

HPV16-DNA als diagnostischer Marker in Liquid Biopsies von Patienten mit HPV16-assoziierten Oropharynxkarzinomen

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

vorgelegt von Taferner, Victor Franz
aus Salzburg, Österreich

Gießen (2026)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Kopf-Hals-Tumorforschung

Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

am Universitätsklinikum Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Wittekindt, Claus

Gutachter: Prof. Dr. Ziebuhr, John

Tag der Disputation: 02.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund Oropharynxkarzinome	2
1.1.1	TNM-Klassifizierung für OPSCC und Stadieneinteilung nach UICC	3
1.2	Die Rolle von HPV bei malignen Erkrankungen	5
1.2.1.	HPV E6 und E7	9
1.3	Die Bedeutung von cfDNA in der Biomarkerforschung bei HPV-positivem OPSCC	11
1.4	Zielsetzung der Dissertation	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Biologische Proben und klinische Patientenparameter	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Definition des HPV-assoziierten bzw. HPV-negativen OPSCC	18
2.2.2	Probensammlung und Isolierung zellfreier DNA	18
2.2.3	Real-Time-PCR	19
2.2.3.1	qPCR-Protokolle	21
2.2.3.2	Datenvalidierung und Berechnung der Konzentration der Virus-DNA	23
2.2.4	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Beschreibung der Patientenkohorte	26
3.2	Optimierung der qPCR-Verfahren	28
3.3	Zeitliche Probenverteilung während der Therapiephase und der Nachsorgephase	30
3.4	Detektion von cfHPV-DNA mittels TaqMan qPCR-Assay und Assoziation mit den Tumorcharakteristika	34
3.4.1	Vergleich des cfHPV-Nachweises mittels TaqMan qPCR-Assay zwischen HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC	34
3.4.2	TaqMan-qPCR für den Vergleich zwischen prä- und posttherapeutischen Proben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen	40
3.5	SYBR Green-qPCR-basierte Analyse von cfHPV-DNA in HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen	42
3.5.1.	SYBR Green-qPCR für den Vergleich zwischen prä- und posttherapeutischen Proben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen	47
3.6	Vergleich von TaqMan- und SYBR Green-qPCR Detektionsmethoden	49
3.6.1	Vergleich von Sensitivität und Spezifität von TaqMan- und SYBR Green-qPCR	53

3.6.2 qPCR-Detektion von zellfreier HPV-DNA bei Patienten mit residualer Tumorerkrankung	54
4 Diskussion	59
4.1 qPCR-basierter Detektionsprozess für Biomarker-Studien	59
4.1.1 Assoziation zwischen der cfDNA-Konzentration und der beobachteten Tumorlast	61
4.1.2 cfDNA-Konzentration als Monitor in der Tumor-Nachsorge	64
4.2 Vergleich von TaqMan- und SYBR Green-basierten qPCR-Detektionsmethoden für cfHPV16-DNA.....	66
4.3 Stärken und Schwächen dieser Arbeit und Limitationen der cfDNA-Bestimmung	71
Zusammenfassung	75
Summary	77
Literaturverzeichnis	79
Abbildungsverzeichnis	91
Tabellenverzeichnis	93
Abkürzungsverzeichnis	94
Anhang	95
Einverständniserklärungen	96
Publikationsverzeichnis.....	98
Ehrenwörtliche Erklärung	99
Danksagung	100

1 Einleitung

Das oropharyngeale Plattenepithelkarzinom, kurz Oropharynxkarzinom, (OPSCC, *Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*) gehört zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). Einer der wichtigsten Risikofaktoren, welche zur Entstehung der Erkrankung beiträgt, ist hierbei das humane Papillomvirus (HPV), insbesondere der HPV-Typ 16 (HPV16). Die Zahl der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome hat in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Industriestaaten erheblich zugenommen und es besteht in einzelnen Ländern bzw. Regionen hier bereits eine HPV-Assoziation von bis zu 70-80 % aller OPSCCs (Bradley et al., 2022; Faraji et al., 2017; Siegel et al., 2020). Der prozentuale Anteil der HPV-assoziierten OPSCC variiert weltweit jedoch stark in Abhängigkeit von der beobachteten geographischen Region. In Asien zum Beispiel liegt die kumulative Prävalenz im Vergleich bei lediglich ca. 23% (Pimolbutr et al., 2024).

Die Behandlung von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen stellt eine medizinische Herausforderung sowie eine finanzielle Belastung für das internationale sozioökonomische System dar. Das HPV-assoziierte OPSCC weist mit einem 5-Jahres-Überleben von 82% versus 44% eine wesentlich bessere Prognose als HPV-negative OPSCC auf (Gorphe et al., 2022). Dennoch entwickeln nach der Behandlung 13-25 % der Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC innerhalb von 2 Jahren und bis zu 36 % im Zeitraum von 8 Jahren ein Rezidiv (Faraji et al., 2017).

Zur Überwachung des Therapieverlaufs und der frühzeitigen Detektion solcher Rezidivfälle sind Biomarker bzw. Tumormarker nützlich und im klinischen Alltag bereits bei vielen Tumorentitäten in Gebrauch. Beispiele hierfür sind das Glykoprotein CEA und das Lewis-Antigen CA19-9 für kolorektale Karzinome und das Glykoprotein CA15-3, welches auf Zellen von Mammakarzinomen exprimiert wird. Diese Marker kommen im Rahmen der Nachsorge regelmäßig zur Anwendung und tragen dazu bei, Tumorrezidive oder eine Progression der Erkrankung frühzeitig zu erkennen (Yamashita et al., 2008; Engel et al., 2008). Die Entwicklung eines solchen Biomarkers für Oropharynxkarzinome, welcher effizient, kostengünstig und im klinischen Alltag praktikabel ist, stellt eine erhebliche Herausforderung dar. Dennoch ist der Aufwand aufgrund des daraus resultierenden klinischen Nutzens erstrebenswert.

1.1 Hintergrund Oropharynxkarzinome

Kopf-Hals-Tumore bilden eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen, die in der Nasenhöhle, den Nasennebenhöhlen, den Lippen, der Mundhöhle, dem Pharynx, den Speicheldrüsen, dem Hals oder dem Kehlkopf entstehen. Krebserkrankungen des Kopfes und des Halses stellen aufgrund ihrer hohen Inzidenz, Prävalenz und Mortalität ein ernstes Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Im Jahr 2018 wurden weltweit rund 700.000 Fälle (92.900 Oropharynx) neu diagnostiziert und es wird von einer hohen Sterblichkeitsrate von etwa 50% berichtet (Ferlay et al., 2018).

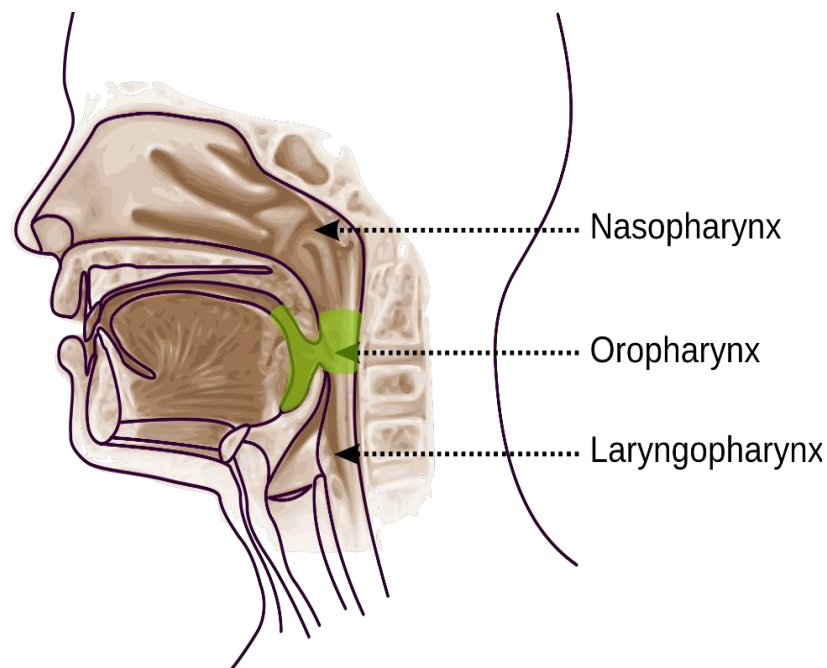


Abbildung 1: Anatomisches Schaubild des Oropharynx. Der Oropharynx umfasst die Basis und das hintere Drittel der Zunge, die Mandeln, den weichen Gaumen sowie die hinteren und seitlichen Rachenwände. Oropharynx = markiert als grüne Fläche. Adaptiert von Arcadian, freie Nutzung und Anpassung unter Public domain Lizenz, via Wikimedia Commons

Das Oropharynxkarzinom kann im gesamten Bereich des Oropharynx (s. Abb. 1) entstehen. Es macht einen großen Teil der Krebserkrankungen im Kopf- und Halsbereich aus und diese gehören als Gruppe weltweit zur sechsthäufigsten Krebsart (Sung et al., 2021). Obwohl die Prävalenz bei Männern höher ist als bei Frauen, hat in den letzten Jahren der Anteil der Frauen, die von dieser Krankheit betroffen sind, zugenommen. Bei mehr als 90 % der Oropharynxkarzinome handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, die aus dem mehrschichtigen Plattenepithel des Oropharynx hervorgehen. Die Ätiologie des Oropharynxkarzinoms lässt sich grob in Humanes Papillomvirus (HPV)-assoziierte und HPV-negative Karzinome einteilen. HPV-assoziierte OPSCC treten bei Patienten auf, die mit Hochrisiko-Varianten des humanen Papillomvirus infiziert sind. Unter den vielen

Subvarianten des humanen Papillomvirus ist HPV16 der häufigste Typ, welcher bei Oropharynxkarzinomen gefunden wird (Jamal Z & F, 2023; Syrjänen & Syrjänen, 2019).

1.1.1 TNM-Klassifizierung für OPSCC und Stadieneinteilung nach UICC

Die TNM-Klassifikation (Tumor, Noten (Nodus), Metastasen) bösartiger Erkrankungen spielt eine wichtige Rolle bei der Einteilung von Tumoren. Sie hilft bei der initialen Klassifikation des Tumors, der Prognosevorhersage und wird für die Therapieentscheidung angewendet.

Die erste TNM-Klassifikation wurde 1968 von der Union für internationale Krebsbekämpfung (*Union for International Cancer Control, UICC*) veröffentlicht und sie wird regelmäßig dem aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst. Bei den soliden Tumoren wird das TNM-System international angewandt und unterscheidet sich entsprechend der unterschiedlichen Tumorentitäten (Amin et al., 2017; Beltz et al., 2018; Mellin et al., 2002). Die aktuelle Klassifikation bei OPSCC sowie das daraus resultierende Tumorstadium nach UICC (*8th edition*) sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt (Brierley et al., 2017).

Tabelle 1. TNM (Tumor, Knoten, Metastasen) -Klassifikation des Oropharynxkarzinoms.

Kategorien	Stadien
Tumorgröße	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor identifiziert
T1	Tumor $\leq 2\text{cm}$ im größten Durchmesser
T2	Tumor $> 2\text{cm} \leq 4\text{cm}$ im größten Durchmesser
T3	Tumor $> 4\text{ cm}$ in der größten Abmessung oder Ausbreitung bis zur Oberfläche der Epiglottis
T4	Infiltration von Larynx, extrinsischen Zungenmuskeln, medialem Pterygoid, hartem Gaumen oder Mandibula bzw. darüber hinaus
Regionäre Lymphknoten	
Nx	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1	ein oder mehrere ipsilaterale Lymphknoten, keiner > 6cm
N2	kontralaterale oder bilaterale Lymphknoten, keiner > 6 cm
N3	Lymphknoten > 6cm
Fernmetastasierung	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Quelle: TNM Classification of Malignant Tumors 2017, 8th Edition (*International Cancer Control, UICC*), (Brierley et al., 2017).

Seit einigen Jahren werden HPV-positive und HPV-negative Oropharynxkarzinome als zwei unterschiedliche Tumorentitäten angesehen. Dies spiegelt sich auch in der aktuellen Stadieneinteilung nach UICC wider (s. Tab. 2). Hierbei wird zwischen p16-positiven und p16-negativen OPSCC unterschieden.

Tabelle 2. Das UICC-Stadiensystem für HPV-positive (HPV-assoziierte) und HPV-negative OPSCC.

p16-positive OPSCC: UICC-Stadium			
Stadium I	T0-2	N0-1	M0
Stadium II	T0-2	N2	M0
	T3	N0-1	M0
Stadium III	jedes T	N3	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
p16-negativ OPSCC: UICC-Stadium			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0-1	M0
	T1-4a	N2	M0
Stadium IVB	jedes T	N	M0
	T4b	jedes N	M
Stadium IVC	jedes T	jedes N	M1

T= Tumorgroße, N= Lymphknoten, M= Metastasen. Classification of Malignant Tumours 2016, 8th Edition (*International Cancer Control, UICC*), (Brierley et al., 2017).

Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung von p16 gehört die Testung des HPV-DNA-Status für OPSCC mittlerweile in vielen Zentren zum Standard und trägt dazu bei, die Patientenversorgung zu verbessern. Denn es hat sich gezeigt, dass die OPSCC-Subtypen p16+/HPV-, p16-/HPV+, p16-/HPV- und p16+/HPV+ unterschiedliche Verläufe und Prognose aufweisen (Wagner, Wuerdemann et al., 2020; Mehanna et al., 2023; Schalhorn, 2019).

1.2 Die Rolle von HPV bei malignen Erkrankungen

Infektionen mit Bakterien und Viren sind bekannte und relevante Risikofaktoren für die Entstehung maligner Erkrankungen. Weltweit sind die wichtigsten Infektionserreger hierbei *Helicobacter pylori* (36,3 %) und HPV (31,1 %), gefolgt von Hepatitis B (16,3 %) und C (7,1 %). Damit ist HPV der zweithäufigste Infektionserreger, welcher zur Pathogenese von malignen Erkrankungen beiträgt (Szymonowicz et al., 2020). Bis heute sind mehr als 200 HPV-Typen klassifiziert worden. Darunter (mindestens) 12 Hochrisiko-HPV-Varianten einschließlich HPV 16, die für Anogenital-, Gebärmutterhals- und Kopf-Hals-Tumore verantwortlich sind. Insbesondere in der Pathogenese der Zervixkarzinome spielt HPV als nahezu alleinige Ursache der Krankheit eine besondere Rolle (Kobayashi et al., 2018). Das humane Papillomvirus ist ein DNA-Virus, das Epithelien der Haut und die Schleimhäute infiziert. Eine schematische Darstellung des HPV-Genoms, welches aus etwa 7900 Basenpaaren besteht und das für acht Gene kodiert, ist in Abbildung 2 zu sehen.

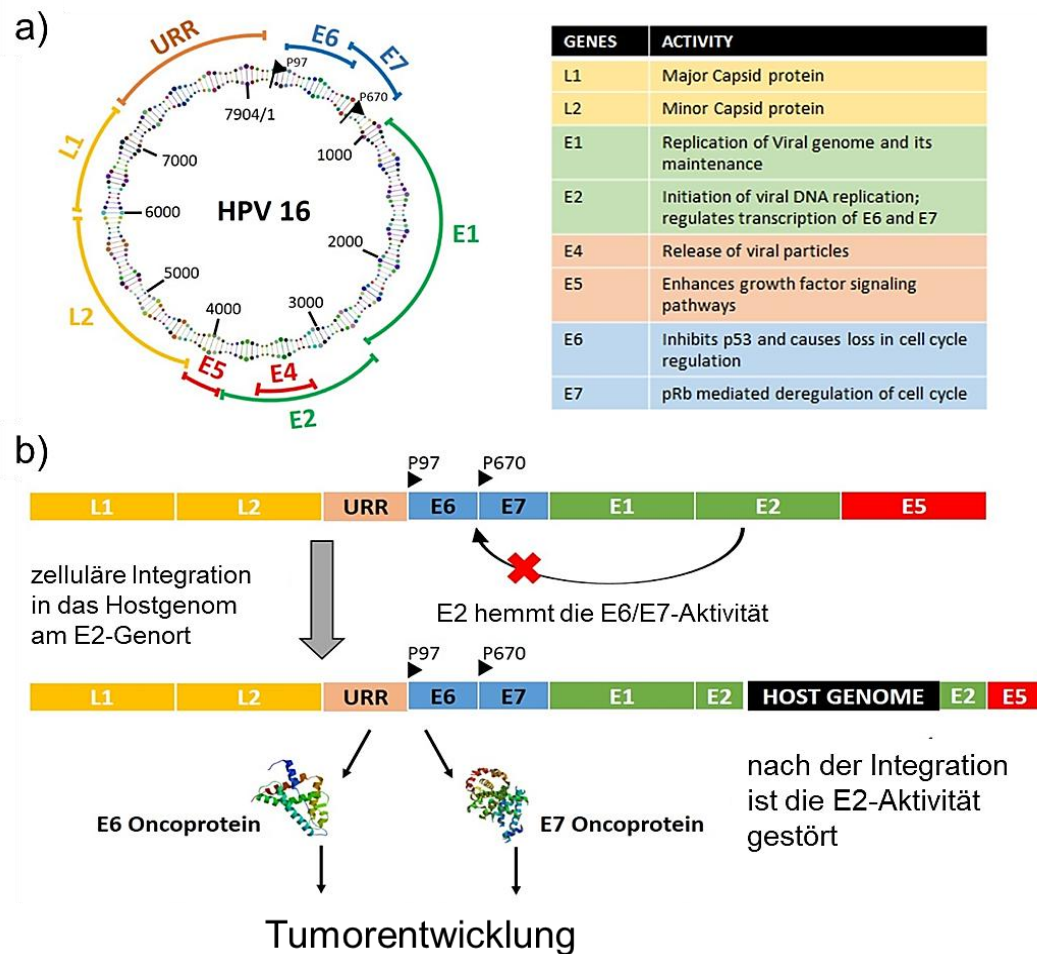


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HPV-Genoms. a) Organisation kodierter Gene und regulatorischer Regionen; b) Proteinstruktur und Expression der onkogenen E6- und E7-Proteine ausgelöst durch Unterbrechung der E2-Aktivität nach Integration des HPV-Genoms in das menschliche Wirtsgenom. Adaptiert von (Pal & Kundu, 2020; freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz).

HPV infiziert undifferenzierte Zellen in der Basalschicht der Epithelien (basale Stammzellen) oder sich vorübergehend teilende Zellen von verletzten Epithelien. Nach der Infektion durchläuft HPV drei Phasen der Replikation: Erstvermehrung, stabile Erhaltung und schließlich produktive Vermehrung durch Produktion von Virionen (Araldi et al., 2018; Dietz et al., 2021; Nakahara et al., 2016; Pan et al., 2018), wie in Abbildung 3 dargestellt (Ferreira et al., 2020). Virionen sind die infektiösen Partikel eines Virus außerhalb einer Wirtszelle. Sie bestehen aus dem genetischen Material des Virus in Form von DNA oder RNA sowie einem aus Protein bestehenden Kapsid, welche die genetische Information schützt und für die Infektion gesunder Zellen benötigt wird.

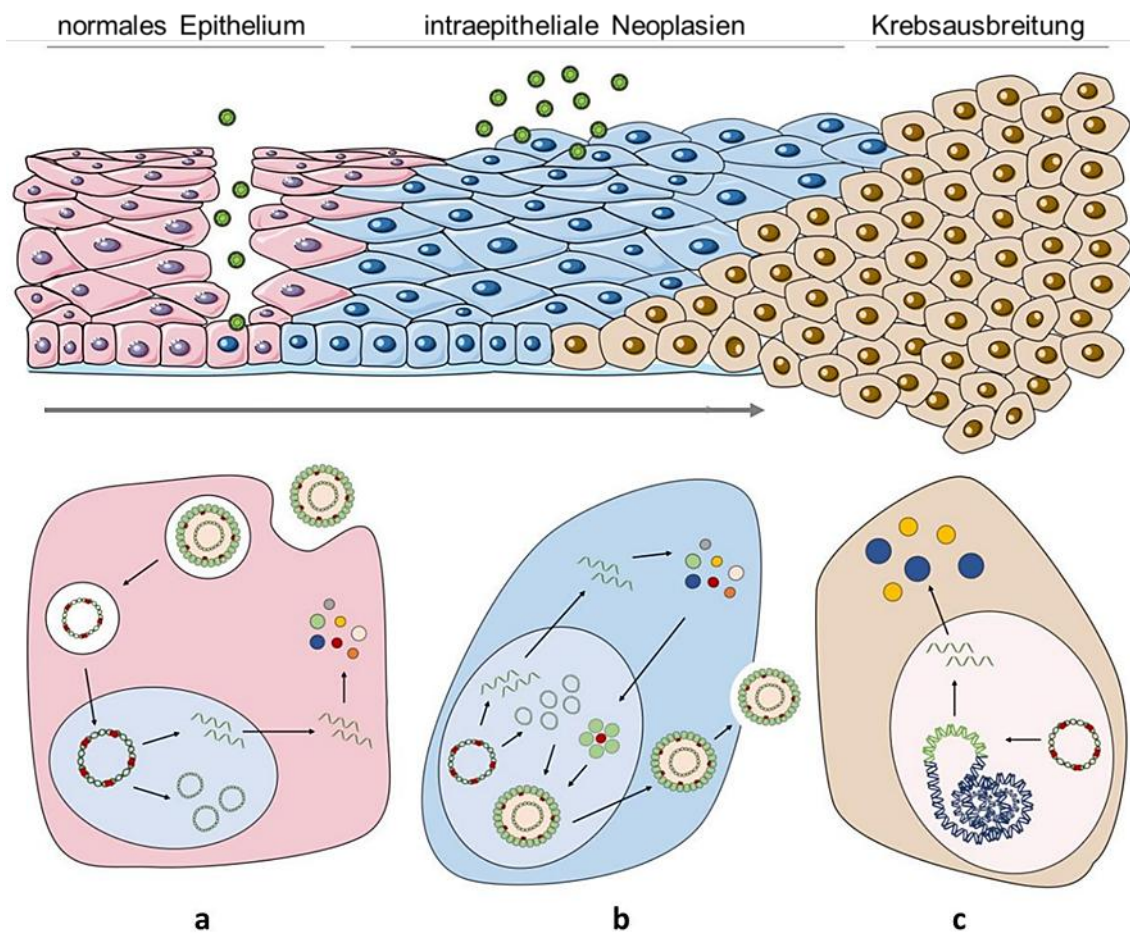


Abbildung 3: Die Phasen des HPV-Reproduktionszyklus und maligne Transformation. Der Reproduktionszyklus von HPV kann grob in zwei Phasen aufgeteilt werden kann: a) Infektion und frühe Transkription; b) Freisetzung des Virus an der Gewebeoberfläche nach der Latenzphase; c) Während der Krebsentstehung kommt jedoch eine dritte Phase hinzu, bei dem HPV in die DNA der Wirtszelle integriert wird und zur malignen Transformation führt. Adaptiert von (Ferreira et al., 2020, freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz).

Wenn HPV die Basalzellen des Epithels erreicht (s. Abb. 2a), binden sich die (*late*, L) L1/L2-Oberflächenproteine des Virus an Rezeptoren der menschlichen Zellen. Das Viruskapsid erfährt daraufhin konformationelle Veränderungen, die es den Viruspartikeln ermöglichen, von den menschlichen Zellen durch Endozytose aufgenommen zu werden. Nach dem Eintritt in die Zelle wird L1 abgebaut und L2 leitet die HPV-Vesikel entlang der Mikrotubuli. Wenn die Kernhülle während der Mitose aufgebrochen wird, werden L2-DNA-Komplexe in den Zellkern transportiert. Im Kern wird die frühe virale Transkription mit der Expression der frühen (*early*, E) Proteine eingeleitet, die wesentlichen Faktoren für die virale DNA-Replikation sind, da sie die zelluläre DNA-Replikationsmaschinerie rekrutieren. E1, E2, E6 und E7 sind die wichtigsten frühen Proteine der viralen Replikationsmaschinerie. Nach der schnellen, vorübergehenden Expression der frühen Proteine tritt das HPV in die sogenannte Latenzphase (stabile

Erhaltung) ein. Die frühen Proteine werden weiterhin nur noch in geringen Mengen exprimiert und nach der anfänglichen Amplifikation werden HPV-Episomen im Zellkern durch Replikation synchron mit der Zellteilung auf niedrigem Niveau aufrechterhalten. HPV-Infektionen entziehen sich dem Immunsystem des betroffenen Körpers durch die Herunterregulierung von NF- κ B und nachgeschalteten Interferon-Signalwegen vom Typ I. Das virale Genom kann jahrelang in den betroffenen Zellen verbleiben und es kann zu einem deutlich späteren Zeitpunkt eine Reaktivierung stattfinden (Araldi et al., 2018; Nakahara & Kiyono, 2016; Pan et al., 2018). HPV-infizierte Zellen behalten ihre Fähigkeit zur Differenzierung und wandern in die oberen Schichten des Epithels. Während die infizierten Basalzellen sich differenzieren und in die oberflächlichen Zelllagen aufsteigen, wird die Virusreplikation abgeschlossen und infektiöse Virionen können freigesetzt werden (s. Abb. 2b).

Die Persistenz des Virus in den Basalzellen kann zur Integration des HPV-Genoms in die DNA der infizierten Zelle führen (s. Abb. 3c) und im Rahmen dessen wird die Aktivität von E2 gestört (s. Abb. 2b). E2 hat hemmenden Einfluss auf die Aktivität von E6 und E7, weshalb die Integration in das Wirtsgenom eine zentrale Rolle in der Karzinogenese der HPV-befallenen Zellen spielt (Ferreira et al., 2020; Wang et al., 2019; Pan et al., 2018).

1.2.1. HPV E6 und E7

Die HPV-Onkogene E7 und E6 führen zur Entstehung von HPV-induzierten Krebserkrankungen. E6 und E7 werden in HPV-infizierten Zellen exprimiert und führen zu einer Inaktivierung der Tumorsuppressor-Proteine p53 und Retinoblastom (RB). Dies führt zu einer Störung der Zellzyklusregulation und somit zu einem unkontrollierten Fortschreiten der Zellteilung, welche zur Karzinogenese beiträgt (s. Abb. 4) (Jimenez Jimenez et al., 2016; Senba & Mori, 2012).

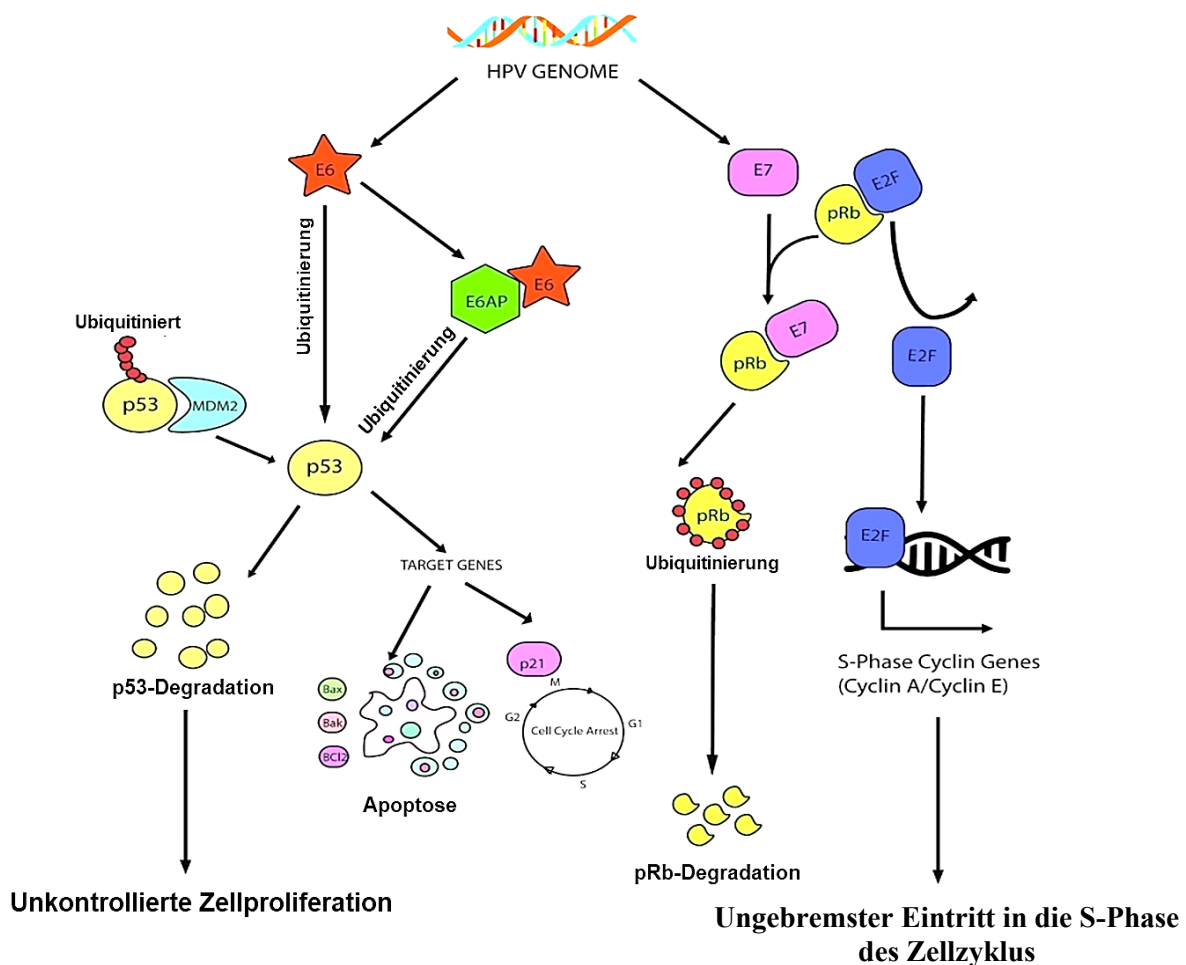


Abbildung 4: Pathophysiologie von E6 und E7 in der Wirtszelle. Die HPV-Proteine E6 und E7 interagieren mit den Tumorsuppressor-Signalwegen pRb und p53 in der Wirtszelle, um den normalen Wachstumsstopp des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase zu überwinden, was zu unkontrolliertem Wachstum der HPV-infizierten Zellen führt. Adaptiert von (Pal & Kundu., 2020; freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz).

