.; Puttagunta, L.; Bonnet, S.; Harry, G.; Hashimoto, K.; Porter, C. J.; Andrade, M. A.; Thebaud, B.; Michelakis, E. D. (2007):

A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. In: *Cancer Cell.* 2007 Jan;11(1):37-51

Boyer, S. N.; Wazer D. E.; Band V. (1996):

E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Cancer Res.* 15;56(20):4620-4

Bracken, A. P.; Ciro, M.; Cocito, A.; Helin, K. (2004):

E2F target genes: unraveling the biology. In: *Trends Biochem Sci.* 29(8):409-17

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A., Jemal, A. (2018):

Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12

Bréchet, J. M.; Chevret, S.; Nataf, J.; Le Gall, C.; Fréault, J.; Rochemaure, J.; Chastang, C. I. (1997):

Diagnostic and prognostic value of Cyfra 21-1 compared with other tumour markers in patients with non-small cell lung cancer: a prospective study of 116 patients. In: *Eur J Cancer.* 1997 Mar;33(3):385-91

Brugarolas, J.; Chandrasekaran, C.; Gordon, J. I.; Beach, D.; Jacks, T.; Hannon, G. J. (1995):

Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. In: *Nature.* 377(6549):552-7

Capone, R. B.; Pai, S. I.; Koch, W. M.; Gillison, M. L.; Danish, H. N.; Westra, W. H.; Daniel R.; Shah, K. V.; Sidransky, D. (2006):

Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. In: *Clin Cancer Res.* 6(11):4171-5

Cardesi, E.; Galliano, D. (2013):

On the question of cognitive limits in diagnostic histopathology. In: *Pathologica.* 2013 Apr;105(2):43-50

Cham, C. M.; Gajewski, T. F. (2005):

Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. In: *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):4670-7

Chiang, C. M.; Ustav, M.; Stenlund, A.; Ho, T. F.; Broker, T. R.; Chow, L. T. (1992):

Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 89(13): 5799–5803

de Souza, D. L.; Bernal, M. M.; Jerez Roig, J.; Curado, M. P. (2012):

Oropharyngeal Cancer Survival: A Population-Based Study of Patients Diagnosed between 1978 and 2002. In: *ISRN Oncol.* 2012:207263. doi: 10.5402/2012/207263. Epub 2012 Aug 8

DeLellis, R. A.; Sternberger, L. A.; Mann, R. B.; Banks, P. M.; Nakane, P. K. (1979):

Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. In: *Am J Clin Pathol.* 71(5):483-8

Dietl, K.; Renner, K.; Dettmer, K.; Timischl, B.; Eberhart, K.; Dorn, C.; Hellerbrand, C.; Kastenberger, M.; Kunz-Schughart, L. A.; Oefner, P. J.; Andreesen, R.; Gottfried, E.; Kreutz, M. P. (2010):

Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. In: *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1200-9. doi: 10.4049/jimmunol.0902584

Doorbar, J. (2006):

Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. In: *Clin Sci (Lond)* 110(5):525-41

Dürst, M.; Gallahan, D.; Jay, G.; Rhim, J. S. (1989):

Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. In: *Virology.* 173(2):767-71

Dyson, N.; Howley, P. M.; Münger, K.; Harlow, E. (1989):

The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. In: *Science.* 243(4893):934-7

Elf, S. E.; Chen, J. (2014):

Targeting glucose metabolism in patients with cancer. In: *Cancer*. 120(6):774-80. doi: 10.1002/cncr.28501

Fakhry, C.; Westra, W. H.; Li, S.; Cmelak, A.; Ridge, J. A.; Pinto, H.; Forastiere, A.; Gillison, M. L. (2008):

Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. In: *J Natl Cancer Inst*. 100(4):261-9. doi: 10.1093/jnci/djn011

Fantin, V. R.; St-Pierre, J.; Leder, P. (2006):

Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. In: *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):425-34

Fischer, K.; Hoffmann, P.; Voelkl, S.; Meidenbauer, N.; Ammer, J.; Edinger, M.; Gottfried, E.; Schwarz, S.; Rothe, G.; Hoves, S.; Renner, K.; Timischl, B.; Mackensen, A.; Kunz-Schughart, L.; Andreesen, R.; Krause, S. W.; Kreutz, M. (2007):

Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. In: *Blood*. 109(9):3812-9

Galloway, D. A.; McDougall, J. K. (1996):

The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. In: *Semin Cancer Biol*. 7(6):309-15

Geng, Y.; Eaton, E. N.; Picón, M.; Roberts, J. M.; Lundberg, A. S.; Gifford, A.; Sardet, C.; Weinberg, R. A. (1996):

Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. In: *Oncogene*. 12(6):1173-80

Gillies, R. J.; Robey, I.; Gatenby, R. A. (2008):

Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med*. 2008 Jun;49 Suppl 2:24S-42S. doi: 10.2967/jnumed.107.047258

Gillison, M. L. (2006):

Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. In: *J Clin Oncol.* 24(36):5623-5

Gillison, M. L.; Koch, W. M.; Capone, R. B.; Spafford, M.; Westra, W. H.; Wu, L.; Zahurak, M. L.; Daniel, R. W.; Viglione, M.; Symer, D. E.; Shah, K. V.; Sidransky, D. (2000):

Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. In: *J Natl Cancer Inst.* 92(9):709-20

Gottfried, E.; Kunz-Schughart, L. A.; Ebner, S.; Mueller-Klieser, W.; Hoves, S.; Andreesen, R.; Mackensen, A.; Kreutz, M. (2006):

Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. In: *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):2013-21

Greene, F. L.; Sobin, L.H. (2002):

The TNM system: our language for cancer care. In: *J Surg Oncol.* 80(3):119-20

Hafkamp, H. C.; Manni, J. J.; Haesevoets, A.; Voogd, A. C.; Schepers, M.; Bot, F. J.; Hopman, A. H.; Ramaekers, F. C.; Speel, E. J. (2008):

Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. In: *Int J Cancer.* 122(12):2656-64. doi: 10.1002/ijc.23458

Hagensee, M. E.; Olson, N. H.; Baker, T. S.; Galloway, D. A. (1994):

Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. In: *J Virol.* 68(7):4503-5

Harpole, D. H.; Herndon, J. E. 2nd; Young, W. G.; Wolfe, W. G.; Sabiston, D. C. (1995):

Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. In: *Cancer.* 76(5):787-96

Hirschhaeuser, F.; Sattler, U. G.; Mueller-Klieser, W. (2011):

Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 71(22):6921-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457

Hoffmann, M.; Ihloff, A. S.; Görögh, T.; Weise, J. B.; Fazel, A.; Krams, M.; Rittgen, W.; Schwarz, E.; Kahn, T. (2010):

p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. In: *Int J Cancer.* 2010 Oct 1;127(7):1595-602. doi: 10.1002/ijc.25174

Hollmann, W.; Hettinger, T. (2000):

Sportmedizin – Arbeits- und Trainingsgrundlagen; 4. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2000; ISBN-10: 3794516729; ISBN-13: 9783794516728

Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. (1981):

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *J Histochem Cytochem.* 29(4):577-80

Huang, X.; Li, X.; Xie, X.; Ye F.; Chen, B.; Song, C.; Tang, H.; Xie, X. (2016):

High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. In: *Breast.* 2016 Dec;30:39-46. doi: 10.1016/j.breast.2016.08.014

International Agency for Research on Cancer, IARC 1978 und 2002

Jang, M.; Kim, S. S.; Lee, J. (2013):

Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. In: *Exp Mol Med.* 45:e45. doi: 10.1038/emm.2013.85

Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Murray, T.; Thun, M.J. (2008):

Cancer statistics, 2008. In: *CA Cancer J Clin.* 58(2):71-96. doi: 0.3322/CA.2007.0010

Jin, L.; Chun, J.; Pan, C.; Alesi, G. N.; Li, D.; Magliocca, K. R.; Kang, Y.; Chen, Z. G.; Shin, D. M.; Khuri, F. R.; Fan, J.; Kang, S. (2017):

Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis. In: *Oncogene*. 2017 Jul 6;36(27):3797-3806. doi: 10.1038/onc.2017.6

Jung, A. C.; Briolat, J.; Millon, R.; de Reyniès, A.; Rickman, D.; Thomas, E.; Abecassis, J.; Clavel, C.; Wasylyk, B. (2010):

Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. In: *Int J Cancer*. 126(8):1882-1894. doi: 10.1002/ijc.24911