Konkret wirkt E6 auf p53 ein, welches ein Hauptregulator der Apoptose ist. Deren Inaktivierung stellt einen wichtigen Bestandteil der Karzinogenese vieler Krebsarten dar. E6 interagiert mit der E3-Ubiquitin-Ligase E6AP und führt zur Ubiquitinierung von p53, d.h. eine kovalente Bindung mit dem Protein Ubiquitin. Das somit „markierte“ p53 wird

daraufhin im 26S-Proteasom abgebaut und es entfällt die Aktivierung von p21, welches den Zellzyklus in der Zellteilung stoppen kann (Huibregtse et al., 1993). Des Weiteren wirkt sich E6 negativ auf die Expression proapoptotischer Proteine wie Bak, FADD und Procaspase 8 aus, sodass der Zellzyklus ungestört fortschreiten kann (Garnett et al., 2006; Thomas et al., 1999)

E7 hingegen interagiert mit dem Retinoblastom-Protein (RB-Protein). Das RB-Protein kontrolliert den G1-Restriktionspunkt des Zellzyklus. Es bindet an E2F-Transkriptionsfaktoren und nach Phosphorylierung von RB durch G1-Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) wird E2F freigesetzt, welches zum Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase führt. E7 kann mit unphosphoryliertem RB interagieren und die Zellen vorzeitig in die S-Phase bringen, indem es die RB-E2F-Interaktion inhibiert (Nguyen et al., 2002; Thomas et al., 1999). Zudem kann E7 an die CDK-Inhibitoren p27 und p21 sowie an Cyclin A/CDK2 binden und so die Zellzyklusprogression weiter fördern (Funk et al., 1997; Tommasino et al., 1993; Zeffass-Thome et al., 1996).

Das Zusammenspiel zwischen E6 und E7 mit den Cyclinen, CDKs und ihren Inhibitoren führt dazu, dass der Zellzyklus ungeachtet der normalen Regulation ungebremsst fortgesetzt wird. Schäden in der DNA, welche bei fehlender Reparatur zur Beendigung des Zellzyklus und Apoptose der Zelle führen, können im Rahmen dieses gestörten Zellzyklus über die Zeit akkumulieren und zur Karzinogenese der Zelle beitragen.

Ein weiteres Merkmal des HPV-16-assoziierten OPSCC ist die reichliche Produktion des p16-Proteins (kodiert durch das Gen CDKN2A). Als „Nebenprodukt“ der Interaktion von E7 mit dem RB-Protein steigt in HPV-assoziierten Tumorzellen die Konzentration des cyclinabhängigen Kinase-Inhibitors p16^{INK4A}, allgemein (und nachfolgend in dieser Arbeit) kurz auch als p16 bezeichnet. Physiologischerweise hemmt p16 die cyclinabhängigen Kinasen 4/6 (CDK4/6), welche für die Phosphorylierung von RB zuständig sind. Durch den Anstieg von p16 wird die Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase gehemmt, da RB in seiner hypophosphorylierten Form aktiv bleibt und E2F inaktiviert. In HPV-positiven Zellen ist RB jedoch unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus durch das virale Onkoprotein E7 direkt inaktiviert. Die Folge ist eine unkontrollierte Aktivierung von E2F und damit eine ungehinderte Zellteilung. Kompensatorisch versucht die Zelle, den unkontrollierten Zellzyklus durch eine vermehrte Expression von p16 zu bremsen, was jedoch aufgrund der funktionellen

Blockierung von RB wirkungslos bleibt (Christin et al., 2013; Geißler et al., 2013; Lim et al., 2014; Munger et al., 2013)

Neuere Erkenntnisse zeigen zudem einen anderen Mechanismus für die p16-Überexpression, welche unabhängig von der E2F-vermittelten Hochregulation ist. E7 induziert hierbei direkt eine zelluläre Seneszenzantwort, unter anderem durch die Aktivierung der Histon-Demethylase KDM6B. Diese wiederum führt zur epigenetischen Reaktivierung des CDKN2A-Gens, das für p16 kodiert. Die p16-Überexpression wirkt aufgrund der Blockierung von RB durch E7 nicht tumorunterdrückend. Stattdessen scheinen die HPV-positiven Tumorzellen auf p16 angewiesen zu sein, um eine für die Zelle toxische Überaktivität von CDK4/6 zu vermeiden. p16 wirkt in diesem Fall paradoxerweise funktionell stabilisierend für die Tumorzelle und es entsteht eine Abhängigkeit gegenüber der p16-Überexpression für die Karzinogenese in HPV-assoziierten Tumoren (McLaughlin-Drubin et al., 2013; Munger et al., 2013).

Eine hohe p16-Akkumulation kann somit in histologischen Präparaten dieser Tumore angefärbt werden und die Assoziation mit HPV darstellen. Bei HPV-negativen Tumoren ist p16 in der Regel durch andere Mechanismen inaktiviert und im Allgemeinen immunhistochemisch nicht oder nur selten nachweisbar (Dietz et al., 2021; Laban et al., 2021; Leemans et al., 2011).

1.3 Die Bedeutung von cfDNA in der Biomarkerforschung bei HPV-positivem OPSCC

Es wurden bei OPSCC über die vergangenen Jahre bereits eine Vielzahl an Genen und Proteinen als mögliche Kandidaten für Biomarker im klinischen Alltag untersucht. Darunter gehören microRNA-182-5p, microRNA-205-5p, Östrogenrezeptor alpha (ERa), Fibroblastenwachstumsfaktor 4 (FGFR4), Cyclin D1, der Apoptose-vermittelte Zelltodregulator BCL-2 und die für die Chromosomenregulation verantwortliche Amplifikation von 11q3. Keines dieser Merkmale hatte sich jedoch als zuverlässiger Biomarker für OPSCC erwiesen (Koole et al., 2015; Kwon et al., 2020; Rainsbury et al., 2013).

Zellfreie DNA (cfDNA) ist ein anderer vielversprechender Kandidat als möglicher Biomarker zur Überwachung des HPV-assoziierten OPSCC. Der Nachweis von cfDNA aus Blutproben wurde erstmals 1948 von Mandel und Metais beschrieben (Mandel & Metais, 1948). Sie wird im Allgemeinen bei der Apoptose oder Nekrose von kernhaltigen

Blutzellen in die Blutzirkulation abgegeben und relativ schnell mit einer Halbwertszeit (HWZ) von etwa 2h abgebaut. Die kurze HWZ bringt als Biomarker den Vorteil, dass Änderungen im Körper des Patienten wie z.B. nach einer Tumorresektion oder eine Vermehrung der Tumorzellen rasch detektiert werden können. Sie birgt aber auch den Nachteil, dass cfDNA instabil ist und spezielle präanalytische Vorbereitungen (wie z.B. spezielle Blutabnahmebehälter) notwendig sind, um diese zuverlässig sammeln und messen zu können (Bronkhorst et al., 2019; Jiang et al., 2006; Ziegler et al., 2002). Die Isolierung von cfHPV-DNA aus sogenannten Liquid Biopsies, wie z.B. Blutproben, gilt bis auf die Blutabnahme als nicht-invasive Diagnostik und lässt sich mit relativem geringem Aufwand durchführen. Liquid Biopsies können auch aus anderen Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Urin, Speichel und Liquor asserviert werden (Bronkhorst et al., 2019; Jiang et al., 2006; Ziegler et al., 2002).

Zellfreie HPV-DNA (cfHPV-DNA) weist aufgrund ihres viralen Ursprungs eine hohe Spezifität auf. Im Gegensatz zu Targets, die auf körpereigener DNA basieren, ist HPV-DNA ausschließlich in infizierten Zellen vorhanden, denn nicht infizierte Zellen enthalten keine viralen DNA-Sequenzen. Die Verwendung körpereigener DNA als Nachweisziel kann hingegen zu falsch-positiven Befunden führen, da entsprechende DNA-Fragmente auch physiologisch in gesunden Zellen vorkommen und während deren Apoptose in die Blutbahn gelangen können. Die Spezifität von cfHPV-DNA im Blut liegt in der Literatur je nach Nachweismethode bei nahe 100% und auch die Sensitivität zeichnet sich in den meisten Studien als sehr hoch ab. Somit lässt sich auch bei geringer Tumorlast die cfHPV-DNA in den Blutproben betroffener Patienten nachweisen (Rettig et al., 2022; Siravegna et al., 2022).

Die cfHPV-DNA von E6 und E7 eignen sich besonders als Target bei HPV-assoziierten OPSCC, da das Vorliegen der Proteinform von E6 und E7 die Aktivität der Zellteilung beschleunigt und somit direkten Einfluss auf das Tumorstadium hat (s. Kapitel 1.2.1.) (Jimenez-Jimenez et al., 2016). Damit sind die beiden Targets stabil im Verlauf der Erkrankung und werden nicht im Rahmen von Selektionsprozessen eliminiert. Bei anderen nicht viral bedingten Tumorentitäten ist die Heterogenität innerhalb der Tumormasse und die ständige Entwicklung im Rahmen von Mutationen ein zentrales Problem für die Anwendung von cfDNA. Hierbei ist es möglich, dass im Laufe der Veränderung des Tumors das zuvor festgelegte Target eliminiert bzw. selektiert wird (Schrack et al., 2021; Sim et al., 2023). Um dieses Problem zu umgehen, müssen

komplexe Genanalysen von nicht-kodierenden DNA-Sequenzen, wie z.B. bei EPIC-seq (*epigenetic expression inference by cell-free DNA sequencing*), mittels Untersuchungsmethoden wie z.B. NGS (*next-generation sequencing*) durchgeführt werden. Dies weist im Vergleich zum Nachweis von viraler cfDNA einen hohen Mehraufwand auf und ist kostenintensiv (Esfahani et al., 2022).

Betrachtet man die aktuelle Literatur, hat sich gezeigt, dass cfHPV-DNA ein vielversprechender Marker bei HPV-assoziierten OPSCC ist. Es existieren Untersuchungen, welche zeigen, dass eine niedrigere Konzentration von cfHPV-DNA vor Therapiebeginn mit einem geringeren Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit sowie mit einem rezidivfreien Überleben nach der Therapie bei Krebspatienten verbunden ist (Dahlstrom et al., 2015; Siravegna et al., 2022). In einigen Fällen wurde Tumorspezifische cfHPV-DNA 19-43 Monate vor der Diagnose nachgewiesen, so dass cfHPV-DNA auch als Screening-Marker für Kopf- und Halskrebs untersucht wird (Rettig, Faden, et al., 2022). Weitere Untersuchungen zeigen, dass cfHPV-DNA mit der Tumorlast und dem Tumorstadium korreliert (Cao et al., 2022; Dahlstrom et al., 2015; Warlown et al., 2022). Näheres hierzu wird in Abschnitt 4 beleuchtet.

Die mögliche Korrelation der Tumorlast mit der Konzentration von cfHPV-DNA und dessen Änderung über die Entwicklung des Tumors macht cfHPV-DNA zu einem interessanten potenziellen Biomarker.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Ziel dieser Arbeit war es, die Verwendbarkeit von zellfreier DNA von HPV-Typ 16 als möglichen Biomarker bei HPV-assoziierten OPSCC im Sinne einer Liquid Biopsy zu überprüfen. Im Speziellen sollte hierbei ein Augenmerk auf die Überwachung des posttherapeutischen Krankheitsverlaufs im Rahmen der Nachsorge gelegt werden. Es wurde hierfür die zirkulierende zellfreie DNA aus Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen isoliert und die des HPV-Subtyps 16 (cfHPV16-DNA) quantitativ bestimmt. Hierzu wurden zur Bestimmung der Konzentration der cfHPV-DNA zwei verschiedene Real-Time-PCR (qPCR)-Methoden angewandt und entsprechende Protokolle optimiert. Verwendet wurden hierbei ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll mit SYBR Green-basierter qPCR und ein neues, für diese Arbeit entwickeltes qPCR-Assay mit Anwendung von TaqMan-Sonden. Es wurden

die Ergebnisse der beiden Methoden sowie die Vor- und Nachteile der beiden Protokolle miteinander verglichen.

Ein weiterer Aspekt, welcher in der Arbeit beleuchtet wurde, ist der Zusammenhang zwischen der Konzentration von cfHPV16-DNA vor Beginn einer zytoreduktiven Therapie und den prätherapeutischen Tumoreigenschaften. Hierbei wurde für die Klassifikation das TNM-System angewendet und das Tumorstadium wurde gemäß UICC (*Union for International Cancer Control, 8th edition*) bestimmt.

Das Hauptziel dieser Arbeit war jedoch, den klinischen Nutzen von cfHPV16-DNA als Biomarker für die frühzeitige Detektion des Fortschreitens bzw. Wiederauftretens der Krankheit zu analysieren. Hierfür wurden Plasmaproben der Patienten nach erfolgter Tumorthherapie im Rahmen der Nachsorge gesammelt und die cfHPV-DNA-Konzentration mit dem klinischen Verlauf verglichen. Die zugrunde liegende Hypothese hierbei war, dass die Konzentration der cfHPV16-DNA im Blut von HPV-assoziierten OPSCC-Patienten im Krankheitsverlauf ansteigt und nach erfolgreicher zytoreduktiven Behandlung wieder abnimmt.

Teile dieser Arbeit, insbesondere die HPV-cfDNA-Messungen mit der TaqMan qPCR-Methode, sind bereits veröffentlicht (Reder, Taferner et al., 2020). Die notwendige Genehmigung für die erneute Veröffentlichung der Ergebnisse in dieser Dissertation liegt vor.

2 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde cfHPV-DNA aus Blutplasma bestimmt. Hierfür existieren unterschiedliche Messmethoden, welche im klinischen Alltag und im Rahmen von Forschungsarbeiten in Verwendung sind. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), auch Echtzeit-PCR genannt, ist die am häufigsten verwendete Methode, da sie einfach anzuwenden und relativ schnell durchzuführen ist. Zudem weist sie eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen auf.

Im Bereich der qPCR-Methoden gibt es unterschiedliche Techniken zur Bestimmung der Signalstärke bzw. der Konzentration des zu untersuchenden Ziel-DNA-Fragments. Es gibt kein Standardverfahren für die Gewinnung von cfHPV-DNA. Welches Assay zur Anwendung kommt, hängt von mehreren Parametern, wie die geplante Nutzung bzw. Fragestellung, der Art der Probe (Blutserum oder Plasma, solide Gewebeproben) und der vorhandenen Infrastruktur, ab (Mauger et al., 2015; Trigg et al., 2018).

„TaqMan“ und „SYBR Green“ sind die am häufigsten verwendeten qPCR-Techniken. Im Rahmen dieser Arbeit kamen beide Arten von qPCR-Assay zur Anwendung und ihre Messergebnisse wurden miteinander verglichen. Der Grund, weshalb zwei verschiedene Techniken verwendet wurden, liegt an den initialen Gegebenheiten und der im Forschungslabor etablierten qPCR-Methode. Zu Beginn der experimentellen Forschungsarbeit war SYBR Green dort die erprobte Methode mit bereits bestehenden PCR-Protokollen. Im Laufe der Experimente wurde aufgrund der Vorteile, welche TaqMan qPCR mit sich bringt, ein neues Protokoll mit hierfür optimierten Primern neu erstellt und optimiert. Auf die Vor- und Nachteile der beiden Methoden wird in Kapitel 4.2 näher eingegangen.

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Proben und klinische Patientenparameter

Das zu untersuchende Probenmaterial war Plasma aus Blutproben von Patienten mit HPV16-assoziierten OPSCC und HPV-negativen OPSCC. Diese wurden bei Studieneinschluss vor Therapiebeginn und nach erfolgter Standardtherapie im Rahmen der regulären Tumornachsorge gesammelt. In der Gruppe der Patienten mit HPV-

assoziierten OPSCC gab es zwei Patienten mit einem Tumorrezidiv, bei denen keine Blutproben vor der Behandlung des Primärtumors verfügbar waren. Bei diesen beiden Fällen wurde die erste verfügbare Probe nach der Behandlung des Primärtumors als Ersatz für die Vorbehandlungsprobe herangezogen, da zum Zeitpunkt der Blutentnahme das Rezidiv der Patienten frisch diagnostiziert war und die Situation sozusagen analog zur primären Erkrankung angesehen werden konnte, bevor die weitere Behandlung des Rezidivs erfolgte.

Die Patientenkohorte mit HPV-negativen OPSCC fungierte als Kontroll-Gruppe und wurde nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Hierbei wurden nur die Proben vor Therapiebeginn untersucht. Die zusätzliche Abnahme posttherapeutischer Proben stellt für die Patienten eine unnötige Belastung dar und war bei fehlendem wissenschaftlichem Mehrwert außerhalb unserer Fragestellung somit nicht vertretbar.

Die Kohorte dieser Arbeit umfasste 30 Patienten mit HPV16-assoziierten OPSCC und 20 Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Alle Patientenproben wurden mit TaqMan qPCR-Assays auf die Konzentration von E6- und E7-cfHPV-DNA untersucht. Mit dem SYBR Green qPCR-Assay wurden Plasmaproben von insgesamt 22 Patienten (HPV-negatives OPSCC: n=5; HPV-assoziiertes OPSCC: n=17) innerhalb der gesamten Kohorte getestet.

Alle Patienten erhielten unabhängig vom HPV-Status eine Standardbehandlung für OPSCC entsprechend der zu diesem Zeitpunkt geltenden Leitlinien. Die Tumorthapien fanden zwischen Juli 2014 und Dezember 2017 am Universitätsklinikum Gießen statt. Das Tumor-Staging wurde gemäß dem TNM-System der *Classification of Malignant Tumours 8th Edition* (Brierley et al., 2017) durchgeführt.

Klinische Informationen wurden aus den Patientenakten und dem örtlichen Krebsregister entnommen. Die Arbeit wurde von dem lokalen institutionellen Prüfungsausschuss der Justus-Liebig-Universität Gießen Fachbereich 11 genehmigt und es wurde eine Prüfung durch die Ethikkommission abgehalten (Referenznummer 95/15).

Die für diese Arbeit verwendete Zelllinie UM-SCC-104 wurde freundlicherweise von Dr. Thomas E. Carey, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

Die verwendeten Materialien, Test-Kits, Geräte und Analysesoftware werden in den Tabellen 3 bis 6 aufgelistet.

Tabelle 3. Liste der kommerziell erhältlichen Test-Kits

Test-Kits	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies Germany GmbH & Co., Frankfurt am Main, Deutschland
p16 ^{INK4A} (E6H4 clone- CINtec Plus)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RDB2270 HPV Easy-typing Kit	Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Deutschland
Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit	Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Kanada

Tabelle 4. Liste der Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cell-Free DNA BCT	Streck, La Vista, NE, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	NEB, Ipswich, MA, USA
Fast SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 5. Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Germany GmbH & Co., Frankfurt am Main, Deutschland
NanoDrop 2000c spectral photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan: QuantStudio™ 3 System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR Green: StepOnePlus System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank -80 °C/-20 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland

Tabelle 6. Liste der verwendeten Analysesoftware

Software	Hersteller
Quant-Studio Design & Analysis Software, version 1.4.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
StepOne™ Software, version 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SPSS statistical software, version 26	IBM, Chicago, IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Definition des HPV-assoziierten bzw. HPV-negativen OPSCC

Der HPV-Status der jeweiligen OPSCCs wurde im Rahmen der klinischen Routinediagnostik in der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen an Proben des Primärtumors durch immunhistochemische Färbung von p16 (E6H4 Klon; Roche Diagnostics) bestimmt. Hierbei erfolgte auch der Nachweis von HPV-DNA mittels PCR und reverser Hybridisierung mit dem RDB2270 HPV Easy-Typisierungskit (Autoimmun Diagnostika GmbH). Ein HPV-assoziiertes OPSCC wurde definiert durch die gleichzeitige Positivität für p16 und Hochrisiko-HPV16-DNA. Das HPV-negative OPSCC wurde entsprechend durch Negativität sowohl für p16 als auch für jegliche HPV-DNA definiert. OPSCC-Patienten mit diskordanten Testergebnissen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

2.2.2 Probensammlung und Isolierung zellfreier DNA

Vollblut von 50 Patienten wurde vor der Erstbehandlung und von 30 Patienten (HPV-assoziierte OPSCC) nach der erfolgten Standardbehandlung entnommen. Um die Patientenadhärenz zu erhöhen und den klinischen Alltag besser darzustellen, erfolgte die Probensammlung im Rahmen der regulär geplanten klinischen Kontrolltermine ohne eigens für Forschungszwecke festgelegte Abnahmezeitpunkte.

Das Blut wurde in speziellen Blutsammelröhrchen, cf-DNA BCT (Streck), entnommen, welche für die präanalytische Stabilisierung von cfDNA entwickelt wurden und laut Angaben des Herstellers eine Stabilität der cfDNA für 7 Tage bei Temperaturen zwischen 15 und 30 °C ermöglichen. Die Proben wurden möglichst innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme bei 515g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wurde gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die zellfreie DNA wurde aus 500 µL Plasma mit dem Plasma/Serum Cell-Free

Circulating DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die cf-DNA wurde in 30 µL Elutionspufferlösung des Kits eluiert. Dieses Eluat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei $\leq -20\text{ °C}$ gelagert.

2.2.3 Real-Time-PCR

Die quantitative PCR ist eine molekulare Technik, die häufig eingesetzt wird, wenn ein spezifisches DNA-Ziel (*target*) nachgewiesen und/oder quantifiziert werden muss. Die Messmethode zur Bestimmung der Konzentration eines DNA-Targets beruht dabei auf einem Fluoreszenz-Signal, welches während der Amplifikationszyklen der PCR entsteht und zugleich gemessen wird. Die üblichsten Methoden zur Erzeugung des Fluoreszenzsignals sind die Verwendung spezifischer Hydrolyse-Sonden, wie TaqMan-Sonden oder eines Farbstoffs, welcher interkalierend an doppelsträngige DNA bindet (z.B. SYBR Green) (Holland et al., 1991; Schneeberger et al., 1995).

TaqMan verwendet eine fluorogene, einzelsträngige Oligonukleotidsonde, welche an die DNA-Sequenz zwischen den beiden festgelegten Primern bindet. Die Sonde wird von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der TaqMan-Polymerase während der Synthese des neuen DNA-Stranges gespalten und hierbei wird ein Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Der Farbstoff wird, solange er an die Sonde gebunden ist, durch ein weiteres gebundenes „quenching“-Molekül unterdrückt. Die Stärke des Fluoreszenz-Signals ist hierbei von der Konzentration der Target-Sequenz abhängig und steigt somit mit jedem Amplifikationszyklus der PCR an. Unter Verwendung von Standard-Proben mit bekannten Konzentrationen kann schließlich unter Berücksichtigung der Zyklen-Anzahl und Signalstärke auf die Konzentration der Target-Sequenz (z.B. cfDNA von E6 oder E7) geschlossen werden.

Das SYBR Green qPCR-Assay funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, jedoch weist die Methode entscheidende Unterschiede auf. Im Gegensatz zu TaqMan-Fluoreszenzsonden interkaliert der SYBR Green-Farbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA und im Rahmen dieser Bindung wird nach Absorption von Licht ein Fluoreszenzsignal freigegeben. Die Signalstärke hängt hierbei von der Menge des interkalierenden SYBR Green-Farbstoffs ab und wird somit im Rahmen der Amplifikation von DNA mit jedem PCR-Zyklus höher. Jedoch kann ohne eine weitere Analyse nicht zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten unterschieden werden. Der gewünschte Gen-Abschnitt wird hierbei mittels der Primer definiert, welche

im Rahmen der PCR an den 5'- und 3'-Enden des Zielgens binden. Zur Überprüfung, ob das amplifizierte Produkt dem gesuchten Zielgen entspricht, wurden bei Etablierung des PCR-Assays Gelelektrophoresen zur Darstellung der spezifischen Länge der DNA-Abschnitte durchgeführt (Holland et al., 1991; Schneeberger et al., 1995). Die Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufs der PCR, welche für die Entstehung des Fluoreszenz-Signals unter Verwendung von TaqMan und SYBR Green verantwortlich ist.

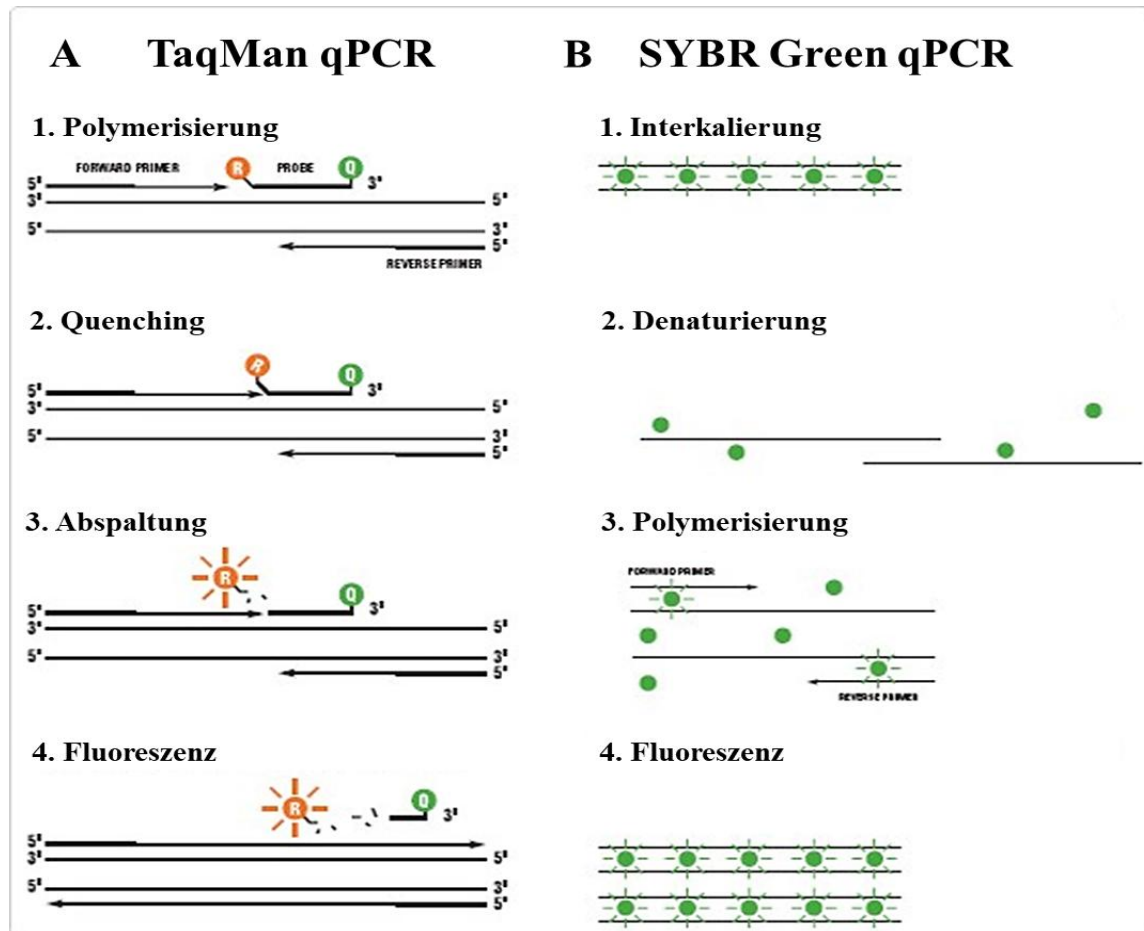


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Mechanismen des Fluoreszenzsignals für die Messung der DNA-Menge durch qPCR-Analyse mit TaqMan (A) und SYBR Green (B). A: Die Sonde hybridisiert an die komplementäre DNA-Zielsequenz (1), wobei das Fluoreszenzsignal durch den Quencher blockiert wird (2). Während der DNA-Polymerisation wird die Sonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten (3), wodurch der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt wird und die Signalunterdrückung aufgehoben wird. Nach Anregung durch Licht entsteht ein messbares Fluoreszenzsignal (4). B: Der SYBR Green-Farbstoff interkaliert zwischen der doppelsträngigen DNA (1). Denaturierung des DNA-Strangs und Dissoziation von SYBR Green von der DNA im Rahmen des PCR-Zyklus (2). Nach Annealing der Primer mit der komplementären DNA-Zielsequenz wird die Amplifikation ermöglicht (3). Erneute Interkalierung von SYBR Green mit Entstehung des Fluoreszenzsignals nach Lichtstimulation durch das PCR-Gerät (4). A: R (orange Kugel ohne Strahlen), reporter; R (orange Kugel mit Strahlen), reporter mit Abgabe Fluoreszenzsignal; Q (grüne Kugel mit Q), Quencher; B: SYBR Green Farbstoff (grüne Kugel); SYBR Green Farbstoff mit Abgabe Fluoreszenzsignal (grüne Kugel mit Strahlen); Adaptiert von: Thermo Fisher Scientific (o. D.): TaqMan™ vs. SYBR™ chemistry in real-time PCR. URL: <https://www.thermofisher.com/ch/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>, (Zugriffsdatum: 23.07.2025)

Für die quantitative Messung der cfHPV-DNA in dieser Arbeit mittels qPCR wurden beide Methoden (SYBR Green und TaqMan) angewandt. Die hierfür entwickelten Protokolle werden in folgendem Abschnitt (2.2.3.1) ausführlich beschrieben.