Karsai, S.; Abel, U.; Roesch-Ely, M.; Affolter, A.; Hofele, C.; Joos, S.; Plinkert, P. K.; Bosch, F. X. (2007):

Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. In: *J Pathol*. 211(3):314-22

Kessler, P.; Grabenbauer, G.; Leher, A.; Bloch-Birkholz, A.; Vairaktaris, E.; Neukam, F. W. (2008):

Neoadjuvant and adjuvant therapy in patients with oral squamous cell carcinoma Long-term survival in a prospective, non-randomized study. In: *Br J Oral Maxillofac Surg*. 46(1):1-5

Klussmann, J. P.; Dinh, S.; Guntinas-Lichius, O.; Wittekindt, C.; Weißenborn, S.; Wieland, U.; Dienes, H. P.; Hoffmann, T.; Smith, E.; Turek, L.; Speel, E. J. M.; Pfister, H. J. (2004):

HPV-assozierte Tonsillenkarzinome. Ein Update. In: *HNO* 52:208–218 DOI 10.1007/s00106-004-1069-1

Klussmann, J. P.; Mooren, J. J.; Lehnen, M.; Claessen, S. M.; Stenner, M.; Huebbers, C. U.; Weissenborn, S. J.; Wedemeyer, I.; Preuss, S. F.; Straetmans, J. M.; Manni, J. J.; Hopman, A. H.; Speel, E. J. (2009):

Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res*. 15(5):1779-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1463

Klussmann, J. P.; Weissenborn, S. J.; Wieland, U.; Dries, V.; Kolligs, J.; Jungehuelssing, M.; Eckel, H. E.; Dienes, H. P.; Pfister, H. J.; Fuchs, P. G. (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. In: *Cancer*. 92(11):2875-84

Knuth, J.; Sharma, S. J.; Würdemann, N.; Holler, C.; Garvalov, B. K.; Acker, T.; Wittekindt, C.; Wagner, S; Klussmann, J. P. (2017): Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Oncotarget*. 8(52):89681-89691. doi: 10.18632/oncotarget.20813

Kobayashi, N.; Toyooka, S.; Soh, J.; Ichimura, K.; Yanai, H.; Suehisa, H.; Ichihara, S.; Yamane, M.; Aoe, M.; Sano, Y.; Date, H. (2007): Risk factors for recurrence and unfavorable prognosis in patients with stage I non-small cell lung cancer and a tumor diameter of 20 mm or less. In: *J Thorac Oncol*. 2(9):808-12

Kochs, E.; Adam, H. A.; Spies, C. (Herausgeber) (2008): *Anästhesiologie - Anästhesie beim geriatrischen Patienten; 2. Auflage; Thieme-Verlag; S. 1199; Kapitel 41; Tabelle 41.2; ISBN-10: 3131148624; ISBN-13: 9783131148629*

Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Bougioukas, G.; Sivridis, E. (2007): Lung cancer: a comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. In: *Cancer Biol Ther*. 2007 Sep;6(9):1476-9

Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Bougioukas, G.; Didilis, V.; Gatter, K. C.; Harris, A.L.; Tumour and Angiogenesis Research Group (2003): Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. In: *Br J Cancer*. 89(5):877-85

Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Winter, S.; Leek, R.; Sivridis, E.; Harris, A. L. (2009):

Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. In: *Oncology*. 77(5):285-92. doi: 10.1159/000259260

Koukourakis, M. I.; Kontomanolis, E.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Liberis, V. (2009):

Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. In: *Gynecol Obstet Invest*. 67(3):162-8. doi: 10.1159/000183250

Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Gatter, K. C.; Harris, A. L.; Tumour Angiogenesis Research Group (2006):

Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. In: *J Clin Oncol*. 24(26):4301-8

Kuerbitz, S. J.; Plunkett, B. S.; Walsh, W. V.; Kastan, M. B. (1992):

Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16):7491-5

Lambert, P.F. (1991):

Papillomavirus DNA replication. In: *J Virol*. 65(7):3417-20

Lewin, F.; Norell, S. E.; Johansson, H.; Gustavsson, P.; Wennerberg, J.;

Biörklund, A.; Rutqvist, L. E. (1998):

Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. In: *Cancer*. 82(7):1367-75

Liebertz, D. J.; Lechner, M. G.; Masood, R.; Sinha, U. K.; Han, J.; Puri, R. K.;

Correa, A. J.; Epstein, A. L. (2010):

Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1. In: *Head Neck Oncol*. 2:5. doi: 10.1186/1758-3284-2-5

Lindel, K.; Beer, K. T.; Laissue, J.; Greiner, R. H.; Aebersold, D. M. (2001):
Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. In: *Cancer*. 92(4):805-13

Lindquist, D.; Romanitan, M.; Hammarstedt, L.; Näsman, A.; Dahlstrand, H.; Lindholm, J.; Onelöv, L.; Ramqvist, T.; Ye, W.; Munck-Wikland, E.; Dalianis, T. (2007):

Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. In: *Mol Oncol*. 1(3):350-5. doi: 10.1016/j.molonc.2007.08.005

Markaki, Y.; Harz, H. (Herausgeber) (2017):

Light Microscopy – Methods and Protocols; Softcover reprint of the original 1st edition 2017 2018; Springer, Berlin; ISBN 978-1-4939-8305-6

Meek, D. W. (2009):

Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? In: *Nat Rev Cancer*. 9(10):714-23. doi: 10.1038/nrc2716. Epub 2009 Sep 4

Miao, P.; Sheng, S.; Sun, X.; Liu, J.; Huang, G. (2013):

Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. In: *IUBMB Life*. 65(11):904-10. doi: 10.1002/iub.1216

Mitka, M. (2005):

Diabetic retinopathy mechanism probed. In: *JAMA*. 293(2):148-9

Mohamed, K. M.; Le, A.; Duong, H.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Messadi, D. V. (2004):

Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. In: *Exp Mol Pathol*. 76(2):143-52

Moro, D.; Villemain, D.; Vuillez, J. P.; Agnius Delord, C.; Brambilla, C. (1995):

CEA, CYFRA21-1 and SCC in non-small cell lung cancer. In: *Lung Cancer*. 1995 Oct;13(2):169-76

Morse, D. E.; Psoter, W. J.; Baek L. S.; Eisenberg, E.; Cohen, D.; Cleveland, D.; Mohit-Tabatabai, M.; Reisine, S. (2010):

Smoking and drinking in relation to depressive symptoms among persons with oral cancer or oral epithelial dysplasia. In: *Head Neck*. 32(5):578-87. doi: 10.1002/hed.21227

Muley, T.; Dienemann, H.; Ebert, W. (2004):

CYFRA 21-1 and CEA are independent prognostic factors in 153 operated stage I NSCLC patients. In: *Anticancer Res*. 24(3b):1953-6

Münger, K.; Baldwin, A.; Edwards, K. M.; Hayakawa, H.; Nguyen C. L.; Owens, M.; Grace, M.; Huh, K.; (2004):

Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. In: *J Virol*. 78(21):11451-60

Nibu, Y.; Inoue, T. (1998):

Phase Behavior of Aqueous Mixtures of Some Polyethylene Glycol Decyl Ethers Revealed by DSC and FT-IR Measurements. In: *J Colloid Interface Sci*. 205(2):305-315

Nibu, Y.; Inoue, T. (1998):

Solid-Liquid Phase Behavior of Binary Mixture of Tetraethylene Glycol Decyl Ether and Water. In: *J Colloid Interface Sci*. 205(2):231-240

Ohtani, K.; DeGregori, J.; Nevins, J. R. (1995):

Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 19;92(26):12146-50

Ohtsubo, M.; Theodoras, A. M.; Schumacher, J.; Roberts, J. M.; Pagano, M. (1995):

Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. In: *Mol Cell Biol*. 15(5):2612-24

Olsen, J.; Sabroe, S.; Ipsen, J. (1985):

Effect of combined alcohol and tobacco exposure on risk of cancer of the hypopharynx. In: *J Epidemiol Community Health* 39(4):304-7

Phelps, W. C.; Alexander K. A. (1995):

Antiviral therapy for human papillomaviruses: rational and prospects. In: *Ann Intern Med.* 123(5):368-82

Phelps, W. C.; Münger, K.; Yee, C. L.; Barnes, J. A.; Howley, P. M. (1992):

Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. In: *J Virol.* 66(4):2418-27