2.2.3.1 qPCR-Protokolle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Labor bereits etablierte PCR-Protokolle weiter optimiert und für TaqMan-basierte qPCR neue entwickelt, da diese bisher nicht im Labor zur Anwendung kamen.

Die TaqMan-basierte qPCR wurde mit dem Luna Universal Probe qPCR Master Mix (NEB) mit einem Endvolumen von 15 µl pro Reaktion in Triplikaten durchgeführt. Das Referenzgen β -Globulin (bzw. Beta-Globulin) diente zur Kontrolle der DNA-Integrität jeder Probe und half bei der Interpretation, ob die PCR-Reaktion erfolgreich stattgefunden hat. Weiterhin wurden negativ-Proben ohne DNA als Kontrolle verwendet. Kurz zusammengefasst wurde der 2x Luna Universal Probe qPCR Master-Mix auf 1x durch Zugabe von Primern, Sonden, 4µl DNA-Template und Wasser verdünnt (Endkonzentrationen: 200 nmol/l für E6 und E7 Primer, 300 nmol/l für β -Globulin Primer und 166 nmol/l für die Sonden). PCR-Primer und Sonden wurden von Sigma-Aldrich (Darmstadt) synthetisiert. Deren DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

TaqMan Primers	Sequenz	°C	bp
HPV16 E6 forward primer	5'-GCACCAAAAGAGAACTGCAATG-3'	55,1	81
HPV16 E6 reverse primer	5'-GTTTGCAGCTCTGTGCATAACTG-3'	56,9	
HPV16 E6 probe	5'-JOE-AGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC-BHQ1-3'	65,8	
HPV16 E7 forward primer	5'-CAGCTCAGAGGAGGAGGATG-3'	56,7	67
HPV16 E7 reverse primer	5'-GTAATGGGCTCTGTCCGGT-3'	54,0	
HPV16 E7 probe	5'-FAM-AGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG-BHQ1-3'	66,7	
β -Globulin forward primer	5'-GACACCATGGTGCATCTGAC-3'	56,1	137
β -Globulin reverse primer	5'-TTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTGT-3'	56,0	
β -Globulin probe	5'-TAMRA-AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTG-BHQ2-3'	63,8	

SYBR Green Primers	Sequenz	°C	bp
HPV16 E6 forward primer	5'-AGCGACCCAGAAAGTTACCA-3'	59,0	134
HPV16 E6 reverse primer	5'-GCATAAATCCCGAAAAGCAA-3'	54,9	
HPV16 E7 forward primer	5'-CAGCTCAGAGGAGGAGGATG-3'	59,0	115
HPV16 E7 reverse primer	5'-GCACAACCGAAGCGTAGAGT-3'	60,7	
β -Globulin forward primer	5'-GGAGAAGTCTGCCGTTACTGC-3'	61,0	111
β -Globulin reverse primer	5'-TTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTGT-3'	59,8	

Tabelle 7. Primer- und SONDENSEQUENZEN MIT SCHMELZTEMPERATUR (°C) UND AMPLIKONLÄNGE DES qPCR-ASSAYS. BHQ, Black-Hole-Quencher-Farbstoff; FAM, Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff); HPV16, Humanes Papillomvirus Typ 16; JOE, 6-Carboxy-4',5'-Dichlor-2',7'-Dimethoxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff); qPCR, quantitative PCR in Echtzeit; TAMRA, Carboxytetramethylrhodamin (Fluoreszenzfarbstoff); °C, Schmelztemperatur; bp, base pair (Amplikonlänge)

Die optimale Annealing-Temperatur von 59 °C wurde durch eine Gradienten-PCR ermittelt. Die Zyklusbedingungen während der PCR waren: 95 °C für 1 min, gefolgt von 48 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95 °C in der Denaturierungsphase und 30 Sekunden bei 59 °C im Rahmen der Annealing- und Elongationsphase.

Die SYBR Green-basierte qPCR wurde mit dem Fast SYBR Green Master Mix (ThermoFischer) mit einem Endvolumen von 15 µl pro Reaktion ebenfalls in Triplikaten durchgeführt. Das Referenzgen β -Globulin wurde hier ebenso als Marker für die DNA-Integrität in den Proben verwendet. Insgesamt wurde der Mastermix auf 1x verdünnt, indem 1,5 µl cDNA-Template und jeweils Vorwärts- und Rückwärtsprimer für E6/E7 oder β -Globulin in Endkonzentrationen von 166 nmol/l pro PCR-Reaktion sowie ggf. Wasser zugegeben wurde. Die verwendeten Primersequenzen für die SYBR Green-basierte qPCR (s. Tab. 7) wurden nach Smeets et al., 2007; Wald et al., 2011a, 2011b adaptiert. Diese Oligonukleotide wurden ebenso von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

Auch im Rahmen des SYBR Green-Assays wurde zuvor eine optimale Annealing-Temperatur mittels einer Gradienten-PCR bestimmt und es wurden anschließend folgende Zyklusbedingungen verwendet: 50 °C gefolgt von 95 °C für jeweils 2 Minuten, anschließend 45 Zyklen mit 20 Sekunden bei 57 °C und 1 Minute bei 72 °C. Nach den PCR-Zyklen wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelzkurven wurden mit Messungen zwischen 70-90 °C im Abstand von 0,2 °C erstellt. Die PCR-Zyklusbedingungen sind sowohl für TaqMan- als auch für SYBR Green-basierte qPCR in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Reagenzien und Zyklusbedingungen pro Reaktion für TaqMan- und SYBR Green-basierte qPCR-Tests für die Detektion von HPV E6- und E7-cfDNA.

qPCR-Bedingungen	TaqMan			SYBR Green		
Reagenzien pro Reaktion						
Mastermix	1X-Konzentration			1X-Konzentration		
jeweilige Forward- und Reverse-Primer	200nmol/l für E6/E7 300nmol/l für β -Globulin			166nmol/l für E6/E7 166nmol/l für β -Globulin		
Sonde	166nmol/l			keine		
DNA-Template	4 μ l			2,5 μ l		
Endvolumen	15 μ l			15 μ l		
Zyklusschritte	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	1 min	1	50 °C 95 °C	2min 2min	1 1
Denaturierung, Annealing und Elongation	95 °C 59 °C	15 sec 30 sec	48	95 °C 57 °C 72 °C	20 sec 20 sec 1 min	45
Schmelzkurve				95 °C 70 °C 70-90 °C	15 sec 1 min -	1 1 jede 0,2 °C

2.2.3.2 Datenvalidierung und Berechnung der Konzentration der Virus-DNA

Die Daten der qPCR wurden mit QuantStudio Design & Analysis Software v1.4.3 (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Messwerte wurden als valide angesehen und weiter ausgewertet, wenn folgende Kriterien erfüllt wurden: Von den Kontrollen mittels β -Globulin mussten mindestens zwei Triplet-Messungen erfolgreich sein, d.h. der ct-Wert über dem der Standardprobe von einer Kopie DNA pro Reaktion und eine Standardabweichung von 0,25 oder weniger vorliegen. Waren zwei oder mehr der Triplet-Messungen sowohl für das Zielgen der HPV-DNA und der Kontrolle β -Globulin nicht auswertbar oder außerhalb der o.g. Kriterien, so wurde diese Messung als nicht valide angesehen und nicht gewertet. Wenn jedoch β -Globulin erfolgreich nach o.g. Kriterien gemessen wurde, ohne dass eine valide Messung des Zielgens der HPV-DNA vorlag, dann wurde die Probe als HPV-negativ gewertet. Hierbei wurde eine cfHPV-DNA Konzentration von 0 Kopien pro Milliliter Plasma (K./ml) definiert.

Zur Berechnung der Konzentration der cfHPV-DNA in Kopien/ml Plasma müssen sowohl bei TaqMan qPCR als auch bei SYBR Green qPCR Referenzproben mit bekannten Konzentrationen, während jedes PCR-Durchlaufs parallel mit den Proben quantifiziert werden. Zur Erstellung dieser Standard-Proben wurde die Zelllinie UM-SCC-104 verwendet. Diese Zelllinie trägt eine Kopie des humanen Papillomvirus und

wurde unter Standardbedingungen kultiviert (RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin, beide von Sigma-Aldrich und 10% fetalem Rinderserum, 5% CO₂, bei 37 °C). Die Zelllinie wurde vor den Tests als frei von Mykoplasmen getestet und wurde im Juli 2019 authentifiziert. Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert und mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Die gemessene DNA-Konzentration wurde berechnet und angegeben in Kopien des diploiden menschlichen Genoms (eine Kopie entspricht 6,61 pg). Die extrahierte DNA wurde anschließend auf 1, 10, 100, 1000 und 10.000 Kopien pro Reaktion verdünnt, welches hochgerechnet auf das Volumen einer Blutprobe $2,5 \times 10^2$, $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^6$ Kopien pro Milliliter entspricht (Abb. 6).

Die Größe der Amplicons wurde überprüft mittels gelelektrophoretischer Trennung (14% Polyacrylamid 0,5x Tris-Borat-EDTA Gelen) und Färbung der DNA (Midori Green Advance DNA Stain, Nippon Genetics Europe GmbH), als auch unter Verwendung einer Kapillargelelektrophorese mit dem High Sensitivity DNA Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co.).

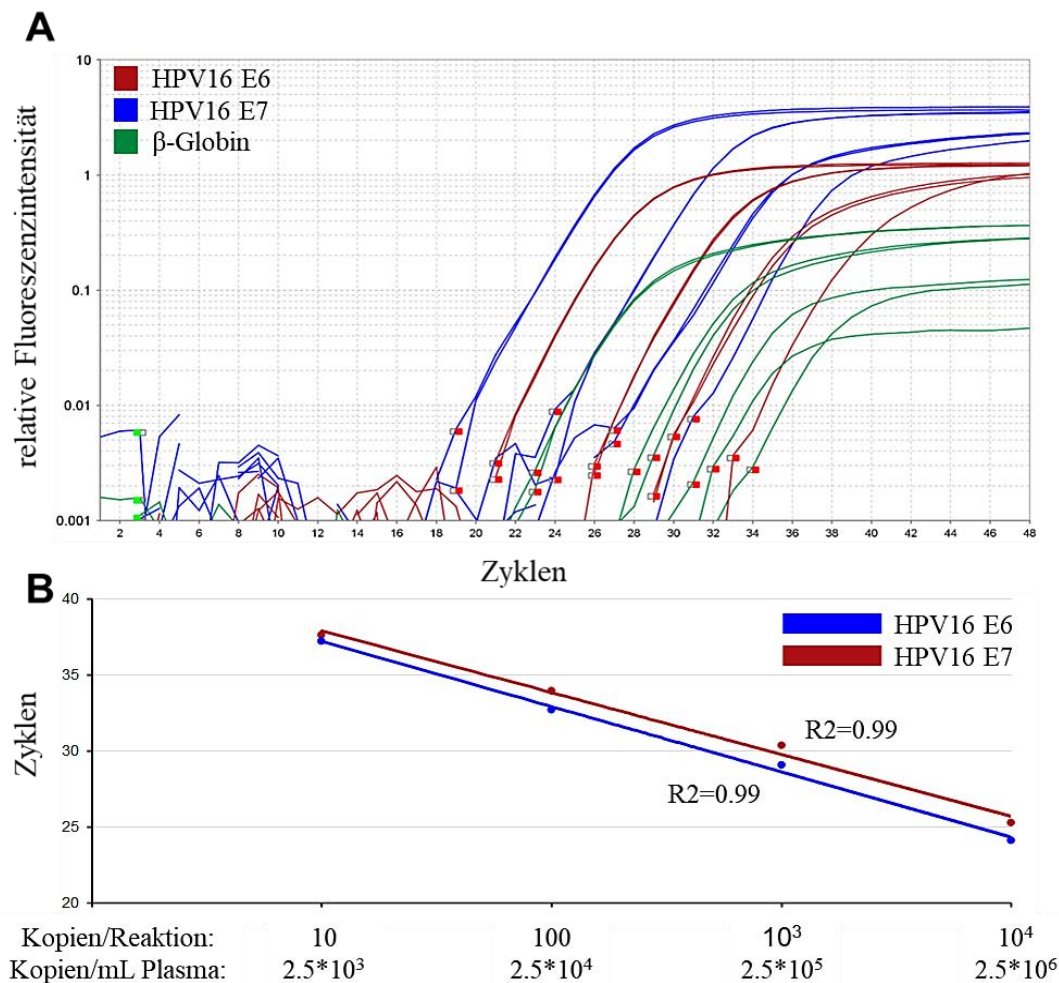


Abbildung 6: Quantitative Echtzeit-PCR-Amplifikationskurve (A) der seriellen Verdünnung des Standards und entsprechende Best-Fit-Linie (B) mit Bestimmungsmaß.

Die Anzahl der Zyklen ist gegen die relative Fluoreszenzintensität (A) oder die Anzahl der Kopien des humanen Papillomvirus (HPV)-Genoms in der Reaktion bzw. pro ml Plasma (B) aufgetragen. rot, HPV-Typ 16 (HPV16) E6; blau, HPV16 E7; grün, β-Globulin. Angepasst von Daten auch präsentiert in (Reder, Taferner et al., 2020)

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 26 (IBM) durchgeführt. Qualitative und quantitative Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Datensätze und mit dem Wilcoxon-Rang-Test für unabhängige Proben verglichen. Eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) wurde für den Zusammenhang des HPV-Status des OPSCC und den Konzentrationen von E6- und E7-cfDNA durchgeführt (s. Kap. 3.2.). Ein Schwellenwert für E6- und E7-cfDNA-Positivität wurde auf das Maximum des Youden-Index festgelegt. Bei p-Werten $\leq 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen von cfHPV-DNA in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC präsentiert. Es wird hierbei zuerst auf die Auswahl des Schwellenwertes zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Ergebnissen eingegangen und anschließend werden die ermittelten Werte gezeigt. Konkret werden die cfHPV-DNA-Konzentrationen aus den prätherapeutisch gesammelten Proben, gemessen mit SYBR Green und TaqMan qPCR, mit den Tumorcharakteristika verglichen. Anschließend wird der Unterschied zwischen prä- und posttherapeutischen Proben bei OPSCC-Patienten mit fehlender residualer Erkrankung präsentiert. Patienten mit residualer Erkrankung, als Folge eines Rezidiv-Geschehens oder einer progredienten Tumorerkrankung, werden gesondert betrachtet.

Im Anschluss an die Darstellung der Daten von SYBR Green und TaqMan qPCR werden beide Methoden miteinander verglichen.

3.1 Beschreibung der Patientenkohorte

Die Patientenkohorten, welche in HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC-Gruppen aufgeteilt wurden, ähnelten sich mit einem Durchschnittsalter von 61 gegenüber 65 Jahren und die Patienten waren zwischen 46 und 92 Jahre alt. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen war etwa 4:1 mit mehr als 80 % männlichen Patienten. Das Tumorstadium und der Metastasierungsgrad waren bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ähnlich. Eine detaillierte Darstellung der Tumormerkmale (einschließlich Tumorgrad, Lymphknotenstatus) sowie Patientenbeschreibungen (wie Alter, Rauchen, Alkoholkonsum, durchgeführte Therapien) findet sich in der nachfolgenden Tabelle 9.

Tabelle 9. Patienten- und Tumormerkmale der in dieser Arbeit untersuchten HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC-Proben.

		HPV-assoziiert		HPV-negativ		p-Wert
Alter (Jahre)	Median	64.9		59.9		0.181*
	Durchschnitt	65.1		61.3		
	Max.	91.7		75.2		
	Min.	47.3		46.5		
		n	[%]	n	[%]	
Alter	≥60 Jahre	18	60%	10	50.0%	0.485
	<60 Jahre	12	40%	10	50.0%	
Geschlecht	männlich	24	80.0	17	85.0	0.724 [#]
	weiblich	6	20.0	3	15.0	
T-Status	T1-T2	22	73.3	11	55.0	0.180
	T3-T4	8	26.6	9	45.0	
N-Status	N0	3	10.0	6	30.0	0.195
	N1	9	30.0	5	25.0	
	N≥2	18	60.0	9	45.0	
M-Status	M0	25	83.3	16	80.0	1.000 [#]
	M1	5	16.6	4	20.0	
UICC 8th Edition	1	11	36.7	2	10.0	0.012
	2	9	30.0	2	10.0	
	3	3	10.0	3	15.0	
	4	7	23.3	13	65.0	
Rauchen	ja (≥10 py)	13	46.4	18	90.0	<0.001
	nein	15	53.6	0	-	
	fehlend	2	-	2	10.0	
Alkoholkonsum	ja (≥2 Gläser/Tag)	2	9.1	5	38.5	0.075 [#]
	nein	20	90.9	8	61.5	
	fehlend	8	-	7	-	
Palliative Therapie	ja	4	13.3	2	10.0	1.000 [#]
	nein	26	86.7	18	90.0	
Definitive Radiochemotherapie (kuratives Setting)	ja	6	23.5	2	11.1	0.292
	nein	20	76.9	16	89.9	
Operation	ja	19	63.3	15	70.0	0.386
	nein	11	36.7	5	30.0	

p-Werte für den Vergleich von HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC (asymptotisch, zweiseitig) berechnet mit dem Chi-Quadrat-Test, sofern nicht anders angegeben. * Berechnet mit dem t-Test. # Berechnet mit dem Fisher-Exakt-Test; p-Werte mit statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$) sind fett gedruckt.

Betrachtet man den Vergleich zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC, fällt auf, dass sich bezüglich des Rauchverhaltens und des Tumorstadiums nach UICC ein Unterschied mit statistischer Signifikanz erkennen lässt. Dies deckt sich mit den in der Literatur bereits bekannten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen und es wird hierzu in der Einleitung und dem Diskussionsteil weiter darauf eingegangen (Ang et al., 2010; Lewis et al., 2010).

3.2 Optimierung der qPCR-Verfahren

Für die Bestimmung des optimalen Schwellenwertes der Konzentration von cfHPV-DNA, um zwischen HPV-assoziierten (HPV+) und HPV-negativen (HPV-) Proben zu differenzieren, wurde eine ROC (*receiver operator characteristic*)-Kurve erstellt.

Die ROC-Kurven-Analyse ist eine statistische Methode, die zur Bewertung der Diskriminationsfähigkeit eines Tests zwischen zwei Gruppen (hier definiert durch den HPV-Status des OPSCC) Anwendung findet. Hierbei wird die „Sensitivität“ gegen „1 minus der Spezifität“ des Tests bei verschiedenen Messwerten und bekannter Gruppenzugehörigkeit der Daten in einer Grafik aufgetragen (Sensitivität = y-Achse, 1 minus Spezifität = x-Achse). Zur Bestimmung des optimalen Schwellenwertes wird der Youden-Index aus der ROC-Kurve herangezogen. Der Youden-Index wird berechnet, indem die Sensitivität und Spezifität für jeden Schwellenwert subtrahiert wird und hierbei der maximale Wert gesucht wird (s. Tab. 10). Ein hoher Youden-Index zeigt an, dass der Test eine gute Diskriminationsfähigkeit zur Unterscheidung zweier Gruppen (z.B. HPV+ vs. HPV-) aufweist. In der graphischen Darstellung befindet sich dieser Punkt an der Stelle der Kurve, die sich maximal links und maximal oben im Diagramm befindet. Neben dem Youden-Index stellt der AUC-Wert (*area under the curve*) als Fläche unter der ROC-Kurve ein Maß für die Leistungsfähigkeit eines binären Klassifizierungsmodells dar. Die AUC-Werte für SYBR Green entsprachen $AUC = 0,971$ (E6 und E7) und für TaqMan $AUC = 0,910$ (E6) und $AUC = 0,901$ (E7). Ein AUC-Wert von 1 bedeutet, dass das Modell perfekt zwischen den zwei Klassen unterscheidet, während ein Wert von 0,5 darauf hinweist, dass das Modell nicht besser als der Zufall ist. Die ROC-Kurven mit den jeweiligen AUC-Werten sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die Analyse der Sensitivität und Spezifität der Assays wurde mit 22 Proben (17 HPV+, 5 HPV-) für SYBR Green und 50 Proben (30 HPV+, 20 HPV-) für TaqMan durchgeführt.

Tabelle 10. Koordinaten der ROC-Kurven (s. Abb. 7) von HPV E6- und E7-cfDNA (Kopien/ml) aus prätherapeutisch gewonnenen Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem und HPV-negativem OPSCC, die mittels A) TaqMan und B) SYBR Green real-time-qPCR gemessen wurden.

A Koordinaten der ROC-Kurve: TaqMan					B Koordinaten der ROC-Kurve: SYBR Green				
Variable(n) für Testergebnis	Y-Achse		X-Achse		Variable(n) für Testergebnis	Y-Achse		X-Achse	
	Sensitivität	1 - Spezifität	Youden-Index			Sensitivität	1 - Spezifität	Youden-Index	
E6 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,00	1,000	1,000	,000	E6 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,0000	1,000	1,000	,000
	8,50	,867	,200	,667		3,2400	,941	,000	,941
	25,50	,867	,150	,717		11,2450	,882	,000	,882
	35,39	,867	,100	,767		17,0700	,824	,000	,824
	36,89	,833	,100	,733		19,9600	,765	,000	,765
	66,94	,833	,050	,783		22,0400	,706	,000	,706
	153,67	,800	,050	,750		22,6150	,647	,000	,647
	220,92	,767	,050	,717		28,8300	,588	,000	,588
E7 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,00	1,000	1,000	,000	E7 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,0000	1,000	1,000	,000
	45,53	,833	,150	,683		5,8150	,941	,000	,941
	103,03	,833	,100	,733		17,2250	,882	,000	,882
	129,00	,800	,100	,700		28,1650	,824	,000	,824
	169,00	,800	,050	,750		36,1350	,765	,000	,765
	272,31	,800	,000	,800		61,3100	,706	,000	,706
	365,04	,767	,000	,767		87,2150	,647	,000	,647
	390,19	,733	,000	,733		103,1200	,588	,000	,588

In den roten Boxen wird das Maximum des Youden-Index mit den dazugehörigen Konzentrationen dargestellt. Die Konzentration stellt den Schwellenwert zur Differenzierung zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen Proben dar. Die vollständige Tabelle lässt sich im Anhang finden.

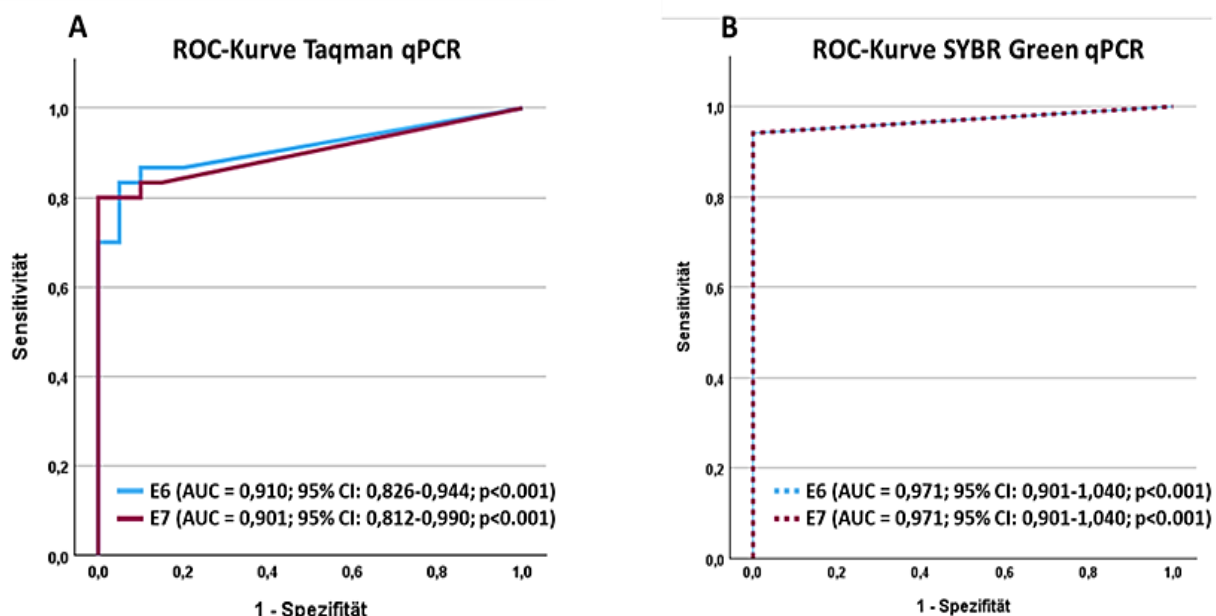


Abbildung 7: Darstellung der ROC-Kurven-Analyse von HPV E6- und E7-cfDNA (Kopien/ml) aus prätherapeutisch gewonnenen Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem und HPV-negativem OPSCC, die mittels A) TaqMan und B) SYBR Green real-time-qPCR gemessen wurden. Die Werte der Fläche unter der Kurve (AUC), die durch die ROC-Kurven für E6 und E7 ermittelt wurden, sind hierbei in der Grafik dargestellt. CI: Konfidenzintervall

Gemäß dem ermittelten Youden-Index für das TaqMan-Assay (s. Tab. 10, A) wurde der Schwellenwert als *Cut-off* für HPV-positive Proben bei E6 = 67 Kopien/ml und bei E7 = 272 Kopien/ml festgelegt. Für das SYBR Green-Assay (s. Tab. 10, B) wurde der *Cut-off* für E6 = 3,24 Kopien/ml und für E7 = 5,81 Kopien/ml festgelegt. Diese auf der ROC-Analyse basierenden Schwellenwerte wurden für die weitere Untersuchung der Patientenproben angewendet.

Sowohl für das TaqMan-Assay als auch das SYBR Green-Assay sind die AUC-Werte größer 0,9 (s. Abb. 7) und zeigen somit an, dass beide Assays eine hohe diagnostische Leistungsfähigkeit zur Differenzierung zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Proben aufweisen.

3.3 Zeitliche Probenverteilung während der Therapiephase und der Nachsorgephase

Die Plasmaproben wurden von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC vor der Behandlung und während der Nachuntersuchung gewonnen. Von Patienten mit HPV-negativen OPSCC wurden lediglich prätherapeutische Proben untersucht. Betrachtet man die Ergebnisse der prätherapeutischen Proben von dieser Patientengruppe, zeigt sich, dass mittels der SYBR Green qPCR 0/5 Patienten ein positives Ergebnis aufweisen. Bei der TaqMan PCR sind es 1/20 Patienten mit positivem cfHPV-Nachweis. Abbildungen 8 und 9 geben einen Überblick über die Zeitpunkte der Probenentnahme und die Ergebnisse des Nachweises von HPV je qPCR-Assay von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC. Die hierbei dargestellten Fallnummern (Y-Achse) in den Abbildungen 8 bis 10 entsprechen jeweils denselben Patienten. In Abbildung 10 werden nur die Proben dargestellt, welche sowohl mit SYBR Green qPCR als auch TaqMan qPCR gemessen wurden. Die mediane Zeit zwischen der prätherapeutischen Probe und der ersten entnommenen Nachsorgeprobe beträgt 4,6 Monate (Bereich 1,1 bis 10,3 Monate nach Ende der Behandlung). Im Durchschnitt wurden 3,4 (min.: 1, max.: 7) Nachsorgeproben im Median von 7,15 (Bereich 0,23 bis 28,7) Monaten nach Ende der Behandlung entnommen.