Ragin, C. C.; Taioli, E. (2007):

Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. In: *Int J Cancer.* 121(8):1813-20

Rizwan, A.; Serganova, I.; Khanin, R.; Karabeber, H.; Ni, X.; Thakur, S.; Zakian, K. L.; Blasberg, R.; Koutcher, J. A. (2013):

Relationships between LDH-A, lactate, and metastases in 4T1 breast tumors. In: *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 15;19(18):5158-69. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3300

RKI, Robert-Koch-Institut (Veröffentlichung 2013); <https://www.rki.de>

Rong, Y.; Wu, W.; Ni, X.; Kuang, T.; Jin, D.; Wang, D.; Lou, W. (2013):

Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. In: *Tumour Biol.* 2013 Jun;34(3):1523-30. doi: 10.1007/s13277-013-0679-1

Ruggieri, V.; Agriesti, F.; Scrima, R.; Laurenzana, I.; Perrone, D.; Tataranni, T.; Mazzoccoli, C.; Lo Muzio, L.; Capitanio, N.; Piccoli, C. (2015):

Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment. In: *Oncotarget.* 6(2):1217-30

Ruiz Hernández, G.; Romero de Avila Y Avalos, C.; Carreras Delgado, J. L. (2005):

The value of 18f-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography (18f-fdg pet) in diagnosis of neoplastic diseases. In: *Med Clin (Barc).* 124(6):229-36. Review.

Spanish

Ryan, J.; Gerhold, A. R.; Boudreau, V.; Smith, L.; Maddox, P.S. (2017):

Introduction to Modern Methods in Light Microscopy. In: *Methods Mol Biol.* 2017;1563:1-15. doi: 10.1007/978-1-4939-6810-7_1

Samandari, F.; Mai, J. K. (2008):

Curriculum Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner; Quintessenz Verlag; Auflage: 2., überarbeitete und erweiterte Auflage; ISBN-10: 9783938947388, ISBN-13: 978-3938947388

Sawabata, N.; Maeda, H.; Yokota, S.; Takeda, S. I.; Masaru, K.; Tokunaga, T., Ito, M. (2004):

Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. In: *Cancer.* 101(4):803-9

Sawabata, N.; Miyoshi, S.; Matsumura, A.; Ohta, M.; Maeda, H.; Sueki, H.; Hayakawa, M.; Okumura, M.; Sawa, Y. (2007):

Prognosis of smokers following resection of pathological stage I non-small-cell lung carcinoma. In: *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 55(10):420-4

Scheffner, M.; Werness, B. A.; Huibregtse, J. M.; Levine, A. J.; Howley, P. M. (1990):

The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. In: *Cell.* 21;63(6):1129-36

Seliger, C; Leukel, P.; Moeckel, S.; Jachnik, B.; Lottaz, C.; Kreutz, M.; Brawanski, A.; Proescholdt, M.; Bogdahn, U.; Bosserhoff, A. K.; Vollmann-Zwerenz, A.; Hau, P (2013):

Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)-beta2 and migration of glioma cells in vitro. In: *PLoS One.* 8(11):e78935. doi: 10.1371/journal.pone.0078935

Semenza, G. L. (2003):

Targeting HIF-1 for cancer therapy. In: *Nat Rev Cancer.* 3(10):721-32

Semenza, G. L. (2007):

HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. In: *J Bioenerg Biomembr.* 39(3):231-4

Semenza, G. L. (2007):

Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. In: *Biochem J.* 405(1):1-9

Semenza, G. L.; Jiang, B. H.; Leung, S. W.; Passantino, R.; Concordet, J. P.; Maire, P.; Giallongo, A. (1996):

Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. In: *J Biol Chem.* 1996 Dec 20;271(51):32529-37

Sharma, S. J.; Wittekindt, C.; Knuth, J.; Steiner, D.; Wuerdemann, N.; Laur, M; Kroll, T.; Wagner, S.; Klussmann, J. P. (2017):

Intraindividual homogeneity of 18F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. In: *Oral Oncol.* 73:166-171. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.08.019

Sheng, S. L.; Liu, J. J.; Dai, Y. H.; Sun, X. G.; Xiong, X. P.; Huang, G. (2012):

Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. In: *FEBS J.* 2012 Oct;279(20):3898-910. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08748.x

Shi, Y.; Pinto, B. M. (2014):

Human lactate dehydrogenase a inhibitors: a molecular dynamics investigation. In: *PLoS One.* 9(1):e86365. doi: 10.1371/journal.pone.0086365

Smith, E. M.; Ritchie, J. M.; Summersgill, K. F.; Klussmann, J. P.; Lee, J. H.; Wang, D.; Haugen, T. H.; Turek, L. P. (2004):

Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. In: *Int J Cancer.* 108(5):766-72

Sternberger, L. A.; Hardy, P. H. Jr; Cuculis, J. J.; Meyer, H. G. (1970):

The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. In: *J Histochem Cytochem.* 18(5):315-33

Suzuki, H.; Ishikawa, S.; Satoh, H.; Ishikawa, H.; Sakai, M.; Yamamoto, T.; Onizuka, M.; Sakakibara, Y. (2007):

Preoperative CYFRA 21-1 levels as a prognostic factor in c-stage I non-small cell lung cancer. In: *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Oct;32(4):648-52

Thomas, M.; Pim, D.; Banks, L. (1999):

The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. In: *Oncogene.* 18(53):7690-700

UICC 7. Auflage (2010)

Wagner, S.; Wittekindt, C.; Sharma, S. J.; Wuerdemann, N.; Jüttner T.; Reuschenbach, M.; Prigge, E. S.; von Knebel Doeberitz, M.; Gattenlöhner, S.; Burkhardt, E.; Pons-Kühnemann, J.; Klussmann, J. P. (2017):

Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. In: *Br J Cancer.* 2017 Jun 6;116(12):1604-1611. doi: 10.1038/bjc.2017.132

Walenta, S.; Schroeder, T.; Mueller-Klieser, W. (2004):

Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. In: *Curr Med Chem.* 2004 Aug;11(16):2195-204

Walenta, S.; Wetterling, M.; Lehrke, M.; Schwickert, G.; Sundfør, K.; Rofstad, E. K.; Mueller-Klieser, W. (2000):

High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. In: *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):916-21

Weisser, B.; Okonek, C. (2003):

Biologisch-medizinische Grundlagen des Alterssports. In: Denk, H.; Pache, D.; Schaller, H.J.; Handbuch Alterssport; Verlag Hofmann, Schorndorf 2003: 97-143; ISBN-10: 3778018914; ISBN-13: 9783778018910

WHO, World Health Organization; www.who.int

Wiest, T.; Schwarz, E.; Enders, C.; Flechtenmacher, C.; Bosch, F. X. (2002):

Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. In: *Oncogene*. 21(10):1510-7

Witt, M. (2006):

Das Erste - kompakt: Anatomie - GK1 (Springer-Lehrbuch); ISBN-10: 354036367X, ISBN-13: 978-3540363675

Wittekindt, C.; Gültekin, E.; Weissenborn, S. J.; Dienes, H.P.; Pfister, H. J.;

Klussmann, J. P. (2005):

Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. In: *Adv Otorhinolaryngol*. 62:72-80

Wittekindt, C.; Wagner, S.; Sharma, S. J.; Würdemann, N.; Knuth, J.; Reder, H.;

Klußmann, J. P. (2018):

HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. In: *Laryngo-Rhino-Otol* 2018; 97(S 01): S48-S113 DOI: 10.1055/s-0043-121596

Xie, H.; Hanai, J.; Ren, J. G.; Kats, L.; Burgess, K.; Bhargava, P.; Signoretti, S.;

Billiard, J.; Duffy, K. J.; Grant, A.; Wang, X.; Lorkiewicz, P. K.; Schatzman, S.;

Bousamra, M. 2nd; Lane, A.N.; Higashi, R. M.; Fan, T. W.; Pandolfi, P. P.;

Sukhatme, V. P.; Seth, P. (2014):

Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. In: *Cell Metab*. 2014 May 6;19(5):795-809. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.003

Xie, H.; Valera, V. A.; Merino, M. J.; Amato, A. M.; Signoretti, S.; Linehan, W. M.; Sukhatme, V. P.; Seth, P. (2009):

LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. In: *Mol Cancer Ther.* 2009 Mar;8(3):626-35. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1049

Yang, Y.; Li, C. C.; Weissman, A. M. (2004):