Abbildung 8 zeigt, dass die prätherapeutischen Proben von 16/17 Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC ein positives qPCR-Ergebnis im SYBR Green-Assay aufwiesen. Nach Ende der initialen zytoreduktiven Therapie zeigte sich bei allen Nachsorgeproben von 9/17 Patienten ein negatives Ergebnis entsprechend dem zuvor festgelegten Grenzwert. Bei 3/17 Patienten zeigten dagegen alle posttherapeutischen Proben ein

positives PCR-Ergebnis. Bei den restlichen 5/17 Patienten präsentierte sich ein Mischbild mit sowohl negativen als auch positiven Nachsorgeproben. Auf einzelne hierbei gezeigte Verläufe mit Darstellung der cfHPV-DNA-Konzentration wird in späteren Kapiteln eingegangen.

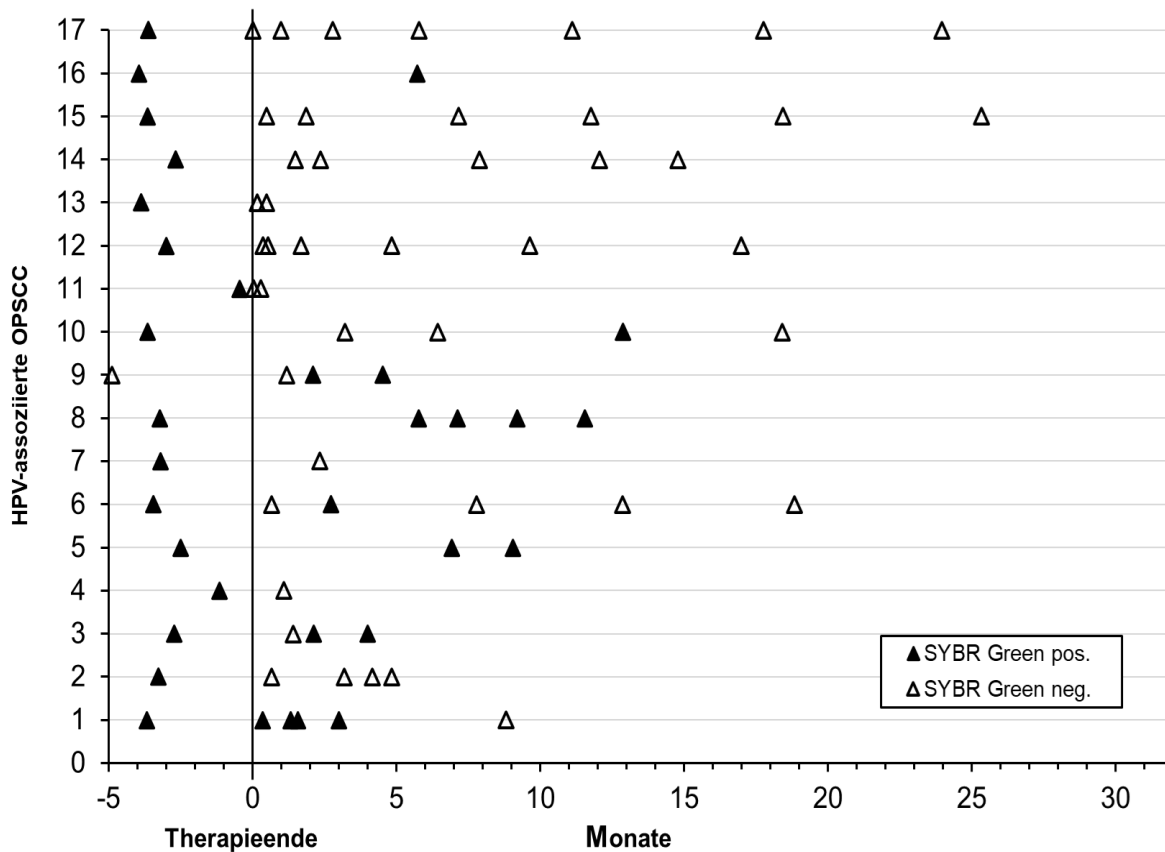


Abbildung 8: qPCR-Nachweis von HPV-cfDNA mittels SYBR Green-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte. Schwarz gefüllte Symbole entsprechen einem positiven Nachweis von HPV-cfDNA. Ungefüllte Symbole spiegeln ein negatives Ergebnis wider. Y-Achse: HPV-assoziierte OPSCC, n=17. X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Monaten mit 0 als Ende der initialen zytoreduktiven Therapie.

In Abbildung 9 werden die Zeitpunkte der Probenentnahme und die Ergebnisse der qPCR im TaqMan-Assay darstellt.

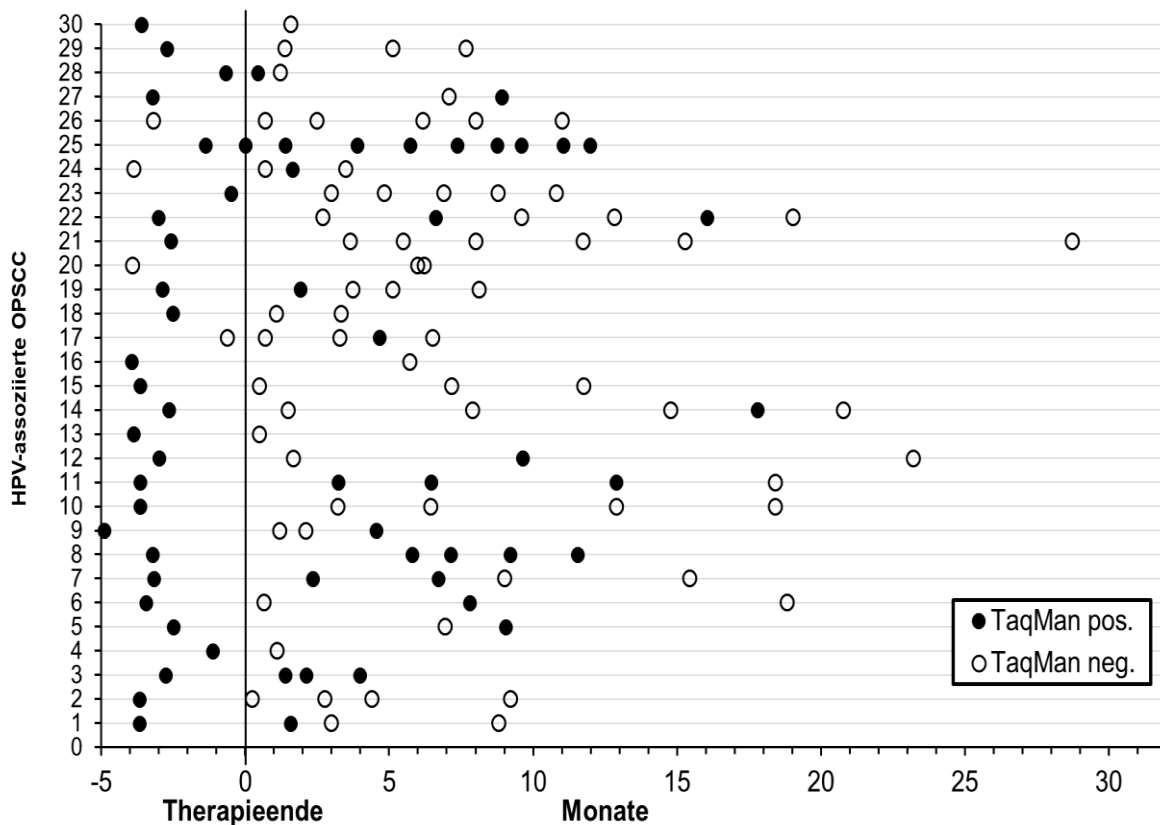


Abbildung 9: qPCR-Nachweis von HPV-cfDNA mittels TaqMan-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte. Schwarz gefüllte Symbole entsprechen einem positiven Nachweis von HPV-cfDNA. Ungefüllte Symbole spiegeln ein negatives Ergebnis wider. Y-Achse: HPV-assoziierte OPSCC, n=30. X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Monaten mit 0 als Ende der initialen zytoreduktiven Therapie.

Zusammengefasst wiesen unter Verwendung des TaqMan-Assays 26/30 der prätherapeutischen Proben von HPV-assoziierten OPSCC Patienten ein positives Ergebnis auf. Nach Ende der initialen Therapie war bei 22/30 Patienten die erste posttherapeutische Probe negativ und bei 13/30 Patienten verblieben alle untersuchten Nachsorgeproben mit einem negativen Ergebnis. Bei 3/30 Patienten zeigten sich alle Proben im Verlauf nach Therapie positiv und bei 14/30 Patienten präsentierte sich ein Mischbild mit sowohl negativen als auch positiven Nachsorgeproben. Die Patienten mit Mischbild in den Nachsorgeproben wiesen im Vergleich zu den prätherapeutischen Proben jedoch deutlich verminderte Konzentrationswerte auf (s. in Kapitel 3.4.2). Die Patienten 20 und 26 präsentierten sich mit sowohl prä- als auch posttherapeutisch negativen Proben. Beide Patienten erhielten eine kurative Therapie und zeigten keine Fernmetastasierung.

In Abbildung 10 werden die Zeitpunkte der Probenentnahme und die Ergebnisse der Patienten gezeigt, welche mit beiden qPCR-Assays getestet wurden.

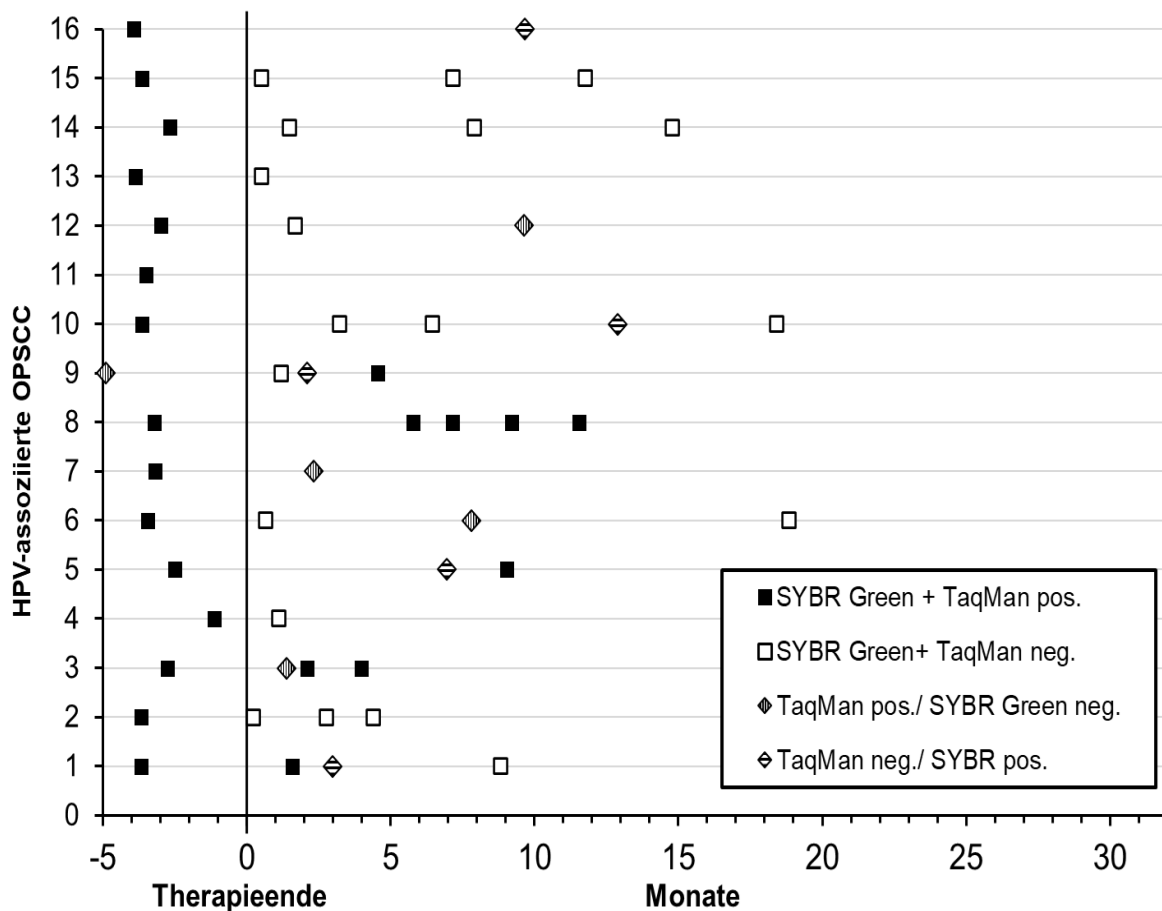


Abbildung 10: qPCR-Nachweis von cfHPV-DNA mittels SYBR Green- und TaqMan-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte. Weiß gefüllte Symbole spiegeln ein negatives Ergebnis wider. Linien-gefüllte Symbole zeigen Proben mit diskrepanten Ergebnissen (pos./neg.) zwischen den zwei verwendeten Assays (TaqMan/SYBR Green). Y-Achse: HPV-assoziierte OPSCC, n=16. X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Monaten mit 0 als Ende der initialen zytoreduktiven Therapie.

Hierbei präsentierten 15/16 der prätherapeutischen Proben bei beiden Methoden ein positives Ergebnis. Einzig eine prätherapeutische Probe war im TaqMan-Assay positiv und im SYBR Green-Assay negativ. 9/16 der ersten Proben nach initialem Therapieende waren bei beiden Methoden negativ und es verblieben bei 4/16 Patienten alle Nachsorgeproben negativ. Nur Patient 8 wies mittels beider Methoden ein positives Ergebnis für alle Proben auf. Es folgt in diesem Bezug eine genaue Betrachtung dieses Patienten und des Konzentrationsverlaufs der cfHPV-DNA in Kapitel 3.2.2, Abbildung 29. Die restlichen Patienten (9/16) zeigten ein diskrepantes Ergebnis bei den Nachsorgeproben. Nähere Untersuchungen mit Vergleich beider Methoden finden sich in Kapitel 3.6.

3.4 Detektion von cfHPV-DNA mittels TaqMan qPCR-Assay und Assoziation mit den Tumorcharakteristika

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse und Auswertungen der gemessenen Daten unter Verwendung von TaqMan qPCR präsentiert. Es werden hierbei die in Kapitel 3.3 gezeigten Nachweise von cfHPV-DNA in prätherapeutisch gewonnenen Proben genauer beleuchtet. Zur Darstellung des Unterschiedes zwischen HPV-assoziierten (n=30) und HPV-negativen OPSCC (n=20) werden die Konzentrationen von HPV-DNA zwischen den beiden Gruppen verglichen. (Kapitel 3.4.1)

Als nächstes wird in der Gruppe der HPV-assoziierten OPSCC versucht, einen Zusammenhang zwischen der cfHPV-Konzentration der prätherapeutischen Plasmaproben und bestimmten Tumorcharakteristika herzustellen. In der Literatur konnte hierbei bereits eine Assoziation zwischen der Tumorlast und der Konzentration von cfHPV-DNA dargestellt werden. Hierauf wird im Verlauf in der Diskussion weiter eingegangen.

Anschließend werden die prä- und posttherapeutischen Proben von HPV-assoziierten OPSCC Patienten ohne residuale Erkrankung nach der initialen Behandlung gegenübergestellt.

3.4.1 Vergleich des cfHPV-Nachweises mittels TaqMan qPCR-Assay zwischen HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC

In der Patientengruppe mit HPV-negativem OPSCC wies lediglich 1/20 Patient einen E6- und E7-cfHPV-DNA-Wert über den zuvor ermittelten Schwellenwerten (Abschnitt 3.2) auf und wurde somit mit positivem Nachweis gewertet. Dagegen wurde bei 85,7 % (26/30) der HPV-assoziierten OPSCC vor der Behandlung cfHPV-DNA nachgewiesen. In Abbildung 11 wird der Unterschied der cfHPV-Konzentration zwischen HPV-negativem und HPV-assoziiertem OPSCC dargestellt. Hierbei zeigte sich der Unterschied der beiden Gruppen bzgl. der Konzentration als statistisch signifikant (E6: $p < 0,001$; E7: $p < 0,001$).

In der Gruppe der HPV-assoziierten OPSCC wurden zwei Patienten eingeschlossen, welche bei der ersten Probenentnahme bereits eine bekannte residuale Erkrankung aufwiesen. Diese beiden Patienten erlitten ein Rezidiv nach initialem Therapieansprechen, sodass vor der ersten zytoreduktiven Therapie keine Proben asserviert werden konnten. Als „prätherapeutischer“ Zeitpunkt der Probenentnahme

wurden daher für diese Arbeit die Proben zum Zeitpunkt des Rezidivs vor Beginn einer erneuten Therapie definiert.

Die TaqMan-Analyse des Plasmas von HPV-assoziierten OPSCC- Patienten vor der Therapie zeigt, dass sowohl E6 als auch E7 cfHPV-DNA in den Blutproben zuverlässig

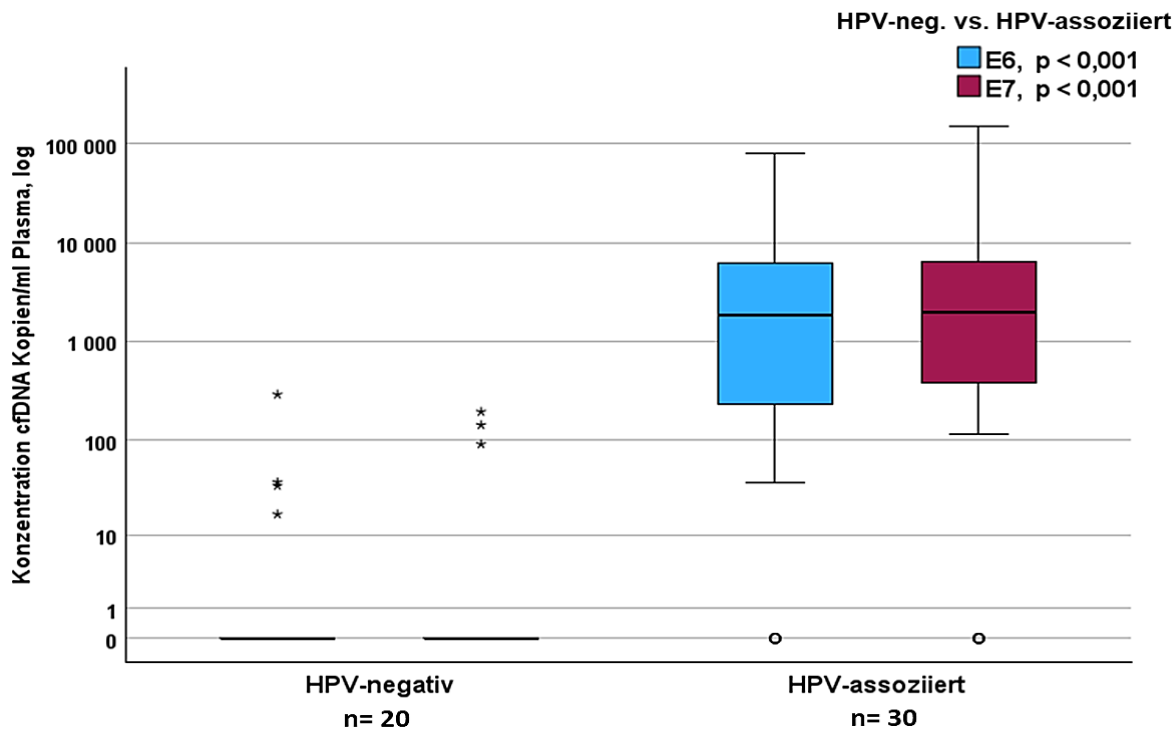


Abbildung 11: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt durch TaqMan qPCR in prätherapeutischen Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem ($n=30$) und HPV-negativem ($n=20$) OPSCC. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p : Mann-Whitney-U-Test. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert.

nachgewiesen werden konnten. Zudem weisen die Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC wie erwartet im Vergleich zu den HPV-negativen OPSCC-Patienten eine wesentlich höhere Konzentration der cfHPV-DNA auf.

Es folgt der Konzentrationsvergleich von cfHPV-DNA prätherapeutischen Proben von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC unterteilt nach Tumorcharakteristika. Diese entsprechen dem TNM-Status und der Stadieneinteilung nach UICC (8th edition).

Zuerst werden zwei Gruppen stratifiziert nach Größe des Primärtumors (T1-2 versus T3-4) verglichen (s. Abb. 12).

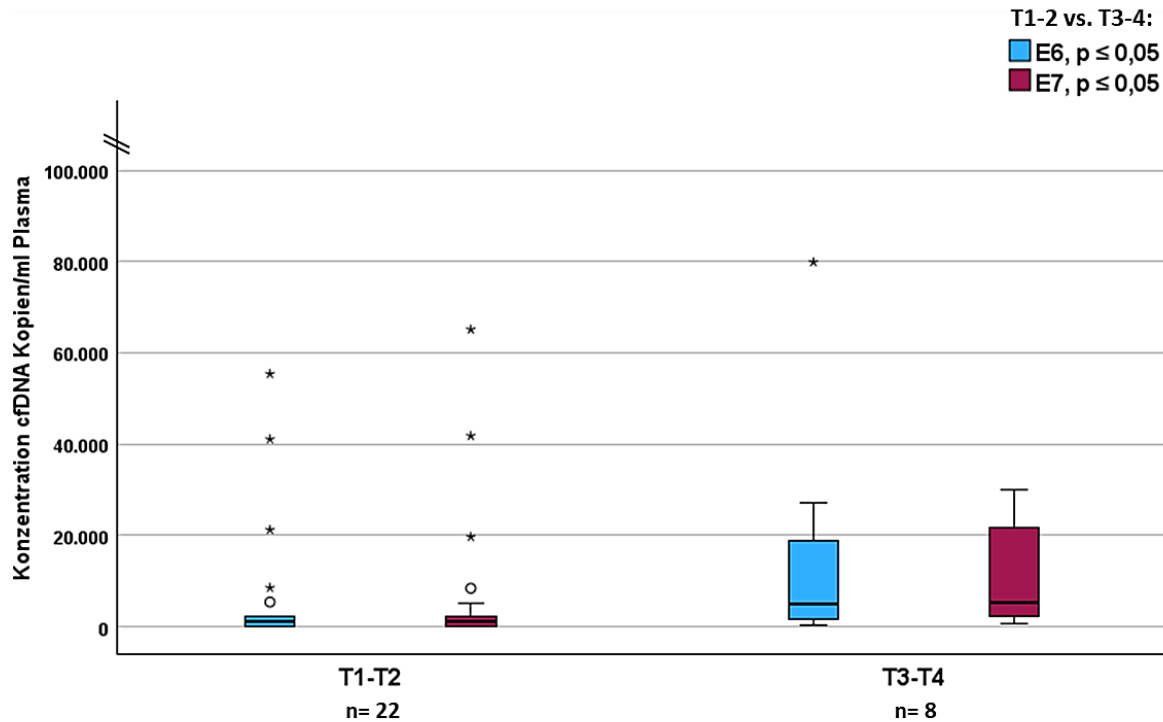


Abbildung 12: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt durch TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Tumorgöße (T1-2 versus T3-4). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt p: Mann-Whitney-U-Test. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert

Hinsichtlich der Tumorgöße waren die medianen Kopienzahlen von E6- und E7-cfHPV-DNA pro ml Plasma bei Patienten mit größeren Tumoren (T3-4) signifikant höher als bei kleineren Tumoren (T0-1), (E6: $p = 0,035$; E7: $p = 0,031$).

In Abbildung 13 wird der Vergleich der Konzentrationen, unterteilt nach dem Lymphknotenbefall (N0-1 versus $N \geq 2$) dargestellt. Es zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. der Konzentration der cfHPV-DNA. Somit ließ sich keine Korrelation zwischen der Lymphknotenmetastasierung und der cfDNA-Konzentration darstellen.

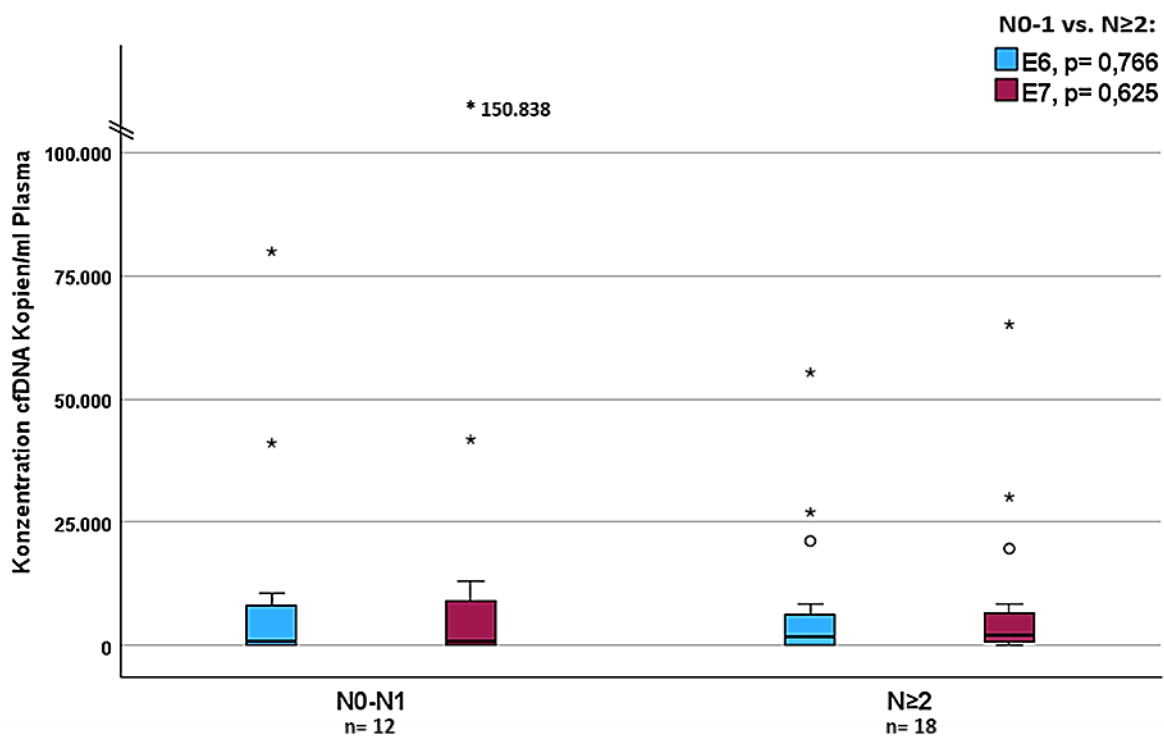


Abbildung 13: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach dem Lymphknotenstatus (N0-1 versus N≥2). Daten dargestellt als Median ± Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert.

Als nächstes wurden die Konzentrationen bzgl. des Vorliegens von Fernmetastasen bzw. deren Abwesenheit verglichen (M0 vs. M1) (s. Abb. 14).

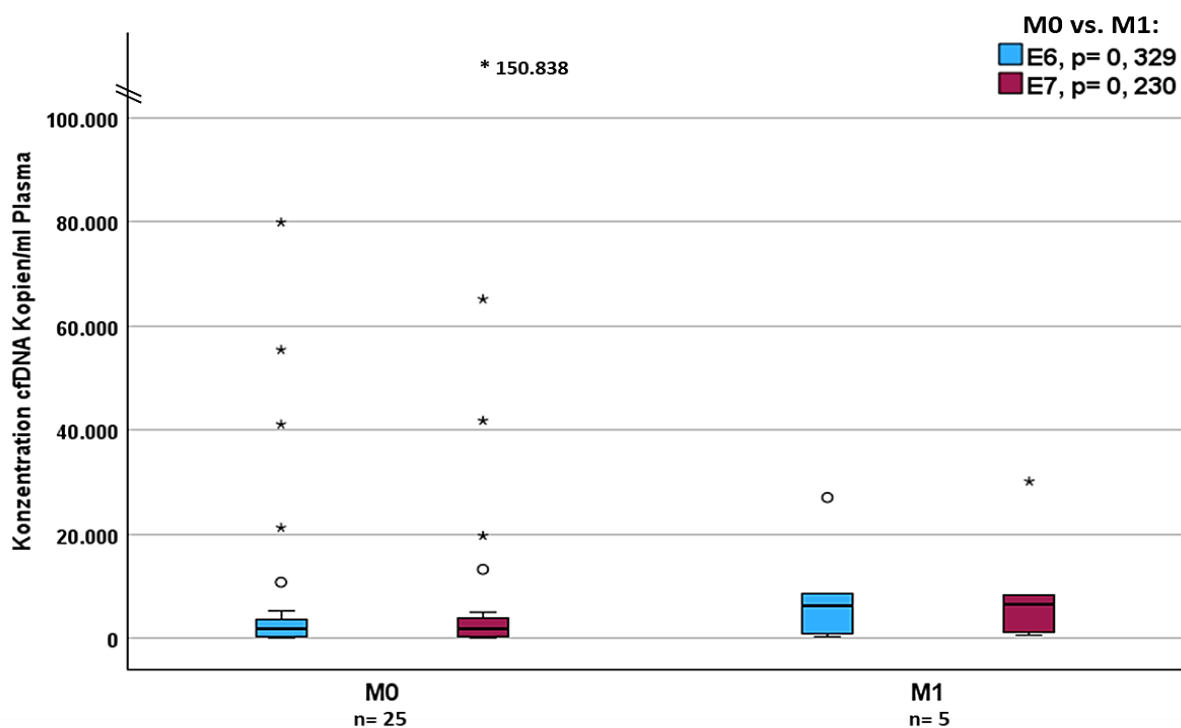


Abbildung 14: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Fernmetastasen (M0 versus M1). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert.

Es zeigte sich zwischen den beiden Gruppen, dass die medianen Werte von E6 und E7 cfHPV-DNA bei den Patienten mit metastasiertem Tumorstadium höher liegen als bei fehlender Fernmetastasierung. Der Unterschied der Konzentration zeigt sich hierbei jedoch nicht als statistisch signifikant.

In Abbildung 15 werden die zu vergleichenden Gruppen nach dem Tumorstadium entsprechend der UICC (8th edition) stratifiziert. Es zeigte sich zwischen den beiden Gruppen (UICC I-II versus UICC III-IV) ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. der Konzentration der cfHPV-DNA.

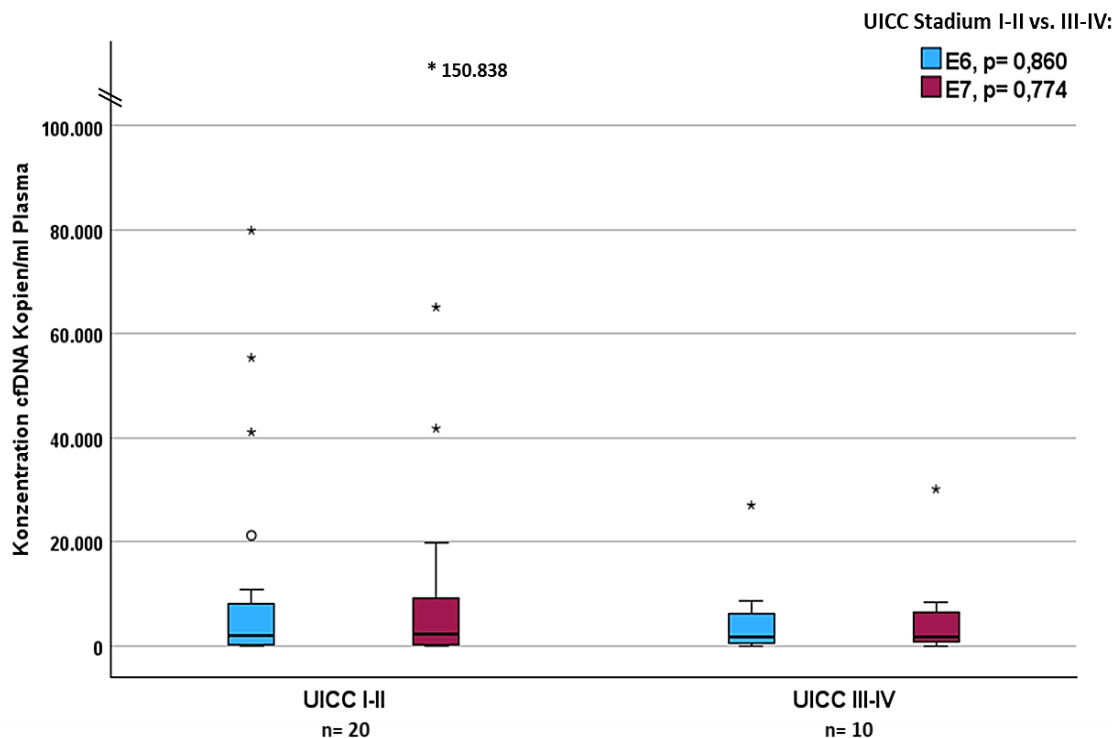


Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach UICC-Tumorstadien (I-II versus. III-IV). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt p: Mann-Whitney-U-Test.

Alles in allem unterschied sich die E6- als auch die E7-cfDNA-Kopienzahl pro Milliliter Plasma lediglich signifikant in Bezug auf die Tumorgroße. Plasmaproben von Patienten mit großem HPV-assoziierten Primärtumor (T3-4) wiesen höhere E6- und E7-cfDNA-Spiegel auf als Proben von Patienten mit kleineren Tumoren (T1-2). Dagegen zeigte sich

zwischen den Patientengruppen stratifiziert nach dem Lymphknotenstatus, der Fernmetastasierung oder den UICC-Tumorstadien kein statistisch signifikanter Unterschied in der Konzentration von E6- und E7-cfDNA. Somit lässt sich im Gegensatz zum T-Status in dieser Patientenkohorte bzgl. der anderen Charakteristika kein Zusammenhang zwischen der Tumorlast und der cfHPV-DNA-Konzentration nachweisen. Die Ergebnisse und deren Bedeutung werden in späteren Kapiteln diskutiert und mit der Literatur verglichen.

3.4.2 TaqMan-qPCR für den Vergleich zwischen prä- und posttherapeutischen Proben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen

Im nächsten Schritt wurden die cfDNA-Konzentrationen von E6 und E7 in den Nachsorgeproben von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC untersucht und mit entsprechenden prätherapeutischen Werten verglichen (s. Abb. 16). Es wurden hierbei vorerst die Patienten untersucht, welche bei den Routineuntersuchungen der Nachsorge keine klinischen oder bildgebenden Anzeichen einer residualen Erkrankung aufwiesen.

Die Nachsorgeproben wurden hierbei in drei Zeitabschnitte aufgeteilt und dargestellt: ≤ 6 Monate, 6-12 Monate und länger als 12 Monate nach Therapieende. Aufgrund der inhomogenen Verteilung der Probenabnahmen in der Nachsorge sind jedoch nicht alle Patienten in jedem Zeitabschnitt vertreten (siehe Verteilung Abb. 9).

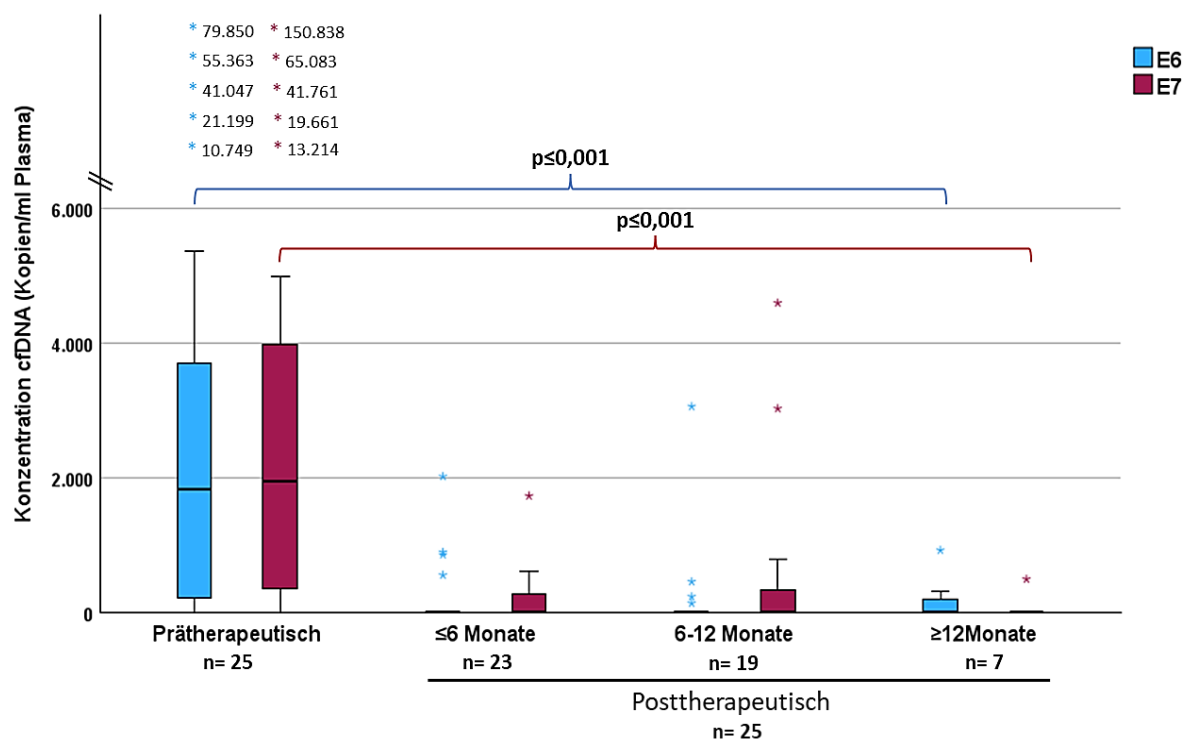


Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC ohne klinisch nachweisbare residuale Tumorerkrankung. Die Nachsorgeproben sind in drei Zeiträumen zusammengefasst. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test. Anteile der Daten wurden auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert.

Es zeigt sich im Vergleich zu den prätherapeutischen Proben eine wesentlich niedrigere Konzentration von E6- und E7-cfDNA in allen posttherapeutischen Zeitabschnitten. Der Unterschied zum Ausgangswert erwies sich hierbei für alle drei Zeitabschnitte als statistisch signifikant (E6: $p < 0,001$; E7: $p < 0,001$).

Der Unterschied in der Konzentration von E6- und E7-cfDNA zwischen prätherapeutischen und posttherapeutischen Proben lässt sich auch zusammenfassend in Abbildung 17 zeigen.

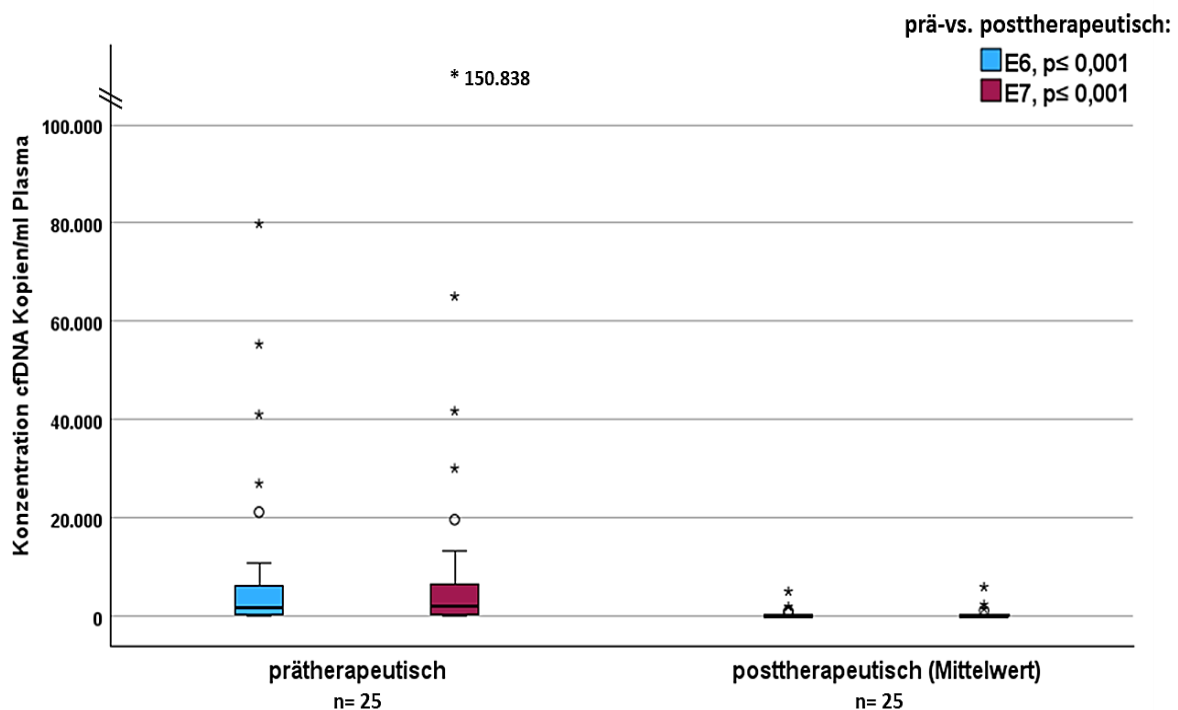


Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung. Die Werte der „Nachsorgeproben“ beziehen sich auf die in Abb. 10 genannten Durchschnittswerte aus drei verschiedenen Zeiträumen von weniger als sechs Monaten bis zu mehr als einem Jahr nach der Therapie. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Hierbei zeigte sich, dass die durchschnittliche E6-cfDNA-Konzentration vor Therapiebeginn 9198 Kopien pro ml Plasma (Bereich 0-79850) betrug. Im Vergleich hierzu präsentierte sich posttherapeutisch eine niedrigere Konzentration der cfHPV-DNA als Mittelwert mit 359 (Bereich 0-5037). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erwies sich hierbei als statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ebenso sank die mittlere Konzentration von E7-cfDNA in den Proben von 12138 (0-150838) Kopien pro ml Plasma vor der Therapie auf 435 (0-5944) nach der Therapie. Dieser Unterschied erreicht ebenso ein Niveau der statistischen Signifikanz ($p < 0,001$).

3.5 SYBR Green-qPCR-basierte Analyse von cfHPV-DNA in HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Bestimmung von E6- und E7-cfDNA bei Patienten mit HPV-assoziiertem und HPV-negativem OPSCC unter Verwendung des SYBR Green qPCR-Assays gezeigt. Hierbei wurden die Proben entsprechend den Untersuchungszielen wie bei der TaqMan qPCR in Kapitel 3.4 untersucht. Zur Unterscheidung zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Proben anhand der Messwerte des SYBR Green Assays wurden die in Abschnitt 3.2 genannten Schwellenwerte angewendet (E6 = 3,24 Kopien/ml und E7 = 5,81 Kopien/ml Plasma).

In Abbildung 18 werden die Konzentrationen von cfHPV-DNA zwischen HPV-assoziierten (n=17) und HPV-negativen (n=5) OPSCC-Patienten verglichen.

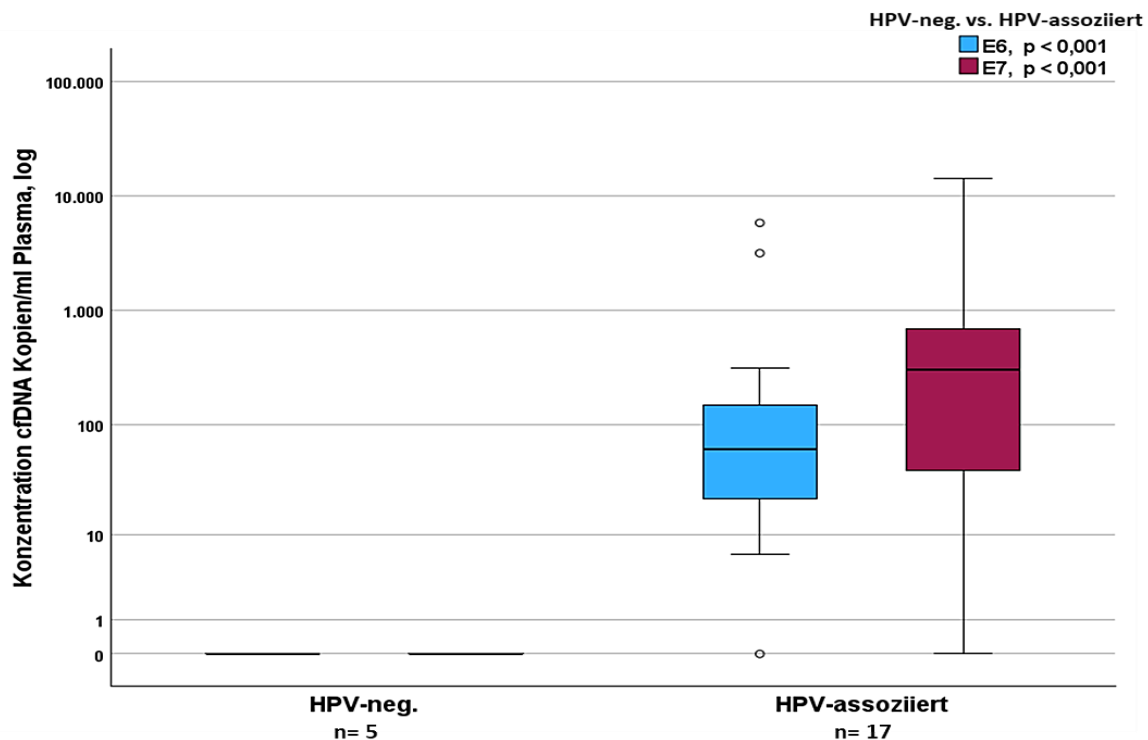


Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), die mittels SYBR Green qPCR-Assay in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-positivem und HPV-negativem OPSCC vor Therapiebeginn nachgewiesen wurden. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile mit logarithmischer Darstellung der Y-Achse (Basis 10) angegeben. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Die E6- und E7-cfDNA-Werte gemessen mit SYBR Green lagen bei HPV-assoziierten OPSCC-Patienten bei durchschnittlich 460 (0-5790) und 1204 (0-14057) Kopien pro ml Blutplasma. In allen Proben der fünf HPV-negativen OPSCC Patienten konnte keine E6-

und E7-cfHPV-DNA nachgewiesen werden. Der Unterschied in der Konzentration der cfHPV-DNA zwischen Patienten mit HPV-assoziiertem und HPV-negativem OPSCC war sowohl für E6 als auch für E7 bei Proben vor Therapiebeginn statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Analog zur Untersuchung mittels des TaqMan-Assays folgt für die Proben der HPV-assoziierten OPSCC-Patienten der Konzentrationsvergleich von cfHPV-DNA unterteilt nach Tumorcharakteristika entsprechend dem TNM-Status und dem UICC-Stadium (8th edition).

Sowohl die Konzentration der E6- als auch der E7-cfHPV-DNA war bei Patienten mit größeren Tumoren (T3-4) etwa 1,5-mal höher als bei Patienten mit kleineren Tumoren (T0-1), wie in Abbildung 19 dargestellt. Dieser Unterschied konnte jedoch mit $p=0,202$ für E6 und $p=0,102$ für E7 nicht das Niveau der statistischen Signifikanz erreichen. Anzumerken ist jedoch, dass nur vier Patienten in der Kohorte ($n=17$) einen großen Primärtumor (T3-4) aufwiesen.

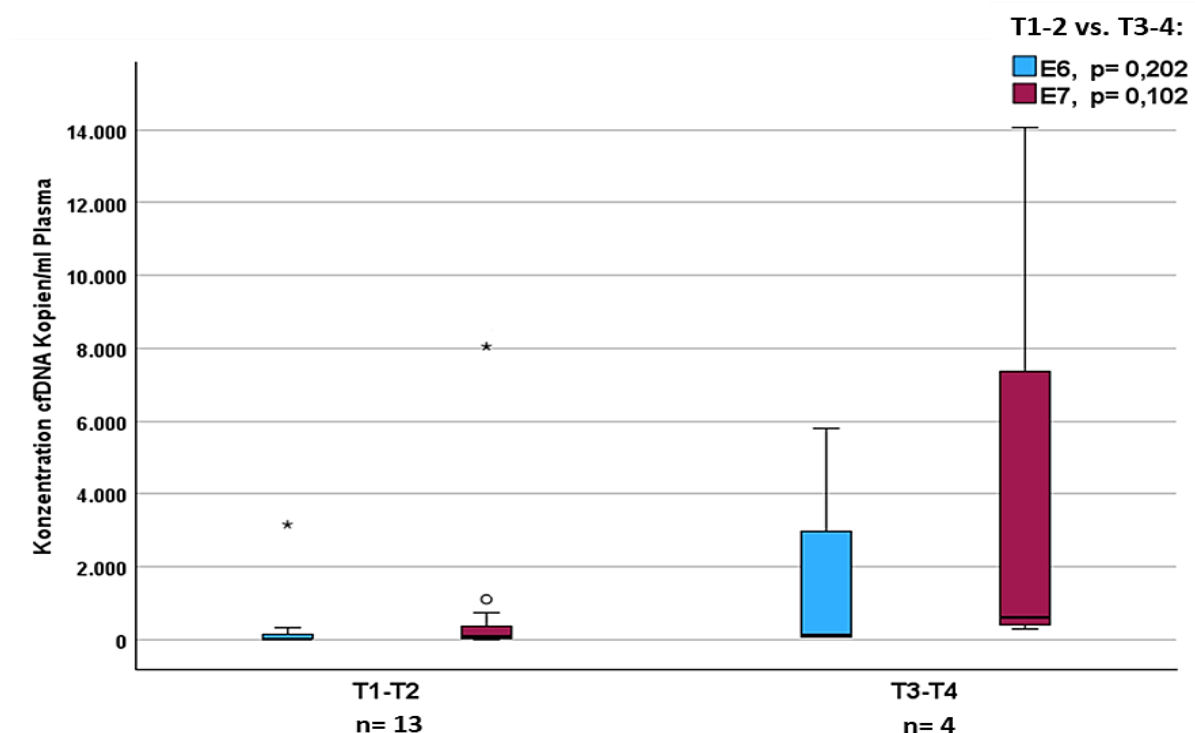


Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt durch SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Tumorgroße (T1-2 versus T3-4). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Abbildung 20 zeigt den Vergleich der cfHPV-DNA-Konzentration in Bezug zum Lymphknotenstatus.

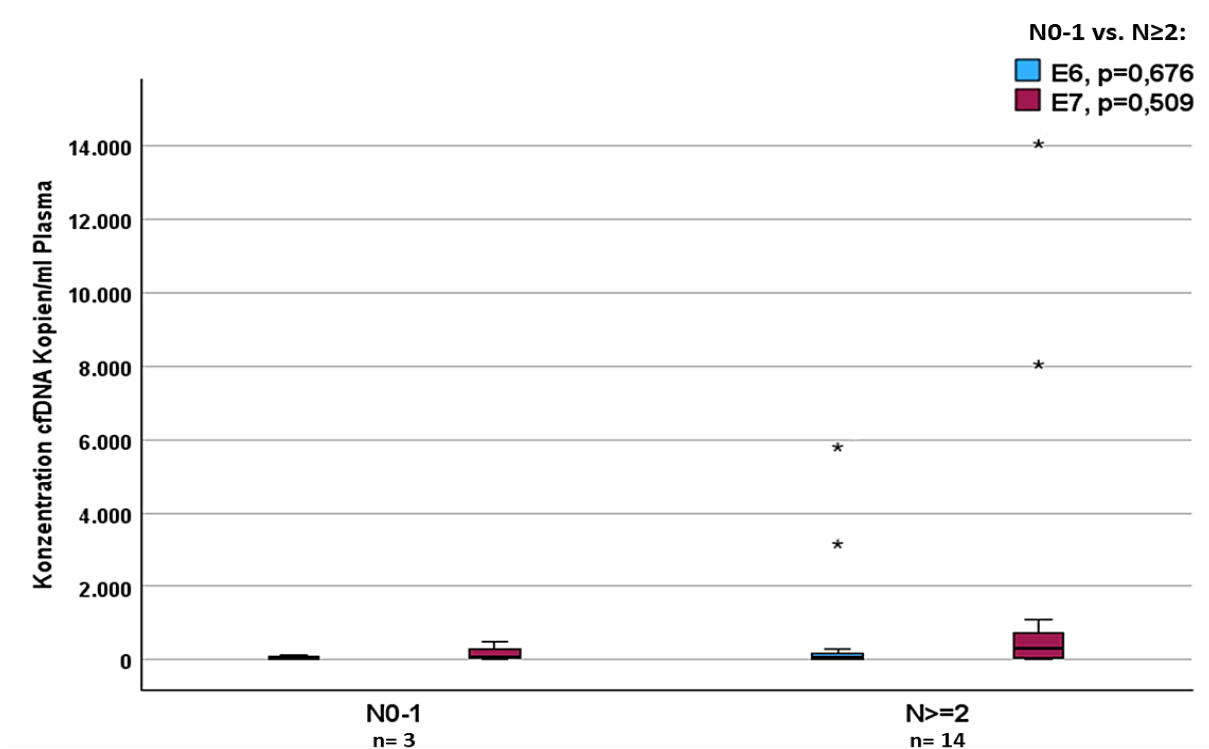


Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Lymphknotenstatus (N0-1 versus $N \geq 2$). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Hierbei ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen stratifiziert nach keinem bzw. geringem (N0-1) versus vermehrtem Lymphknotenbefall ($N \geq 2$) darstellen. Es zeigte sich hierbei ebenso eine starke Diskrepanz in der Verteilung der Patienten zwischen den beiden Gruppen (N0-1: n=3 vs. n=14: $N \geq 2$).

Im Weiteren werden die Konzentrationen von cfHPV-DNA bzgl. dem Status der Fernmetastasierung verglichen (s. Abb. 21).

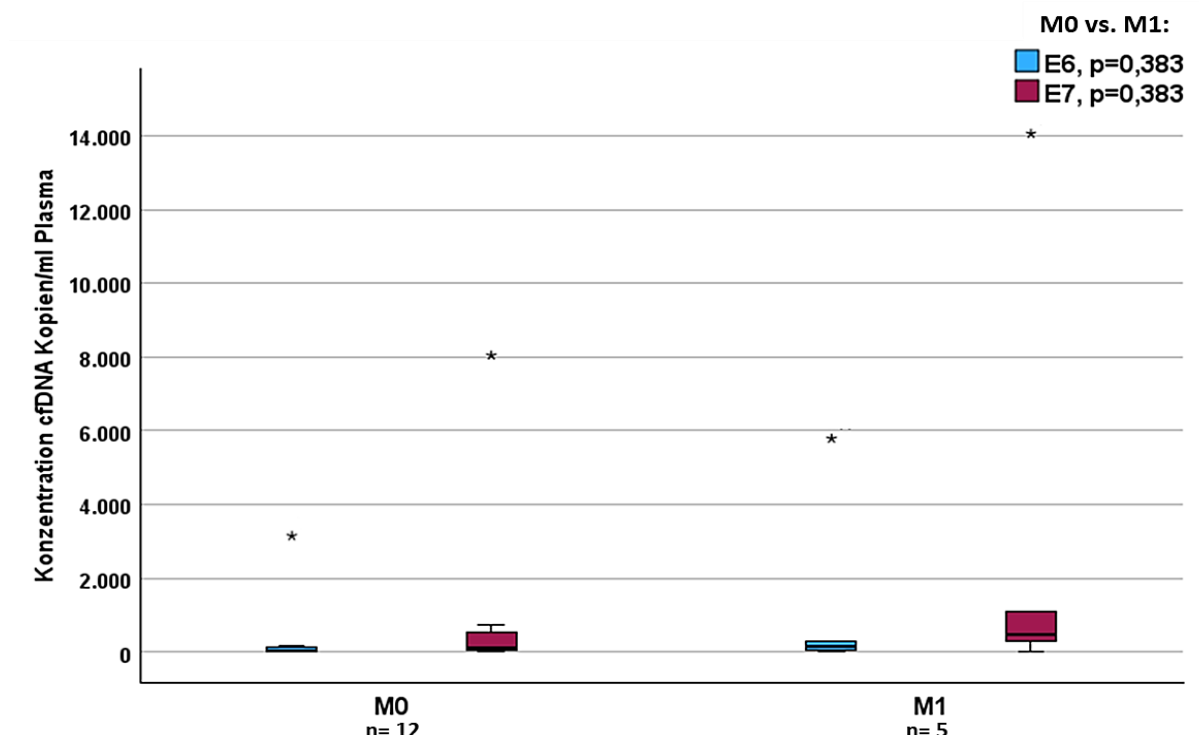


Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Fernmetastasen (M0 versus M1). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

In der Gruppe der Patienten mit Fernmetastasen (M1) zeigte sich eine höhere mediane Konzentration von cfHPV-DNA als in der Gruppe ohne Fernmetastasierung (M0): E6 140 vs. 29 Kopien/ml Plasma und E7 491 vs. 103 Kopien/ml Plasma. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

In Abbildung 22 werden die Gruppen nach dem Tumorstadium entsprechend der UICC (8th edition) stratifiziert dargestellt.