Regulating the p53 system through ubiquitination. In: *Oncogene.* 23(11):2096-106

Zhang, R.; Su, J.; Xue, S. L.; Yang, H.; Ju, L. L.; Ji, Y.; Wu, K. H.; Zhang, Y. W.; Zhang, Y. X.; Hu, J. F.; Yu, M. M. (2016):

HPV E6/p53 mediated down-regulation of miR-34a inhibits Warburg effect through targeting LDHA in cervical cancer. In: *Am J Cancer Res.* 2016 Jan 15;6(2):312-20

Zhou, J.; Sun, X. Y.; Louis, K.; Frazer, I. H. (1994):

Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. In: *J Virol.* 68(2):619-25

Zhou, M.; Zhao, Y.; Ding, Y.; Liu, H.; Liu, Z.; Fodstad, O.; Riker, A. I.; Kamarajugadda, S.; Lu, J.; Owen, L. B.; Ledoux, S. P.; Tan, M. (2010):

Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. In: *Mol Cancer.* 2010 Feb 9;9:33. doi: 10.1186/1476-4598-9-33

zur Hausen, H. (1989):

Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. In: *Cancer Res.* 49(17):4677-81

zur Hausen, H. (2002):

Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. In: *Nat Rev Cancer.* (5):342-50

14. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 30.04.2019

Ort, Datum



Unterschrift

15. Danksagung

Zunächst mochte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wittekindt und Herrn Prof. Dr. Klußmann für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ganz besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Wittekindt für die Betreuung und Beratung bei allen Fragen und Aufgaben die während dieser Zeit aufgekommen sind.

Weiterhin gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. Steffen Wagner für die Betreuung während der praktischen Durchführung im Labor und auch darüber hinaus bei der Beratung und für die immer ausführlichen und engagierten Hilfestellungen beim Korrekturlesen und Besprechen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Jennifer Knuth und Maïke Roth dafür, dass ihr beide mir während der praktischen Arbeiten immer zur Seite gestanden und mich unterstützt habt. Danke für eure Geduld und das Beantworten jeglicher Fragen die aufgekommen sind.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Zahnarztpraxis Marc Nordlohne in Weilburg und aus der Poliklinik für Kieferorthopädie in Gießen. Ihr alle hattet immer ein offenes Ohr für mich, auch und vor allem während nicht so einfachen Phasen bei der Entstehung dieser Doktorarbeit. Vielen Dank für eure Motivation und euren Zuspruch.

Vielen Dank dabei ganz besonders an Prof. Dr. Ruf, die mir nicht nur die Möglichkeit der Fachzahnarztweiterbildung ermöglicht, sondern auch für Ihre großartige und sorgfältige Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen beiden Mitstreiterinnen Mareike und Carolin danke ich für Zeit die wir gemeinsam im Labor verbracht haben. Mit euch war alles immer ein bisschen leichter zu bewältigen. Vor allem danke ich meiner Freundin Mareike, die mich nicht nur während dieser Doktorarbeit begleitet hat, sondern auch schon während des ganzen Studiums. Das Studium mit dir war eine großartige Zeit. Ich danke dir für deine Unterstützung, all die Lacher und tollen Momente die wir gemeinsam hatten.

Mein herzlichster Dank gilt meiner gesamten Familie, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre. Mama, Papa, Werni, Jan, ich danke euch für eure Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg und für eure aufrichtige Liebe. Auch meinen durch die

Hochzeit dazugewonnenen Familienmitgliedern danke ich für eure Unterstützung und dafür, dass ihr mich so offen und voller Liebe in eure Familie aufgenommen habt.

Und dann wie heißt es doch so passend: Das Beste kommt zum Schluss. Ich danke meinem Ehemann Serhad für deine fortwährende und allumfassende Unterstützung und bedingungslose Liebe seit 16 Jahren. Ohne dich wären diese Doktorarbeit und auch schon das Studium nicht möglich gewesen. Ich danke dir von Herzen für deine Geduld, deine aufbauenden Worte, dein stets offenes Ohr in jeder Lebenslage. Du hast immer fest an mich geglaubt und immer an meiner Seite gestanden. Ich kann mir keinen besseren Menschen für meinen Lebensweg vorstellen.

16. Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6839-4



9 783835 196839 4