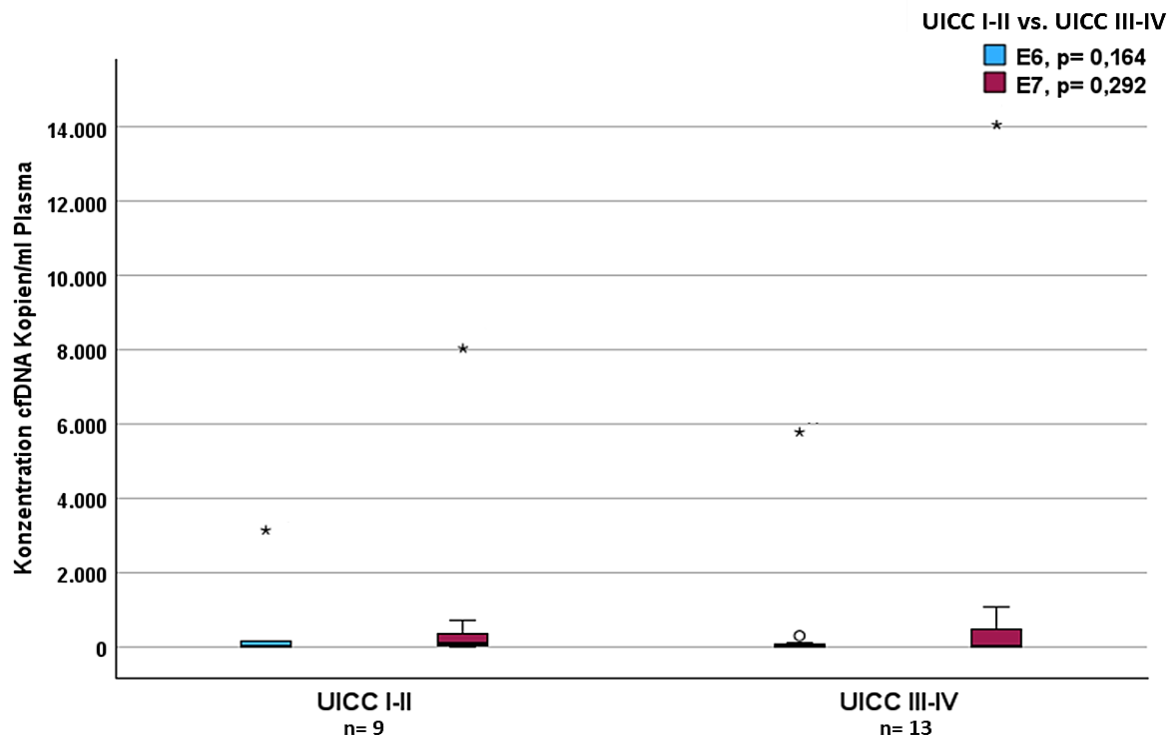


Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach UICC-Tumorstadien (I-II versus III-IV). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Es zeigte sich zwischen den beiden Gruppen (UICC I-II versus UICC III-IV) kein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. der Konzentration der cfHPV-DNA.

Zusammenfassend zeigte sich, dass auch unter Verwendung des SYBR Green-Assays bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC eine wesentlich höhere Konzentration von E6 und E7-cfDNA gegenüber HPV-neg. OPSCC gemessen wird. Der Unterschied erweist sich hierbei als statistisch signifikant. Betrachtet man die Subgruppen innerhalb der HPV-assoziierten OPSCC, so zeigt sich in den Gruppen mit höherer Tumorlast (entsprechend Tumorgroße, Tumorstadien, Lymphknotenstatus und Metastasierung) eine geringfügig höhere Konzentration der cfHPV-DNA. Dieser Konzentrationsunterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Mögliche Ursachen hierfür werden in der Diskussion näher beleuchtet.

3.5.1. SYBR Green-qPCR für den Vergleich zwischen prä- und posttherapeutischen Proben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen

Analog zu der TaqMan qPCR im Kapitel 3.4.2 werden in diesem Kapitel unter Verwendung des SYBR Green-Assays die Nachsorgeproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC untersucht und mit den entsprechenden Werten der prätherapeutischen Proben verglichen (s. Abb. 23). Diese Patienten wiesen bei den Routineuntersuchungen der Nachsorge keine klinischen oder bildgebenden Anzeichen einer residualen Erkrankung auf. Die Nachsorgeproben wurden hierbei wie zuvor in drei Zeitabschnitte aufgeteilt und dargestellt: ≤ 6 Monate, 6-12 Monate und länger als 12 Monate nach Therapieende. Wie bereits zuvor sind hier in den Zeitabschnitten, aufgrund der inhomogenen Verteilung der Probenabnahmen in der Nachsorge, nicht alle Patienten in jeder Gruppe vertreten (siehe Verteilung Abb. 8).

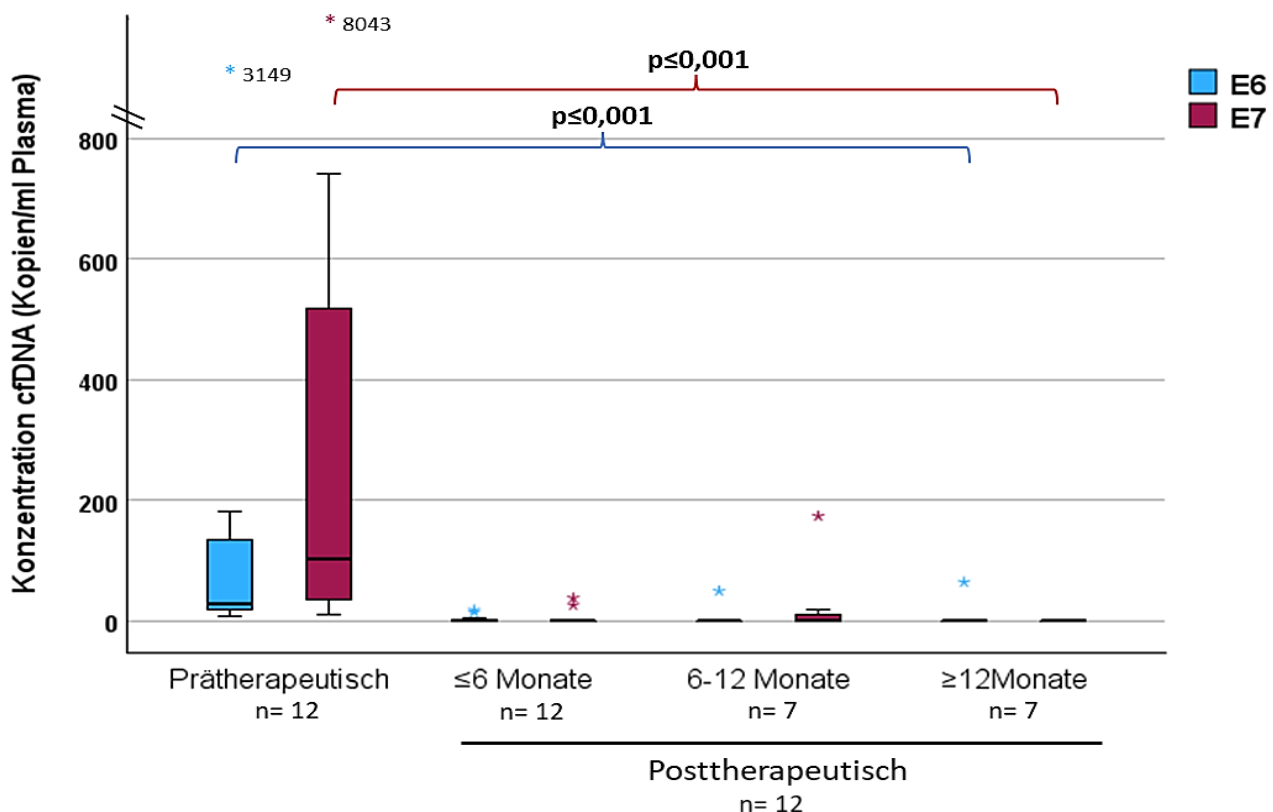


Abbildung 23: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung. Die Nachsorgeproben sind in drei Zeitabschnitte zusammengefasst. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Es zeigte sich im Vergleich zu den prätherapeutischen Proben eine wesentlich niedrigere Konzentration von E6- und E7-cfDNA zu allen posttherapeutischen Zeitabschnitten. Der Unterschied erwies sich hierbei für alle drei Zeitabschnitte im Vergleich zu den prätherapeutischen Proben als statistisch signifikant (E6: $p < 0,001$; E7: $p < 0,001$).

Der Unterschied in der Konzentration von E6- und E7-cfDNA zwischen prätherapeutischen und posttherapeutischen Proben lässt sich auch zusammenfassend in Abbildung 24 zeigen.

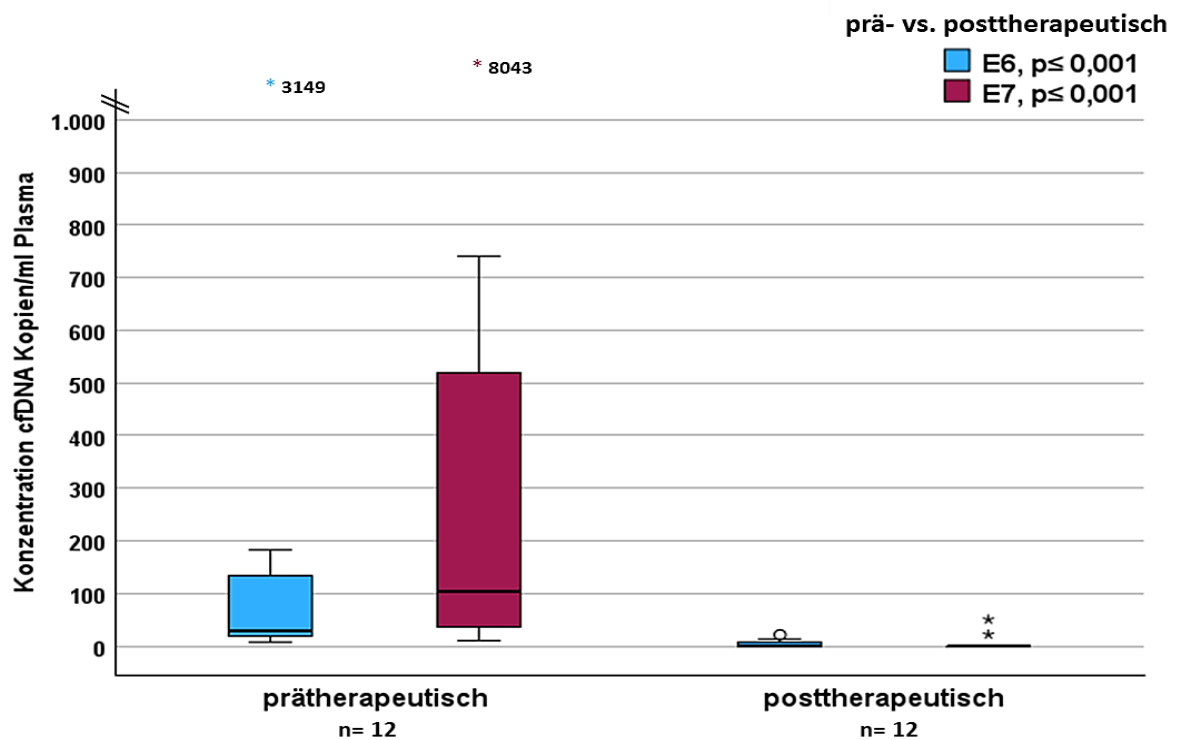


Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung. Die Werte der „Nachsorgeproben“ beziehen sich auf die in Abb. 17 genannten Durchschnittswerte aus drei verschiedenen Zeiträumen von weniger als sechs Monaten bis zu mehr als einem Jahr nach der Therapie. Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Die Kopienzahlen von E6 und E7 waren nach der Standardtherapie insgesamt wesentlich geringer als prätherapeutisch. Die durchschnittliche Konzentration der E6-cfDNA vor der Therapie betrug 893 Kopien pro ml Plasma (Bereich 6-3149) verglichen mit einem Mittelwert von 5,8 (Bereich 0-49) nach der Therapie. Ebenso sank die mittlere Konzentration von E7-cfDNA in den Proben von 879 (12-8043) Kopien pro ml Plasma vor der Therapie auf 9,9 (0-174) nach der Therapie. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erwies sich bei E6 und E7 als statistisch signifikant (E6: $p < 0,001$; E7: $p < 0,001$).

3.6 Vergleich von TaqMan- und SYBR Green-qPCR Detektionsmethoden

In diesem Kapitel werden die Konzentrationen von cfHPV-DNA von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC zwischen den beiden verwendeten qPCR-Methoden verglichen. Hierbei wurden dieselben Proben von HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC-Patienten (n= 21) verglichen, welche mit beiden Methoden gemessen wurden.

Betrachtet man hierbei die Patienten mit HPV-negativem OPSCC (n=5), dann zeigt nur eine Probe einen positiven Nachweis oberhalb des *Cut-offs* von cfHPV-DNA unter Verwendung des TaqMan-Assays für das Target E6. Alle anderen Proben ergaben bei beiden Methoden bei HPV-negativem OPSCC ein negatives Ergebnis unter Verwendung des errechneten optimalen Schwellenwertes.

In Abbildung 25 betrachten wir den Konzentrationsunterschied von E6- und E7-cfDNA pro ml Plasma zwischen den beiden Methoden bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC.

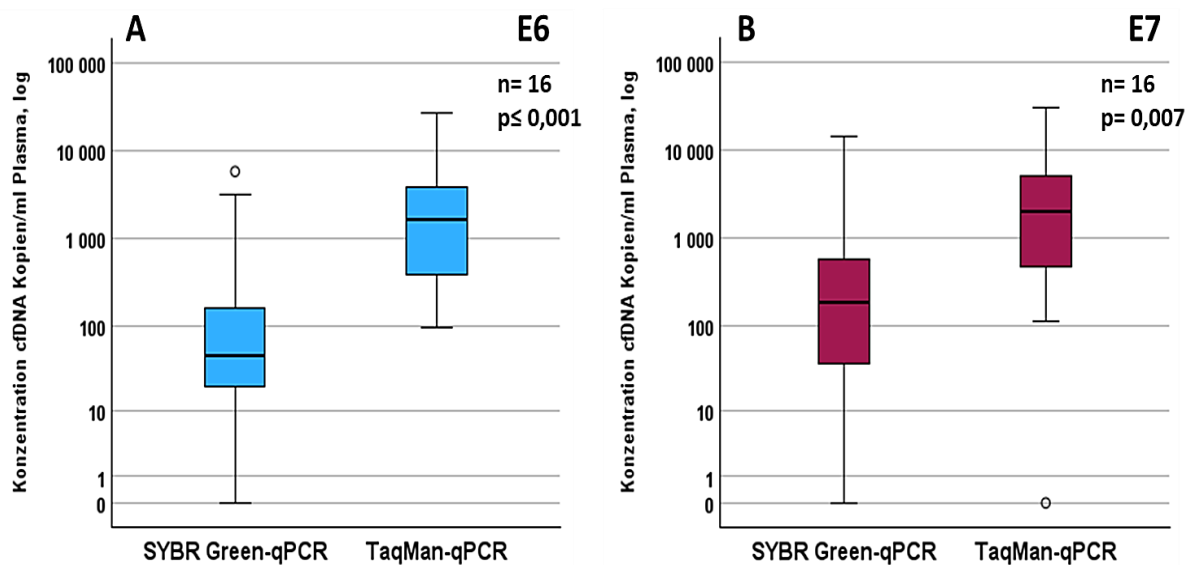


Abbildung 25: Vergleich der Konzentrationen von cfHPV-DNA in denselben prätherapeutischen Plasmaproben von HPV-assoziierten OPSCC-Patienten, nachgewiesen durch SYBR Green qPCR und TaqMan qPCR. A: Messung von E6-cfDNA (blau). B: Messung von E7-cfDNA (rot). Daten dargestellt als Median ± Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Perzentile mit logarithmischer Darstellung der Y-Achse (Basis 10) angegeben. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Es zeigte sich, dass die Kopienzahlen der cfDNA sowohl von E6 als auch von E7 mit dem TaqMan-Assay höher waren als mit der SYBR Green-Detektion. Bei E6 ist die Konzentration im Mittelwert 7,6-fach und bei E7 3,1-fach höher bei Verwendung der TaqMan qPCR. Hierbei erreichte der Unterschied zwischen den Methoden sowohl für

E6-cfDNA ($p \leq 0,001$) als auch für E7-cfDNA ($p = 0,007$) das Niveau einer statistischen Signifikanz.

Ein ähnliches Ergebnis lässt sich für das interne Referenzgen Beta-Globulin (s. Abb. 26) zeigen. Beta-Globulin wurde als Positiv-Kontrolle zum Nachweis einer erfolgreichen PCR bestimmt.

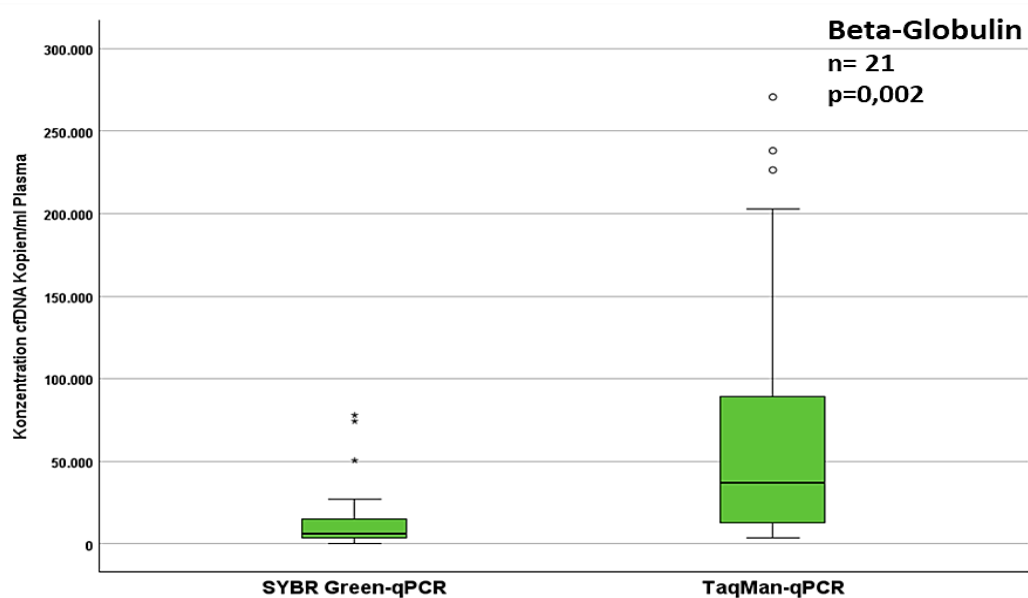


Abbildung 26: Vergleich der Konzentrationen von cfDNA von Beta-Globulin in den Blutplasmaproben von OPSCC-Patienten vor der Therapie, bestimmt durch SYBR Green qPCR (links) und durch TaqMan qPCR (rechts). Daten dargestellt als Median $\pm$ Interquartilsbereich der 25. und 75. Perzentile. Der Whisker erstreckt sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Wertausreißer werden als Kreise und Sternchen dargestellt. p: Mann-Whitney-U-Test.

Im Vergleich zeigt sich bei Verwendung der TaqMan-qPCR eine 4,3-fach höhere cfDNA-Konzentration als bei der Verwendung des SYBR Green-Assays. Der Unterschied erwies sich hierbei als statistisch signifikant ($p = 0,002$).

Für den gezeigten Konzentrationsunterschied zwischen den beiden qPCR-Methoden gibt es mehrere mögliche Erklärungen, welche in der Diskussion weiter erörtert werden.

Zur Berechnung eines Zusammenhanges zwischen den cfDNA-Konzentrationen gemessen mittels beider qPCR-Assays wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

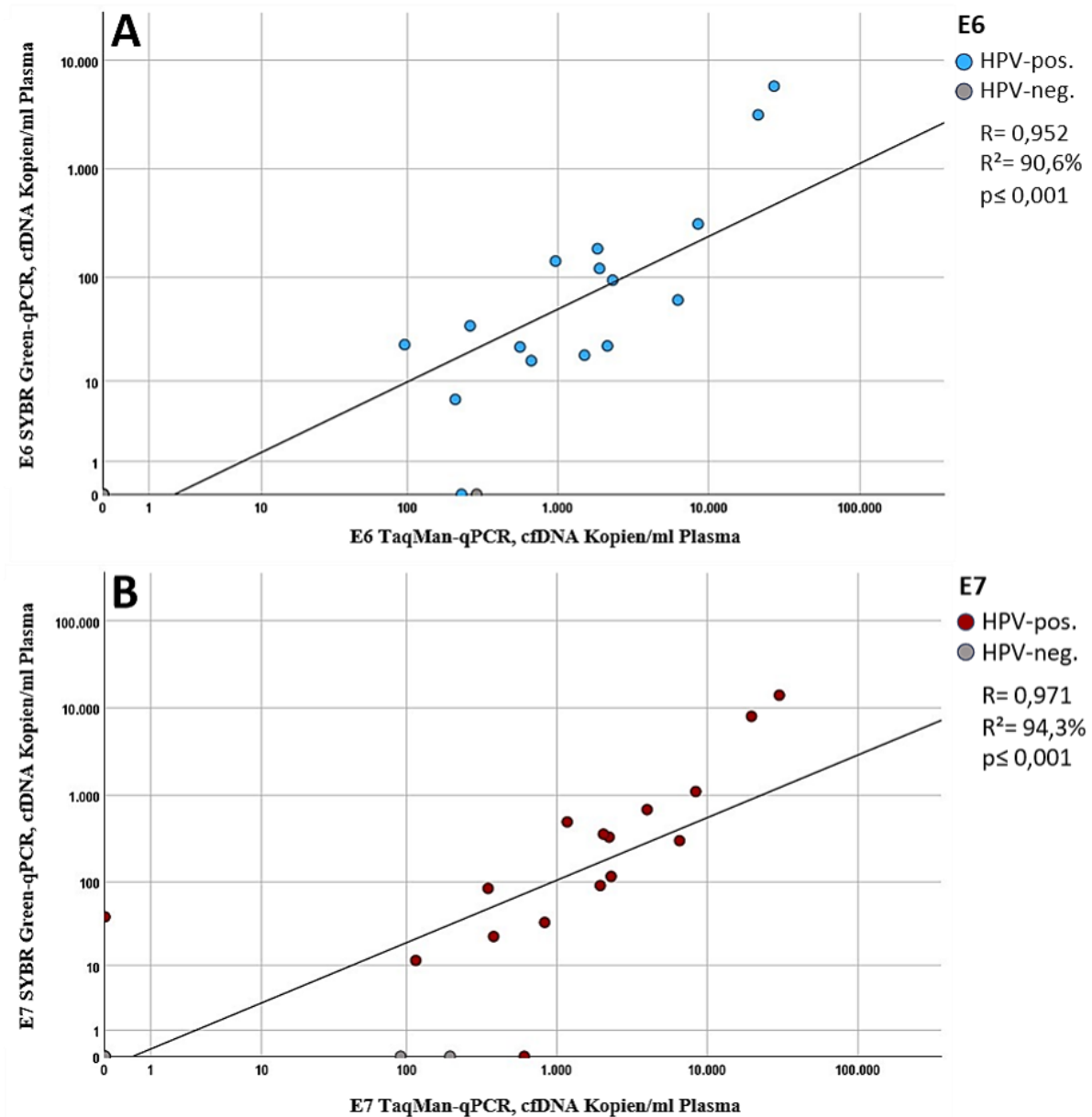


Abbildung 27: Lineare Regressionsanalyse der prätherapeutischen Konzentrationen von cfHPV-DNA bei OPSCC-Patienten, gemessen mittels qPCR-Analyse unter Verwendung von SYBR Green gegenüber TaqMan. A: Konzentration von E6-cfHPV mit Darstellung von HPV-assoziierten Proben (blau) und HPV-negativen Proben (grau). B: Konzentration von E7-cfHPV mit Darstellung von HPV-assoziierten Proben (rot) und HPV-negativen Proben (grau). X- und Y-Achse mit logarithmischer Darstellung (log 10). R: Korrelationskoeffizient. R²: Bestimmungskoeffizient. p: F-Test.

Beim Vergleich der prätherapeutischen cfHPV-DNA-Werte zwischen den beiden Methoden zeigte sich für E6 (s. Abb. 27, A) ein Korrelationskoeffizient R von 0,952 und ein Bestimmungskoeffizient R² mit 90,6 %. Die Korrelation der Daten erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,001$). Für E7 (Abb. 27, B) entsprach der Korrelationskoeffizient $R=0,971$ und der Bestimmungskoeffizient $R^2 = 94,3\%$. Es ergab sich auch bei E7 eine Korrelation, welche ein statistisch signifikantes Niveau erreichte ($p < 0,001$).

Die linearen Regressionsdaten zeigen, dass die gemessenen Konzentrationen von cfHPV-DNA zwischen den beiden verwendeten Methoden korrelieren. Der Korrelationskoeffizient $R > 0,8$ und der Bestimmungskoeffizient $R^2 > 90\%$ für E6 und E7 zeigten einen starken linearen Zusammenhang zwischen den beiden qPCR-Methoden. Das bedeutet, dass bei einer Messung einer Plasmaprobe mit z.B. hoher cfHPV-Konzentration mittels SYBR Green ebenso eine hohe Konzentration mittels TaqMan zu erwarten ist.

Bei Beta-Globulin hingegen konnte zwischen den Methoden nur eine schwache Korrelation der Konzentrationen festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient R und der Wert des Bestimmtheitsmaßes R^2 lagen bei 0,211 bzw. 4,4 % und waren statistisch nicht signifikant (s. Abb. 28).

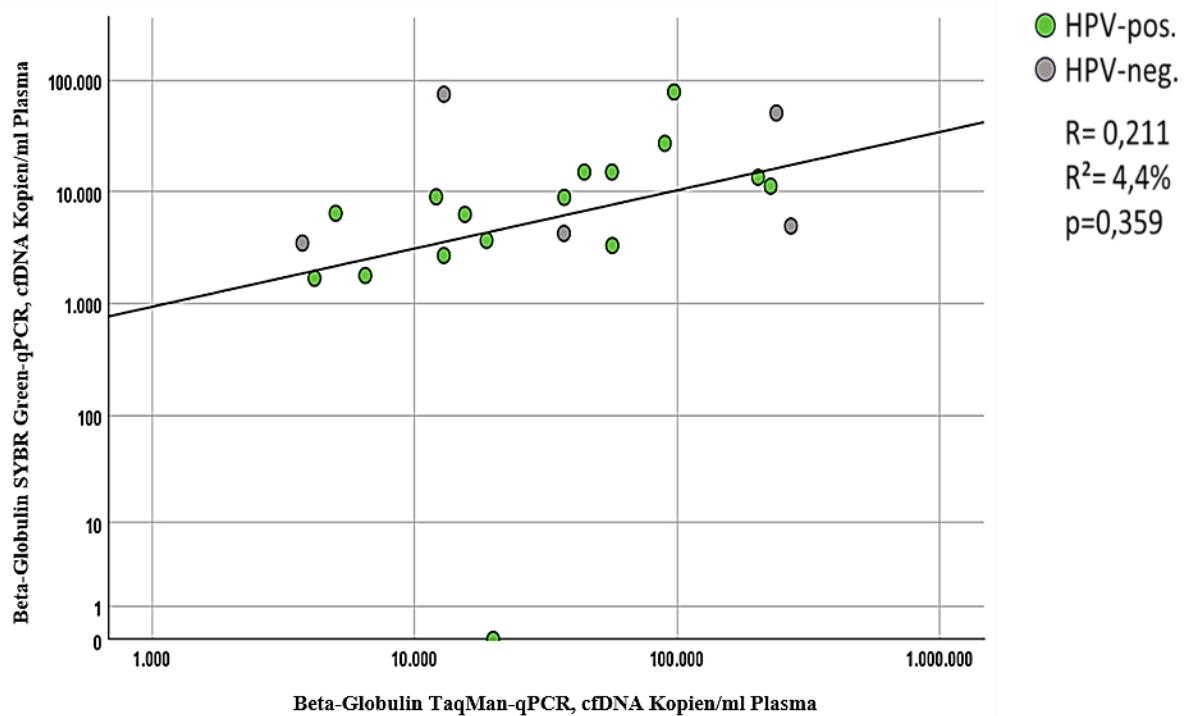


Abbildung 28: Lineare Regressionsanalyse der prätherapeutischen Konzentrationen von Beta-Globulin bei OPSCC-Patienten, gemessen mittels qPCR-Analyse unter Verwendung von SYBR Green gegenüber TaqMan. X- und Y-Achse mit logarithmischer Darstellung (log 10). R : Korrelationskoeffizient. R^2 : Bestimmungskoeffizient. p : F-Test.

Bezüglich der Ursache der Diskrepanz zwischen der hier dargestellten hohen Korrelation der Konzentration von E6 und E7-cfDNA und dem dennoch vorliegenden signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Messmethoden wird nachfolgend diskutiert.

3.6.1 Vergleich von Sensitivität und Spezifität von TaqMan- und SYBR Green-qPCR

Die HPV-Assoziation der OPSCC dieser Arbeit wurde routinemäßig in der klinisch-pathologischen Diagnostik durch immunhistochemische Färbung von p16 (p16^{INK4A}) und HPV-DNA-Nachweis aus histologischen Proben bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1). Nur OPSCC, welche mit beiden Methoden als HPV-positiv erkannt wurden, wurden in dieser Arbeit als HPV-assoziiert definiert. Ebenso wurden lediglich Proben solcher OPSCC in dieser Arbeit als HPV-negativ definiert und verwendet, welche in beiden Tests als negativ beschrieben wurden. Mit Hilfe dieses Diagnostikstandards wurde die Spezifität und Sensitivität der beiden in dieser Arbeit untersuchten qPCR-Assays berechnet (s. Tab. 11).

Tabelle 11. Vergleich der Spezifität und Sensitivität der HPV-Assoziation bei prätherapeutischen OPSCC durch qPCR-basierten Nachweis von E6- und/oder E7-cfHPV-DNA mit TaqMan oder SYBR Green. Der durch die Routine-Diagnoseverfahren bestimmte HPV-Status wurde als Referenz (Goldstandard) herangezogen.

SYBR-Green-PCR (prätherapeutisch)	HPV-Status (HPV-DNA und p16 ^{INK4A} -Immunhistochemie)							
	Negativ n= 5	Positiv n= 17	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	falsch-positiv Rate	falsch-negativ Rate	
	E6: positiv/negativ	0/5	16/1	94%	100%	95,5%	0%	5,9%
	E7: positiv/negativ	0/5	16/1	94%	100%	95,5%	0%	5,9%
	E6 und E7: positiv/negativ	0/5	16/1	94%	100%	95,5%	0%	5,9%
E6 oder E7: positiv/negativ	0/5	16/1	94%	100%	95,5%	0%	5,9%	

Taqman-PCR (prätherapeutisch)	HPV-Status (HPV-DNA und p16 ^{INK4A} -Immunhistochemie)						
	Negativ n= 20	Positiv n= 30	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	falsch-positiv Rate	falsch-negativ Rate
E6: positiv/negativ	1/19	25/5	83%	95%	88%	5%	16,7%
E7: positiv/negativ	0/20	24/6	80%	100%	88%	0%	20%
E6 und E7: positiv/negativ	0/20	23/7	77%	100%	86%	0%	23,30%
E6 oder E7: positiv/negativ	1/19	26/4	87%	95%	90%	5%	13,30%

Unter Verwendung der SYBR Green qPCR zeigte sich ein erfolgreicher Nachweis von E6- und/oder E7-cfHPV-DNA bei 16/17 Proben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. In den Proben der HPV-negativen OPSCC wurde keine cfHPV-DNA von E6 oder E7 nachgewiesen. Dies führt zu einer Spezifität von 100 %, einer Sensitivität von 94 % und einer Genauigkeit von 95,5 % mit einer falsch-negativen Rate von 5,9 %, während die falsch-positive Rate 0 % betrug.

Betrachtet man das TaqMan qPCR-Assay ergab sich ein falsch-positiver Nachweis von E6-cfHPV-DNA bei einem HPV-negativen Patienten ($n=1/20$), was zu einer falsch-positiven Rate von 5% für E6-cfDNA führte. Bei keinem HPV-negativen Patienten wurde E7-cfDNA über dem Grenzwert nachgewiesen. Die Spezifität des TaqMan-Nachweises bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC liegt bei 95-100% und die Genauigkeit bei 88-100 %. Von den insgesamt 30 HPV-assoziierten OPSCC-Proben wurden fünf für E6- und sechs für E7-cfHPV-DNA durch TaqMan-basierte qPCR-Ergebnisse falsch-negativ erkannt, was zu einer Gesamtsensitivität der Methode von 77-87 % führt.

Im Vergleich zeigte sich somit eine ähnliche Spezifität von 95-100% für beide Methoden und eine höhere Sensitivität des SYBR Green-Assays gegenüber der TaqMan qPCR.

3.6.2 qPCR-Detektion von zellfreier HPV-DNA bei Patienten mit residualer Tumorerkrankung

Bei fünf OPSCC- Patienten (A bis E) wurde bei Routineuntersuchungen im Rahmen der Nachsorge ein Rezidiv oder eine Tumorprogression bei initial metastasiertem Tumorstadium festgestellt. Der qPCR-basierte Nachweis von E6- und E7-cfHPV16-DNA wurde bei diesen Patienten prä- und posttherapeutisch durchgeführt und im zeitlichen Verlauf betrachtet (s. Abb. 29-31).

In Abbildung 29 sind für Patient A zunächst zum Vergleich die Messwerte der cfHPV-Konzentrationen unter Verwendung von SYBR Green qPCR und TaqMan qPCR der Übersichtlichkeit halber nur im zeitlichen Verlauf dargestellt. Abbildung 30 zeigt anschließend zusammenfassend bei Patient A zusätzlich zum Konzentrationsverlauf den zeitlichen Verlauf der Therapie und Nachsorge entlang der X-Achse sowie den Zeitpunkt der Diagnose des Progresses in der Routineuntersuchung. Patient A ist ein Fall mit HPV-assoziiertem OPSCC mit Lungen-, Leber- und Knochenmetastasen, die 17 Monate nach der Erstdiagnose in der konventionellen Routinenachuntersuchung diagnostiziert wurden.

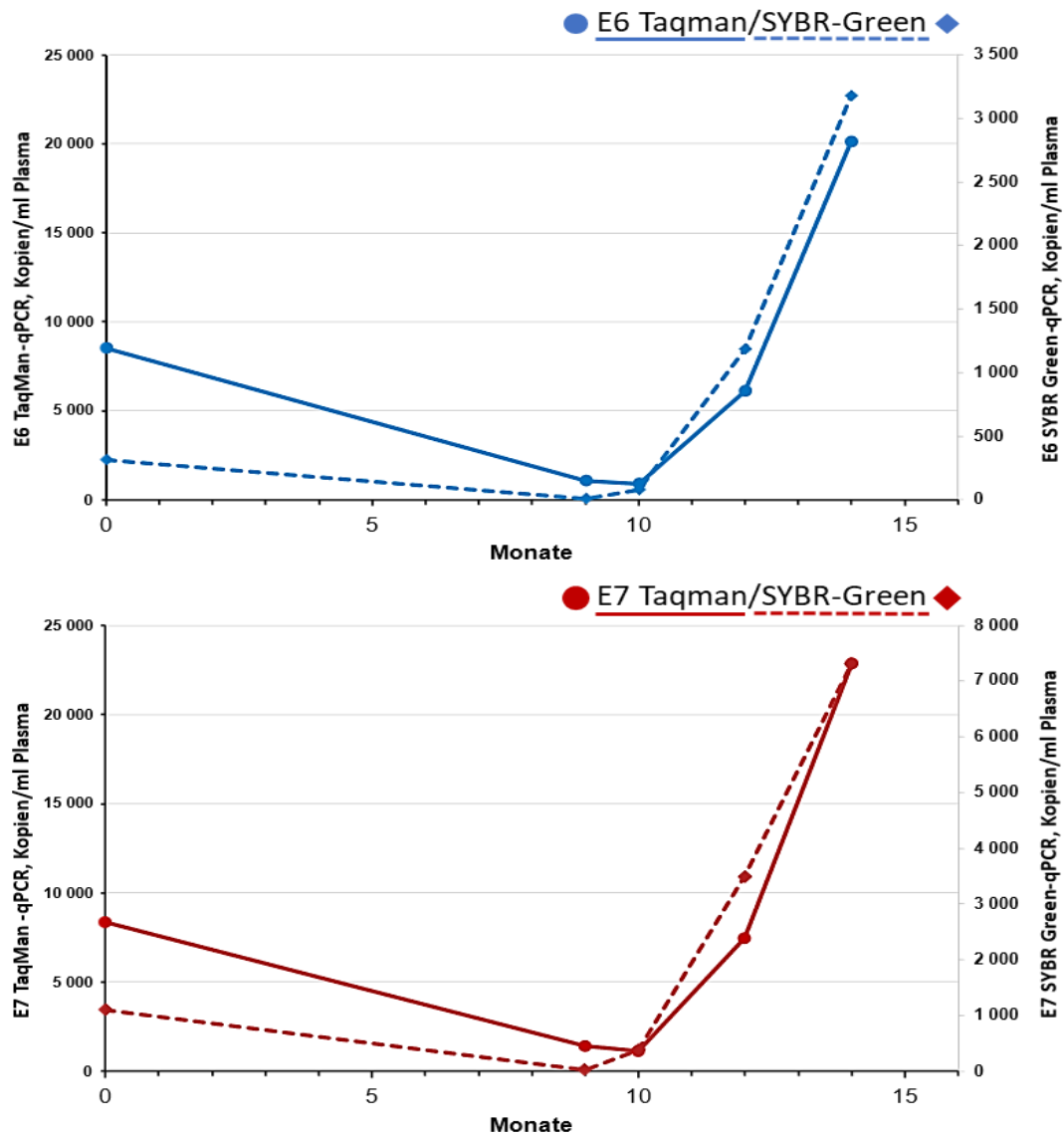


Abbildung 29: Detektion von E6- und E7-cfHPV-DNA mittels SYBR Green- und TaqMan qPCR bei Patient A mit Tumorprogression und Fernmetastasierung. qPCR-Analyse während der Nachuntersuchung nach der zytoreduktiven Therapie. E6 in blau, E7 in rot, TaqMan in durchgezogener Linie, SYBR Green in gestrichelter Linie.

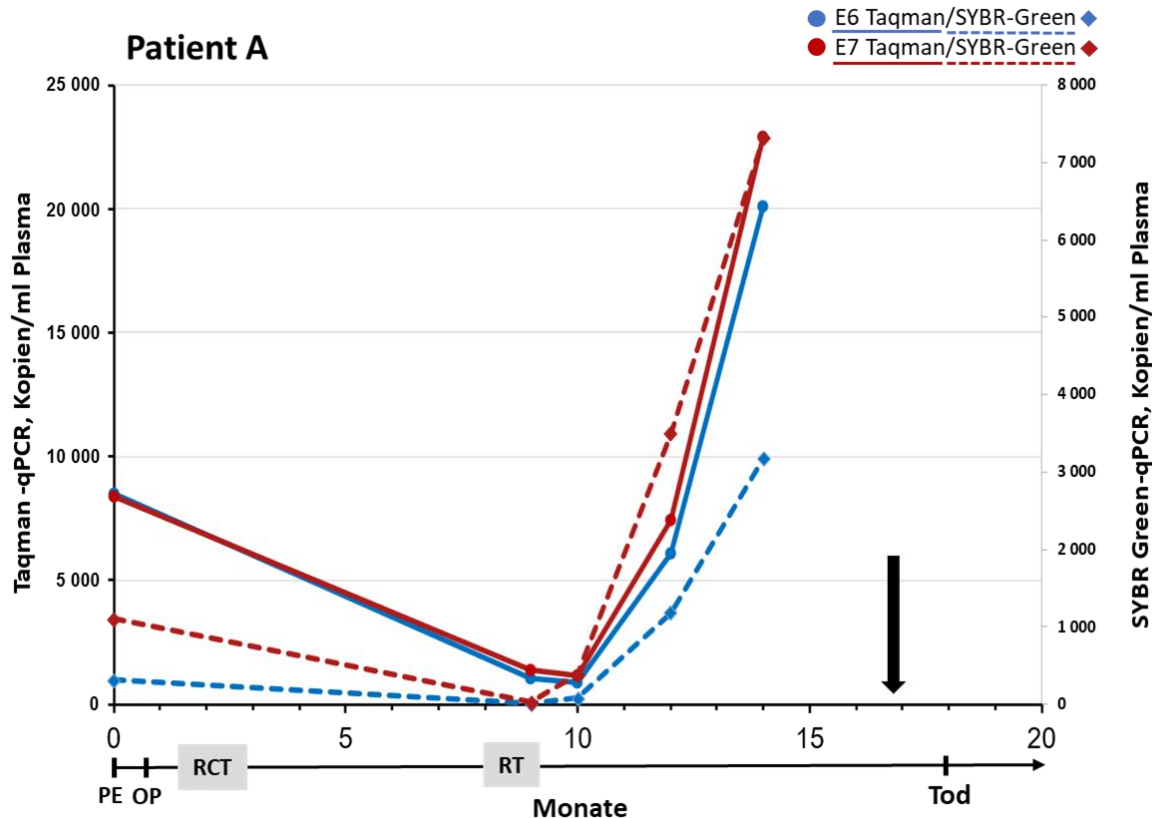


Abbildung 30: Detektion von E6- und E7-cfHPV-DNA mittels SYBR Green- und TaqMan-qPCR bei Patient A mit Darstellung Therapieverlauf. qPCR-Analyse während der Nachuntersuchung nach der zytoreduktiven Therapie. Pfeil: Zeitpunkt der Diagnosestellung des Rezidiv-Geschehens in der Routineuntersuchung. E6 in blau, E7 in rot, TaqMan in durchgezogener Linie, SYBR Green in gestrichelter Linie. PE: Zeitpunkt der ersten Biopsie (histologischen Sicherung der Erkrankung); RCT: Radiochemotherapie; RT: Radiotherapie; Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert

Es lässt sich unabhängig von der Nachweismethode zeigen, dass zunächst nach der initialen operativen Versorgung und adjuvanten Radiochemotherapie die cfHPV-Konzentration abfällt, jedoch nie unter die Nachweisgrenze. Im Verlauf der Nachsorge stieg die cfHPV-DNA-Konzentration stetig wieder an. Der Anstieg der Konzentration präsentierte sich bereits vor dem klinischen Nachweis der Tumorprogression mittels bildgebender Verfahren (s. Abb. 30, Pfeil).

In der Abbildung 31 werden weitere ähnliche Fälle vorgestellt. Patient B: Ein Fall mit vorbestehenden Lymphknoten- und Lungenmetastasen mit Entwicklung von kranialen Metastasen im Verlauf. Patient C: Mit primär metastasiertem Tumorstadium und palliativer Radiochemotherapie. Patient D: Mit Rezidiv 16 Monate nach initialer Therapie. Patient E: Ein Fall mit einer Lymphknotenmetastase 10,6 Monate und Lungenmetastasierung 18,5 Monate nach der Primärdiagnose. Bei Patient E wurden die Plasmaproben jedoch nur mit TaqMan qPCR analysiert.

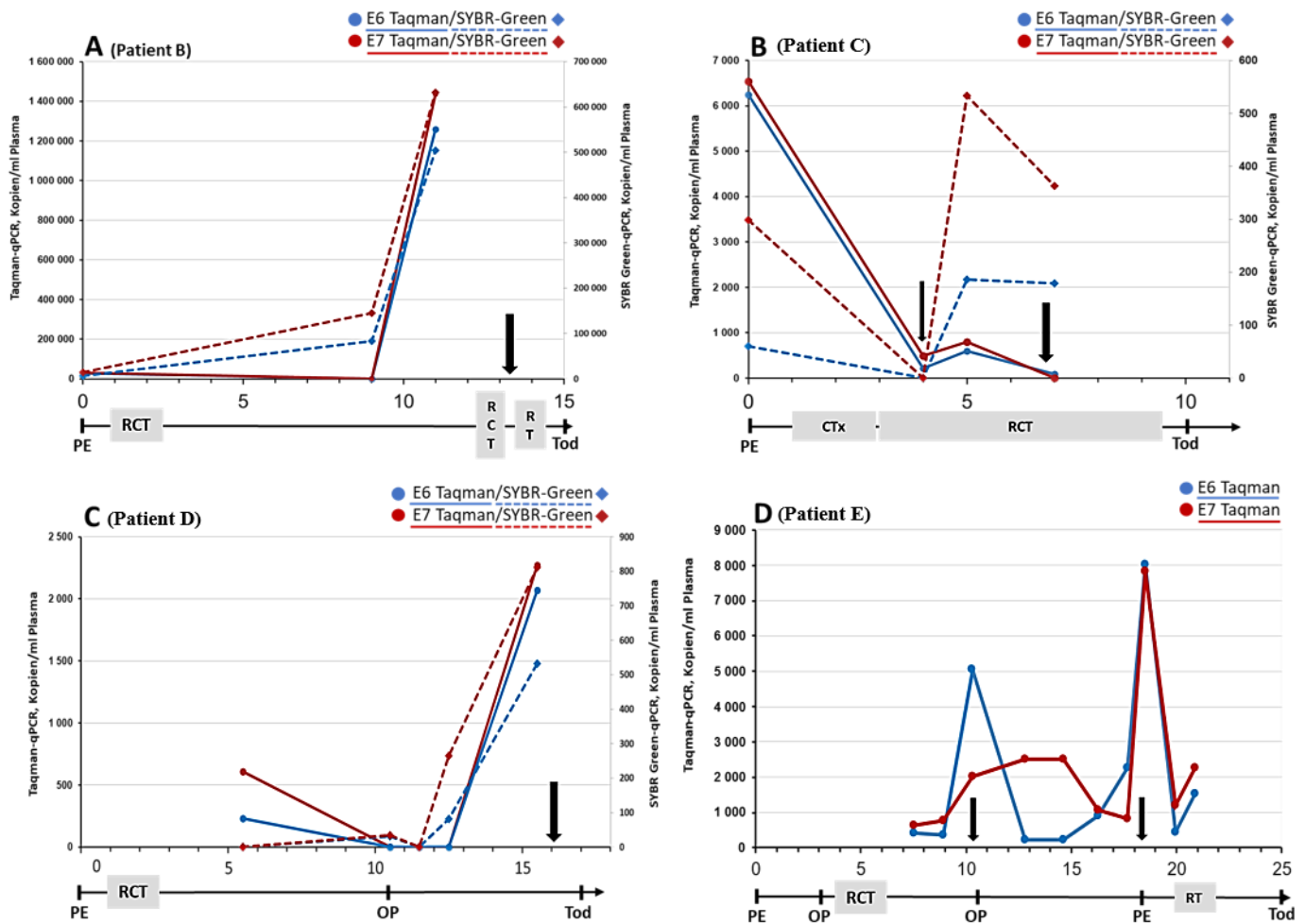


Abbildung 31: Detektion von E6 und E7 cfHPV-DNA mittels SYBR Green und TaqMan qPCR bei OPSCC-Patienten mit Tumorprogression/-rezidiv und/oder Fernmetastasierung (A-D). Pfeile: Zeitpunkt der Diagnosestellung des Rezidiv-Geschehens in der Routineuntersuchung; A: Patient B, ein Fall mit vorbestehenden Lymphknoten- und Lungenmetastasen, der im Verlauf der Erkrankung kraniale Metastasen entwickelte; B: Patient C mit primär lymphogen-metastasiertem Tumorstadium erhielt eine palliative Radiochemotherapie mit partieller Remission nach der primären Chemotherapie (1. Pfeil). C: Patient D entwickelte 16 Monate nach der Behandlung des primären OPSCC ein Rezidiv in den Halslymphknoten. D: Patient E, ein Fall mit einer Lymphknotenmetastase 10,6 Monate und Lungenmetastasierung 18,5 Monate nach der Primärdiagnose, Proben nur mit TaqMan qPCR bearbeitet. E6 in blau, E7 in rot, TaqMan in durchgezogener Linie, SYBR Green in gestrichelter Linie. Y-Achse: Konzentration in Kopien/ml Plasma, TaqMan qPCR (links), SYBR Green-qPCR (rechts); X-Achse: Zeitverlauf in Monaten; PE: Zeitpunkt der ersten Biopsie (histologische Sicherung der Erkrankung); RCT: Radiochemotherapie; RT: Radiotherapie; CTx: Chemotherapie; Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert.

Sowohl mit TaqMan- als auch SYBR Green-basierter qPCR konnte eine erhöhte Kopienzahl von E6- und E7-cfHPV-DNA im Blutplasma dieser Patienten während der Nachsorge posttherapeutisch nachgewiesen werden, welche mit den klinischen Verläufen größtenteils in Einklang zu bringen waren.

Bei drei von fünf der gezeigten Fälle (Patient A, B und D) fällt der Anstieg der Konzentrationen von E6- und E7-cfDNA im Verlauf der Nachbeobachtungszeit mit der medizinischen Diagnose eines Krankheitsrezidiv bzw. -progresses zusammen. Diese Patienten zeigten einen Rückgang der cfHPV-DNA nach der Behandlung und

anschließend einen erneuten Anstieg der Konzentration, bevor das Wiederauftreten bzw. der Tumorprogress klinisch diagnostiziert wurde.

Patient C und E zeigten ähnlich wie die oben genannten Patienten nach initialer Therapie einen Abfall der Konzentration von cfHPV-DNA mit anschließendem Anstieg in der Progress- bzw. Rezidiv-Situation. Im Gegensatz jedoch zu Patient A, B und D kam es im weiteren Verlauf zum erneuten Abfall der Konzentration im Rahmen der zytoreduktiven Therapie. Patient E präsentierte sogar zwei Anstiege mit anschließendem Abfall. Dieser Konzentrationsverlauf lässt vermuten, dass sich hierbei ein Ansprechen auf die Tumorthherapie mit im Verlauf erneutem Progress zeigte.

In allen vier Fällen, deren Proben mit beiden Methoden gemessen wurden, waren die qPCR-Nachweise durch SYBR Green und TaqMan vergleichbar und wiesen ähnliche Konzentrationsmuster der cfHPV-DNA auf. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationshöhen der Messwerte die Skalen der Y-Achse zwischen den Patienten und den Methoden in den oben gezeigten Abbildungen unterscheiden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Nachweis von cfHPV-DNA im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC ein nützliches Instrument zur Überprüfung der HPV-Assoziation, zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und zur möglichen Erkennung eines Rezidivs bzw. Progress-Geschehens ist.

4.1 qPCR-basierter Detektionsprozess für Biomarker-Studien

Die Nutzung von Liquid Biopsies ist ein wachsender Bereich in der medizinischen Forschung und gewinnt auch im klinischen Alltag eine zunehmende Bedeutung. Liquid Biopsy kann zur Überwachung des Therapieansprechens und der Tumorlast bzw. der minimalen residuellen Erkrankungen (MRD, *minimal residual disease*) während der Nachsorge beitragen. Zudem erhofft man sich, mit ihrer Hilfe das Verständnis der Krankheitsentstehungen zu erweitern (Schwarzenbach et al., 2011, Bronkhorst et al., 2019). Ein etablierter Bereich für den cfDNA-Nachweis durch Liquid Biopsies ist die Untersuchung von Gen-Fragmenten des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R, *epidermal growth factor receptor*) auf Mutationen bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom. Hierbei werden Liquid Biopsies in der Therapieentscheidung verwendet, wenn konventionelle Gewebebiopsien nicht verfügbar sind. Hierfür entwickelte Test-Kits sind kommerziell erhältlich und in der klinischen Anwendung bereits etabliert (Douillard et al., 2014, Reck et al., 2016). Für Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses und der Oropharynxkarzinome gibt es bisher nur eine geringe Anzahl an standardisierten Protokollen zur Nutzung von Liquid Biopsies im klinischen Setting (Lauritano et al., 2019).

Ein wichtiges Problem bei der Analyse von Liquid Biopsies ist die Auswahl geeigneter genetischer Marker als Target. Im Bereich der Leukämien hat sich gezeigt, dass somatische Mutationen als solche Marker dienen können (Aziz et al., 2017). Solide Tumore sind allerdings heterogener in ihrem genetischen Profil. Sie bestehen aus unterschiedlichen Zellpopulationen, in welchen unterschiedliche Mutationen beobachtet werden können. Aufgrund dieser Heterogenität und der im Laufe der Entwicklung des Tumors ablaufenden Selektionsprozesse (z.B. durch Resistenzentwicklungen gegenüber zytoreduktiven Therapeutika oder Abwehrmechanismen gegenüber dem Immunsystem) eignen sich die meisten genetischen Marker des Tumors nur bedingt zur Diagnosestellung

oder Gesundheitsüberwachung in großen Patientenkohorten. Marker, welche zum Zeitpunkt der Diagnose gemessen werden, können im Rahmen der Therapie und im Laufe der Tumorentwicklung verloren gehen (Schrack et al., 2021, Sim et al., 2023). Im Vergleich zu somatischen Mutationen ist der Nachweis von DNA/RNA eines onkogenen Virus ein stabilerer Marker, da das Tumorwachstum in der Regel von der Aktivität der kodierten viralen Onkoproteine abhängig ist. Liquid Biopsy könnte daher besonders für Patienten mit virusbedingten Malignomen geeignet sein. Bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen ist der Nachweis des Epstein-Barr-Virus als cfDNA im Plasma bereits ein etablierter Biomarker zur Therapie- und Nachsorgeüberwachung (Lin et al., 2004, Aziz et al., 2017, Chan et al., 2017).

In dieser Arbeit haben wir mit TaqMan qPCR gezeigt, dass E6- und E7-cfDNA von HPV16 bei etwa 85,7 % der HPV-assoziierten OPSCC vor der Behandlung ($p < 0,001$) nachgewiesen werden konnten. Die SYBR Green qPCR-Methode konnte E6- und E7-cfHPV-DNA bei 94 % der HPV-assoziierten OPSCC vor der Behandlung nachweisen ($p < 0,01$).

Dies ist vergleichbar mit anderen in der Literatur veröffentlichten Daten. Zum Beispiel in Chera et al. 2019 wurde prätherapeutisch mittels droplet-digital PCR die Konzentration von cfHPV-DNA von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC bestimmt. Hierbei wurde eine Sensitivität von 89% erreicht und eine Spezifität von 97%. In Veyer et al. 2020 konnte jedoch, ebenso mit der droplet-digital PCR-Technik, nur eine Sensitivität von 71% erreicht werden. Die gezeigte Bandbreite an unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den Studien sind neben den unterschiedlichen qPCR-Methoden auf vielfältige Faktoren zurückzuführen. Zum Beispiel spielen das Design der Primer sowie die Proben-Menge im Mastermix bzw. das Gesamtvolumen der extrahierten Blutprobe eine Rolle. Ebenso haben die Qualität der Proben und deren Lagerungsbedingungen Einfluss auf den Nachweis der cfDNA. Zell-freie DNA weist eine rasche Degradierung bei Abnahme in „normalen“ Probenröhrchen auf. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Blutproben in speziell hierfür entwickelten Probenbehältern gesammelt (Cell-Free DNA BCT, Streck La Vista, NE, USA). Dadurch soll das Problem der cfDNA-Degradation minimiert werden. Bezüglich der Lagerungsbedingungen scheint eine Lagerung der Plasmaproben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, wie auch in dieser Arbeit angewendet, für die Integrität der cfDNA gegenüber höheren Temperaturen wie z.B. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorteilhaft zu sein (El et al., 2013). Ebenso ist es möglich, dass die Zusammensetzung der Patientenkohorte und deren unterschiedliche

Tumorstadien Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität haben. Insgesamt lässt sich jedoch zeigen, dass die qPCR-Assays unserer Arbeit vergleichbare Ergebnisse liefern konnten, wie sie in der Literatur zu finden sind.

4.1.1 Assoziation zwischen der cfDNA-Konzentration und der beobachteten Tumorlast

Aus pathophysiologischer Sicht erwartet man einen Zusammenhang zwischen der Tumorlast, sprich der Anzahl an Tumorzellen bzw. der insgesamt vorhandenen Tumormasse im Körper, und der Konzentration tumorspezifischer cfDNA im Plasma. Je größer der Primärtumor und je höher die Anzahl und Größe seiner Metastasen, desto mehr DNA-Material sollte grundsätzlich mittels Apoptose und Nekrose in den Blutkreislauf gelangen (Valpione et al., 2018). Ein schnelles Tumorstadium erscheint auf den ersten Blick aufgrund der höheren Rate an Apoptose und Nekrose mit höheren Konzentrationen zell-freier Tumor-DNA (ctDNA) im Blut assoziiert zu sein. Es wurde jedoch in mehreren Studien eine Unabhängigkeit zwischen der ctDNA und dem Ki67-Index, einem im klinischen Alltag weit verbreitete Marker zur Messung der Proliferationsrate von Tumorzellen, gezeigt (Yingchi et al., 2017, Deutsch et al., 2024).

Die mit TaqMan nachgewiesene Konzentration von E6- und E7-cfHPV16-DNA war bei den acht Patienten mit größeren Tumoren (T3-4) im Durchschnitt signifikant höher als bei den 22 Patienten mit kleineren Tumoren (T0-1) (E6: $p=0,035$; E7: $p=0,031$). Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Arbeiten wie z.B. von Tanaka et al. 2022. Hierbei wurde ebenso eine positive Korrelation zwischen der Tumorgöße und der Konzentration der zirkulierenden HPV16-DNA (ctHPV₁₆-DNA) in den Blutproben von Patienten mit HPV16-positivem OPSCC nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, dass die virale DNA-Last zur Differenzierung zwischen den Tumorgößen verwendet werden kann. Andererseits jedoch deutet es auch auf die Möglichkeit hin, dass bei geringer Tumorlast die zellfreie DNA-Last unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Test-Assays liegen kann.

Betrachtet man die Ergebnisse des SYBR Green-Assay lässt sich im Hinblick auf den T-Status lediglich ein Trend (jedoch ohne statistische Signifikanz) hinsichtlich des Konzentrationsunterschieds kleiner vs. großer Tumor (T1-2 vs. T3-4) feststellen. Eine mögliche Ursache für das Nicht-Erreichen einer statistischen Signifikanz kann der geringe Stichprobenumfang mit ungleicher Verteilung der Patienten zwischen den

Gruppen (T1-2: n =13 vs. T3-4: n=4) sein. Eine mögliche Erklärung für die ungleiche Verteilung im T-Status ist, dass 72,9 % der HPV-positiven OPSCC bei Erstdiagnose als T1-T2 klassifiziert werden (Carlander et al. 2024).

In dieser Arbeit konnte weder mit TaqMan- noch mit SYBR Green qPCR ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von E6- oder E7-cfHPV16-DNA und dem Lymphknotenstatus, der Metastasierung oder der UICC-definierten Tumorstadien festgestellt werden.

Im Falle der Patienten mit Fernmetastasierung zeigte sich ein Trend für eine höhere Konzentration der cfHPV-DNA vor allem im Verlauf des Tumorprogresses bzw. eines Anstiegs der Tumorlast im Rahmen des weiteren Krankheitsverlaufs. Der Unterschied der prätherapeutischen Proben jedoch im Vergleich von Patienten mit und ohne Fernmetastasierung erwies sich in dieser Arbeit als nicht statistisch signifikant. Die fehlende statistische Signifikanz ist möglicherweise auf die geringe Anzahl und dadurch bedingte ungleichmäßige Verteilung der Proben zurückzuführen. Nur 5 der insgesamt 30 Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC wiesen eine Fernmetastasierung auf. Innerhalb der Kohorte, welche initial nur mit dem SYBR Green-Assay getestet wurde, hatten nur 3 von 17 Patienten den Lymphknotenstatus N0-1 (N0-1: n= 3 vs. $N \geq 2$: 14). Verglichen mit der Kohorte gemessen mit TaqMan qPCR, bei der 12 von 30 der HPV-assoziierten OPSCC einen Lymphknotenstatus von N0-1 aufwiesen, besteht eine ungleiche Verteilung. Solche Ungleichheit in der Charakteristikaverteilung in der beobachteten Kohorte mit der insgesamt geringen Patientenzahl beeinträchtigen die statistische Korrelationsanalyse der cfHPV-DNA-Werte mit den oben genannten Tumormerkmalen.

In den Arbeiten von Tanaka et al. 2022 sowie Chera et al. 2019 konnte gezeigt werden, dass in einer größeren Patientenkohorte (Tanaka et al., n=74; Chera et al., n=103) die Tumormasse, repräsentiert durch die Unterteilung im TNM-System, mit der Konzentration der cfHPV-DNA in HPV-assoziierten OPSCC korreliert. Hierbei wurde als Methode zum Nachweis der cfDNA eine droplet-digital PCR verwendet, welche als neuere qPCR-Methode eine hohe Sensitivität aufweist und keine Notwendigkeit für einen Konzentrationsstandard wie z.B. das TaqMan qPCR-Assay benötigt. Die Methode zeichnet sich jedoch durch eine geringere apparative Verfügbarkeit im klinischen Setting und deutlich höheren Kosten gegenüber TaqMan und SYBR Green bei vergleichbarer Sensitivität und Spezifität aus (siehe Kapitel 3.6.1).

Auch in weiteren Studien wurde eine Korrelation zwischen der cfHPV-DNA aus dem Blutserum vor der Behandlung und dem Lymphknotenstatus festgestellt. Allerdings konnte nicht immer eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors (T-Status) und der viralen cfDNA gezeigt werden (Kentnowski et al., 2023).

Es gibt auch andere Veröffentlichungen, bei denen kein Zusammenhang zwischen der Viruslast und dem Tumorstadium festgestellt werden konnte (Mirghani et al., 2011, Dahlstrom et al., 2015, Shimura et al., 2017). Betrachtet man die genannten Studien, zeigt sich, dass sich der Zusammenhang zwischen der Konzentration von cfHPV-DNA und realer Tumorlast bei HPV-assoziierten OPSCC nicht immer eindeutig darstellt und sicher reproduzierbar ist. Dies trifft wohl vor allem in Untersuchungen mit vergleichsweise kleinen Patientenkohorten zu. Studien mit größerer Patientenzahl wie z.B. die o.g. Studien von Tanaka et al. 2022 und Chera et al. 2019 haben Ergebnisse gezeigt, welche den Schluss zulassen, dass eine größere Tumormasse bzw. Tumorlast wie erwartet mit einer höheren Konzentration von cfHPV-DNA assoziiert ist.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der bisherig aus der Literatur verfügbaren Daten könnten darauf hinweisen, dass das von AJCC und UICC präsentierte Tumorstadium die vorliegende Tumorlast nicht vollständig abbildet und in gewissen Konstellationen falsch repräsentiert. Ein Beispiel hierfür ist ein Patient mit einem T4-Primärtumor ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen. Wenn eine erhöhte cfDNA aufgrund der hohen Tumorlast festgestellt wird, spiegelt sich dies jedoch nicht im N-Status wider. Wird die Konzentration der cfDNA nun mit dem N-Status korreliert, ergibt sich das fehlerhafte Bild, dass Patienten ohne Lymphknotenmetastasierungen höhere cfDNA-Konzentrationen aufweisen können. Eine solche Diskrepanz würde v.a. Untersuchungen mit kleinen Fallzahlen betreffen, bei denen ungewöhnlich konfigurierte Einzelfälle mehr ins Gewicht fallen. Die Klassifikationen zur Tumorstadium-Einteilung sind offensichtlich nicht linear aufgebaut und spiegeln somit nicht die „wahre“ zelluläre Tumorlast dar.

Die Differenzierung der einzelnen TNM-Stadien ist jedoch nicht darauf ausgelegt, die Tumorlast möglichst genau darzustellen, sondern bietet eine standardisierte Methode, um die Ausdehnung und Verbreitung des Tumors zu bewerten, welche entscheidend für die Prognoseabschätzung und Therapieplanung ist. So ist der Unterschied zwischen N1- und N2-Status bei OPSCC sehr heterogen mit Aufteilung in drei Untergruppen (N2a-c) definiert. Der N2-Status kann sich unterschiedlich darstellen. Zum Beispiel ist ein ipsilateraler, vereinzelter Lymphknoten >3cm als N2 zu werten. Ebenso entsprechen

jedoch auch mehrere einzelne Lymphknoten $<3\text{cm}$ ipsilateral einem N2-Status. Betrachtet man eine theoretische Tumorlast durch eine Lymphknotenmetastase von 3cm Größe (N1) und vergleicht diese mit zwei Lymphknotenmetastasen der Größe je 1cm (N2) so ist die Vermutung, dass der einzelne Lymphknoten eine deutlich höhere Tumorlast präsentiert. Betrachtet man die Lymphknoten als Kugeln, entspräche der Unterschied der Volumina bei den genannten Durchmessern 1:7 für den einzelnen großen Lymphknoten (3cm Durchmesser = ca. $14,137\text{cm}^3$) vs. zwei kleine Lymphknoten (je 1cm Durchmesser = ca. $2 \times 1,046\text{cm}^3$) (van Gysen et al., 2019).

Dies zeigt die Schwäche der bisherigen klassischen Tumorklassifikation, welche für die Therapieentscheidung wesentliche Auswirkungen haben kann. Möglicherweise kann die Konzentration von cfHPV-DNA vor Therapiebeginn bei Patienten mit HPV-pos. OPSCC als weiteres Kriterium der Stadieneinteilung und zur Widerspiegelung der Tumorlast verwendet werden. Hierfür müssen die derzeitigen Untersuchungsprotokolle weiter optimiert und vereinheitlicht sowie Einteilungen an größeren Patientenpopulationen verifiziert werden.

Im Großen und Ganzen ist in der Zusammenschau der bisherigen Studienlage jedoch davon auszugehen, dass die Konzentration von cfHPV-DNA mit der realen Tumorlast bei HPV-assoziierten OPSCC korreliert (nicht jedoch zwangsläufig mit der klassischen Stadien-Einteilung) und sich dies bei ausreichender Kohortengröße auch statistisch signifikant zeigen lässt.

4.1.2 cfDNA-Konzentration als Monitor in der Tumor-Nachsorge

In dieser Arbeit wurde versucht zu zeigen, dass der Nachweis von E6- und E7-cfHPV-DNA zur Überwachung des therapeutischen Ansprechens und zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs und/oder Tumorprogresses bei OPSCC-Patienten im Rahmen der Nachsorge genutzt werden kann.

Unter Verwendung von SYBR Green- und TaqMan-basierter PCR zeigte sich bei posttherapeutischen Plasmaproben von Patienten ohne Rezidivgeschehen oder Tumorprogress ein signifikanter Rückgang der cfHPV-DNA im Vergleich zu prätherapeutischen Proben. Im Rahmen dieser Patientengruppe stellte sich auch in der weiteren Nachsorge bis zu 15 Monate nach Therapie kein klinisch nachgewiesenes Rezidivgeschehen dar und die cfHPV-DNA verblieb durchgehend in einem niedrigen bis nichtmessbaren Bereich.

Betrachtet man die Patienten mit klinisch nachgewiesenem Rezidiv oder Tumorprogress, konnte bei allen fünf eingeschlossenen Patienten initial nach Therapie ein Abfall der cfHPV-DNA beobachtet werden. Anschließend zeigte sich jedoch im Gegensatz zu Patienten ohne Rezidiv bzw. Progress ein erneuter Anstieg der cfHPV-DNA-Konzentration im Plasma. Hierbei präsentierte sich bei drei der fünf Patienten der Anstieg bevor das Rezidiv bzw. der Tumorprogress durch eine konventionelle Routineuntersuchung diagnostiziert wurde (s. Abb. 30, 31). Bei diesen drei Patienten war der Primärtumor zwischen 2015 und 2017 erneut aufgetreten, d. h. innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums von bis zu 15 Monaten. In diesem Zeitraum stellt sich die Rezidivrate bekanntermaßen bei OPSCCs besonders hoch dar (13-25% in den ersten zwei Jahren) (Faraji et al., 2017). Bei den übrigen zwei Patienten wurde die Diagnose bereits vor dem gemessenen Anstieg der cfHPV-DNA-Konzentration im Plasma gestellt. Dies kann auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenentnahme und der Untersuchungen zurückzuführen sein. Die Entnahmezeitpunkte fanden im Rahmen der regulären Nachsorgetermine der HNO-Ambulanz des Universitätsklinikums Gießen statt und waren teilweise unabhängig von den Nachsorge-Bildgebungen, welche teilweise extern stattfanden.

In Hinblick auf residuales Vorliegen von cfHPV-DNA nach erfolgter Therapie lassen sich in der Literatur einige wenige Beispiele finden. Zum Beispiel zeigte eine Arbeit, dass HPV-assoziierte OPSCC während der Nachbeobachtung von bis zu 28 Tagen nach der Chemotherapie in Blutproben mäßig hohe (>200 Kopien/ml) Kopienzahlen von cfHPV-DNA präsentierten (Chera et al., 2019). Es wird allgemein angenommen, dass die Beseitigung der cfHPV-DNA nach der Therapie graduell im Laufe der Zeit erfolgt, was zu einer niedrigen Kopienzahl der viralen cf-DNA in der Blutbahn von HPV-assoziierten OPSCC-Patienten führt (Cao et al., 2012, Chera et al., 2019, Wuerdemann et al., 2020). In dieser Arbeit präsentiert sich die cfHPV-DNA allerdings während der Nachbeobachtung nach der Therapie als sehr niedrig und in den meisten Fällen als nicht messbar. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die ersten Proben im Rahmen der Nachsorge mit im Median 4,6 Monate nach Therapiebeginn deutlich später als in der genannten Studie gesammelt wurden.

In einer weiteren Studie wurden ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit gezeigt. Hierbei konnte bei drei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC nach Entwicklung eines

Rezidivs ein erhöhter Spiegel der cfHPV-DNA (bis zu 542 Kopien/ml) im Blut nachgewiesen werden (Cao et al., 2012).

Im klinischen Alltag sind Instrumente zur frühzeitigen Detektion von zunehmender oder wiederkehrender Tumorlast im Rahmen der vielfältigen Therapiemöglichkeiten bei Rezidivsituationen wichtig. Die bisherigen Ergebnisse zur Messung von cf-HPV-DNA deuten darauf hin, dass diese Methode in Zukunft als nützliches Werkzeug zur klinischen Entscheidungsfindung beitragen kann. Hierzu werden jedoch weitere Studien mit großer Patientenkohorte benötigt, um die bisherigen Ergebnisse zu validieren und Testkits für den klinischen Alltag zu entwickeln.

4.2 Vergleich von TaqMan- und SYBR Green-basierten qPCR-Detektionsmethoden für cfHPV16-DNA

Das qPCR-Verfahren ist in klinischen Laboren zur Diagnose von Virusinfektionen wegen seiner hohen Empfindlichkeit, Spezifität, Reproduzierbarkeit und aufgrund der fehlenden post-PCR-Schritte eine häufig eingesetzte Methode (Josko, 2010). Das Verfahren und die Primerdesigns haben sich in den letzten Jahren verbessert, während gleichzeitig die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Geräte gesunken sind, sodass die molekulare Diagnostik in vielen klinischen Laboren neben der Immunhistochemie zur Routine geworden ist. Inzwischen gilt sie vielfach als der "Goldstandard" im klinischen Alltag und in der Forschung für den Nachweis von humaner und viraler DNA/RNA (Josko, 2010). In der Covid-19-Pandemie zeigte sich das qPCR-Verfahren als effektive und schnelle Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von SARS-COV-2-Viren (Dorlass et al., 2020; Sarkar et al., 2022; Marinowic et al., 2021).

Im Rahmen dieser Arbeit begannen wir zunächst mit SYBR Green qPCR aufgrund der Verfügbarkeit und der in unserem Forschungslabor bereits etablierten Assays zur Analyse der cfHPV-DNA. Im Verlauf wurden jedoch die Schwächen der Methode, welche in den folgenden Absätzen näher erläutert werden, zunehmend sichtbar und wir begannen mit der Verwendung von TaqMan qPCR. Hierbei entwickelten wir im Rahmen dieser Arbeit ein passendes Assay für unsere Fragestellung, sprich die Nutzung von cfHPV-DNA als Biomarker für das Monitoring des Krankheitsverlaufes während des Zeitraumes der Tumornachsorge. Im abschließenden Vergleich zeigte sich jedoch, dass sich sowohl SYBR Green- als auch TaqMan-Assays für unsere Anwendung eignen und die Methoden zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen den

Methoden wurden in Kapitel 3.6 vorgestellt und es soll hier nachfolgend auf die möglichen Ursachen der Diskrepanzen sowie die Vor- und Nachteile der Methoden eingegangen werden.

Im Allgemeinen wies die SYBR Green-Messung von E6- und E7-cfDNA in dieser Arbeit bei Patientenproben vor der Behandlung eine größere Standardabweichung in der Konzentration auf als bei den vergleichbaren Messungen mit dem TaqMan-Assay. Dies könnte auf die Empfindlichkeit der Methode sowie die unterschiedlichen Kohortengröße (SYBR Green n=22, TaqMan n=50) zurückzuführen sein. Mit nur einem falsch negativen Fall von insgesamt 22 Fällen war SYBR Green in der Lage, alle fünf HPV-negativen (n=5/5) und 16 der HPV-positiven OPSCC-Fälle (n=16/17) korrekt zu identifizieren. Mittels TaqMan qPCR konnte ebenso effizient die HPV-negative OPSCC identifiziert werden und es zeigte sich lediglich bei einem Patienten eine falsch-positive Messung von E6-cfDNA, wobei allerdings E7 hier gleichzeitig nicht detektiert wurde (n=19/20). Von 30 HPV-assoziierten OPSCC-Proben waren sieben als falsch-negativ für E6 oder E7 und vier falsch negativ für E6 und E7-cfDNA erkannt worden. In dieser Arbeit zeigte sich somit die Sensitivität und Spezifität von TaqMan mit 77-87 % bzw. 95-100 % gering schlechter als die von SYBR Green (Sensitivität: 94 % und Spezifität: 100 %). Allerdings ist die Kohorte der mittels TaqMan getesteten Patienten doppelt so groß wie die mit SYBR Green getestete Kohorte und es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass in letzterer besonders wenige uneindeutige Proben vorhanden waren und die Ergebnisse hier zufällig „besonders gut“ ausfielen. Trotz der theoretisch höheren Spezifität durch die Nutzung von TaqMan-Sonden wurden in mehreren Studien ähnliche Ergebnisse bei Vergleichen zwischen SYBR Green und TaqMan erzielt (Mohamadhasan et al., 2014; Peng et al., 2017; Arikawa et al., 2008).

Die gemessene Konzentration der cfHPV-DNA E6/E7 war unter Verwendung von TaqMan statistisch signifikant höher als mit SYBR Green (E6: 7,6-fach, $p \leq 0,001$ und E7: 3,1-fach, $p = 0,007$). Hierbei zeigte jedoch die lineare Regressionsanalyse grundsätzlich eine sehr hohe Übereinstimmung der Messung beider Methoden (s. Abb. 27). Das heißt, es konnten ähnliche Konzentrationen gemessen werden, jedoch in verschiedenen Größenordnungen zwischen den Methoden. Der Konzentrationsunterschied basiert daher nicht auf unterschiedlichen Konzentrationen der Proben, sondern ist auf die Unterschiede der Test-Methoden zurückzuführen. Eine mögliche Ursache für die höheren Messwerte in der TaqMan-qPCR ist zum Beispiel die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes:

Aufgrund der Möglichkeit zur Multiplex-PCR im TaqMan-Assay war es möglich, alle drei Targets (E6/E7/Beta-Globulin) in einem Reaktionsansatz zu amplifizieren und zu quantifizieren. Hiermit mussten unter Verwendung von Triplets pro Probe nur drei Reaktionskammern verwendet werden. Unter Anwendung des SYBR Green-Assays sind hingegen für drei Targets bei fehlendem Multiplexing insgesamt neun Reaktionskammern pro Probe notwendig. Dies bedeutet, dass eine deutliche höhere Menge der Probe pro Messung mittels SYBR Green verbraucht wird. Aus 500µl Plasma wurden 30-40µl Probeneluat gewonnen und für einen Testdurchlauf verwendet. Die Menge des Probeneluats wurde bei SYBR Green auf neun Reaktionskammern verteilt (jeweils 2,5 µl für E6- oder E7-cfHPV-DNA und 1,5 µl für Beta-Globulin). Bei TaqMan hingegen war es möglich, größere Mengen des Probeneluats pro Reaktion zu verwenden (jeweils 4 µl pro Replikatanalyse). Ein höheres Volumen der Probe im Reaktionsmix erhöht die Chance der Detektion von intakter cfDNA.

Der Unterschied zwischen der Zusammensetzung des Mastermixes mit Erhöhung des Probenanteils kann jedoch auch einen negativen Effekt auf die Amplifikation haben. Vermehrtes Probenmaterial erhöht zusätzlich die Konzentrationen von Inhibitoren wie z.B. Hämoglobin oder Proteasen und verändert den pH-Wert des Mastermixes. Diese Störfaktoren können die Reaktion während der PCR und die Messung des freiwerdenden Lichtsignals beeinflussen (Schrader et al., 2012).

Eine weitere mögliche Ursache der Messwertunterschiede ist die Verwendung verschiedener Primer-Sequenzen, welche durch deren möglicherweise unterschiedliche Spezifität und Interaktionsmöglichkeiten im Mastermix (z.B. Dimerbildung) das Ergebnis beeinflussen können. Die Verwendung anderer Primer-Sequenzen, als bei dem SYBR Green-Assay führte auch zu einer unterschiedlichen Länge der Amplicons bei den beiden Methoden: In dieser Arbeit wurden für das TaqMan-Assay Amplicons mit kürzerer Basenlänge verwendet als bei dem SYBR Green-Assay (E6: 81bp vs. 134bp; E7: 67bp vs. 115bp, bp = base pair). Grund hierfür ist der Unterschied der Signalerzeugung zwischen den Methoden. SYBR Green ist ein Farbstoff, welcher in Doppelstrang-DNA interkaliert und danach bei Lichtanregung ein Fluoreszenzsignal ausstrahlt. Je länger das Amplicon, desto stärker ist das Signal und somit die Nachweisbarkeit des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Bei der TaqMan-PCR jedoch wird das zu messende Fluoreszenzsignal durch Freisetzung des am 5'-Ende vorhandenen Fluorophors der Sonde produziert. Dieses wird freigegeben, nachdem die

Sonde an die Ziel-DNA-Sequenz anbindet und anschließend der Abbau mittels der Taq-Polymerase während der PCR erfolgt. Findet keine Anbindung oder Reaktion mit der Polymerase statt, wird das Fluoreszenzsignal von einem am 3'-Ende der Sonde hängenden Quencher unterdrückt. Somit ist das Signal unabhängig von der Amplicon-Länge.

Wichtig ist die Spezifität der Sonde in Bezug auf die gesuchte DNA-Sequenz (Waldron et al., 2017). Wir konnten daher für das TaqMan-Assay kürzere Amplicons wählen, welche einen Vorteil bei der Detektion von zellfreier DNA besitzen. Zellfreie DNA entsteht in der Regel durch Zellnekrose oder Apoptose und es werden hierbei DNA-Stücke unterschiedlicher Länge in die Blutbahn gebracht. In der Literatur wird die Länge der zellfreien DNA im Plasma durchschnittlich zwischen 40 und 200 bp mit einem Häufigkeitsgipfel bei 166 bp beschrieben (Kustanovich et al., 2019). Die Ursache dieser spezifischen Länge wird auf die Länge der DNA zurückgeführt, welche sich um ein Histon windet (DNA in einen Nucleosom 147 bp plus 20 bp linker DNA) (Stejskal et al., 2023). Unter Verwendung kürzerer Amplicons ist die Wahrscheinlichkeit zur Detektion cfDNA unterschiedlicher Längen höher als bei Amplicons nahe der Maximallänge von zellfreier DNA. Dies konnte in der Literatur ebenso gezeigt werden (Mouliere et al., 2011).

Die Entscheidung für die Verwendung kürzerer Amplicons wurde im Rahmen der Entwicklung des TaqMan-Assays aufgrund dieser Beobachtungen und der oben erwähnten technischen Unterschiede zum SYBR Green-Assay bewusst gewählt. Daher ist es wahrscheinlicher, dass in dieser Arbeit unter Verwendung des TaqMan-Assays die "wahre Konzentration" von cfHPV-DNA im Plasma gemessen wurde und dagegen mit den längeren Amplicons des SYBR Green-Assay grundsätzlich niedrigere Konzentrationen gemessen wurden (E6: 7,6-fache und E7: 3,1-fache Konzentration bei TaqMan vs. SYBR Green).

Bei Beta-Globulin ließ sich mit Hilfe von TaqMan eine statistisch signifikant höhere Konzentration gegenüber SYBR Green messen, jedoch ließ sich in der linearen Regressionsanalyse keine signifikante Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen beider Methoden finden. Dies ist vermutlich auf Ausreißer in den Datenpunkten mit starker Spannweite der Konzentrationen aufgrund der geringen Kohortengröße zurückzuführen.

Der DNA-Nachweis mit SYBR Green basiert in erster Linie auf der Intensität des Fluoreszenzsignals, das bei der Bindung des SYBR Green-Farbstoffs an eine Doppelstrang-DNA und nach Anregung mittels Belichtung entsteht. Die Methode ist relativ einfach in der Anwendung und kostengünstiger als die TaqMan qPCR-Methode. Die Spezifität mit SYBR Green qPCR kann jedoch durch die Bildung von Primer-Dimeren, mangelnde Spezifität der Primer und die Bildung von Sekundärstrukturen im PCR-Produkt beeinträchtigt werden (Ponchel et al., 2003, Zhang et al., 2022).

In dieser Arbeit war der Nachweis von E6 und E7 mit SYBR Green qPCR in Hinsicht auf Sensitivität und Spezifität vergleichbar mit dem TaqMan-basierten Nachweis. Ähnliche Ergebnisse konnten bei dem Vergleich beider Methoden im Rahmen von Untersuchungen während des Nachweises von SARS-COV-2 gefunden werden. Hierbei wurde berichtet, dass das TaqMan-Assay geringfügig bessere Ergebnisse liefert, jedoch das SYBR Green-Assay ebenso eine valide und kostengünstigere Alternative zum Erregernachweis bei Covid-19-Patienten darstellt (Pereira-Gómez et al., 2021). Ähnliche Erkenntnisse wurden in einer anderen Studie erbracht, in welcher SYBR Green beim Nachweis von E7 cfDNA bei Gebärmutterhalskrebs als eine attraktive Alternative zur TaqMan qPCR dargestellt wird (Scheurer et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl mit Hilfe von TaqMan-qPCR als auch SYBR Green-qPCR cfDNA aus Plasma zuverlässig nachgewiesen werden kann. SYBR Green bietet den Vorteil einer breiten Verfügbarkeit in Laboren und gegenüber anderen quantitativen PCR-Methoden wie z.B. TaqMan oder droplet-digital PCR ist die Methode vergleichsweise kostengünstig. Die TaqMan-qPCR hingegen bietet den großen Vorteil der Möglichkeit zur Multiplex-PCR, bei der mehrere Targets pro Reaktionskammer gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert werden können. Dies ermöglicht die Analyse größerer Probenmengen pro PCR-Durchlauf und hilft, Probenmaterial effizienter nutzen zu können. Der Aspekt der effizienten Verwendung des Probenmaterials und möglichen Probeneinsparung war aufgrund des retrospektiven Aufbaus und begrenzter Probenmenge pro Patienten in dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Dies war einer der Hauptgründe, weshalb im Rahmen dieser Arbeit ein Wechsel der Methode stattfand und ein Großteil der Patientenproben lediglich mittels der TaqMan-Methode analysiert wurde.

In vielen neueren Studien, welche sich mit cfHPV-DNA bei HPV-assoziierten OPSCC befassten, wurde die Methode der droplet-digitalen PCR verwendet (Tanaka et al., 2022;

Veyer et al., 2020; Chera et al., 2019). Droplet-digitale PCR ist eine modernere quantitative PCR-Methode und birgt den Vorteil gegenüber SYBR Green und TaqMan, dass hierbei keine Standard-Proben mit festgelegter Konzentration benötigt werden. Die Methode ist jedoch wesentlich kostspieliger und im klinischen Alltag noch wenig verfügbar.

Ebenso gab es Untersuchungen zur Detektion von cfHPV-16-DNA unter Verwendung von Next-Generation-Sequenzierung (NGS) bei lokal fortgeschrittenem HPV-assoziierten Kopf- und Halskrebs. Die NGS von HPV16 konnte zuverlässig cfHPV-DNA im Plasma nachweisen. Allerdings ist diese Methode, abgesehen von spezifischen Anwendungen und optimierten Arbeitsabläufen, sehr zeitaufwändig und kostenintensiv (Lee et al., 2017).

Die Ergebnisse bzgl. Sensitivität und Spezifität in den oben erwähnten Studien zeigten sich hierbei vergleichbar mit unseren Analysen. Für die Nutzung im klinischen Alltag könnte sich daher die kostengünstigere Methode aufgrund der Wirtschaftlichkeit und der Verfügbarkeit auch außerhalb spezialisierter Zentren etablieren bzw. über einen längeren Zeitraum behaupten. Zum Beispiel hatte sich die SYBR Green qPCR während der Corona-Pandemie weltweit als effiziente und kostengünstige Methode zur Diagnostik von SARS-COV2-positiven Patienten bewährt, insbesondere in ressourcenlimitierten Ländern und mobilen Testzentren, wo schnelle und erschwingliche Diagnosetests erforderlich waren (Dorlass et al., 2020; Sarkar et al., 2022; Marinowic et al., 2021).

4.3 Stärken und Schwächen dieser Arbeit und Limitationen der cfDNA-Bestimmung

Zu den Einschränkungen dieser Arbeit gehört der geringe Stichprobenumfang der Kohorte. Die Anzahl der Patienten ist auf die geringe Inzidenz von HPV-assoziierten OPSCC sowie die monozentrische Probensammlung im Universitätsklinikum Gießen zurückzuführen. Aus diesem Grund mussten Proben über mehrere Jahre gesammelt werden, um eine ausreichende Patientenkohorte zu generieren. Dies führte zu einem retrospektiven Studienaufbau. Des Weiteren war die Anzahl der Proben stark abhängig von der Kooperation im klinischen Alltag. Die Nachsorgetermine der Patienten waren keinem festen Schema mit genauen Zeitabständen zugeordnet und Proben konnten teilweise nicht konsequent bei jedem Termin gesammelt werden. Eine lückenlose Sammlung zu festen Zeitpunkten während des Nachsorgezeitraums erfordert eine hohe

Compliance von Seiten der Patienten und Kooperation des klinisch arbeitenden Teams. Dies ist im Alltag nicht immer gegeben und stark abhängig von den individuellen Verläufen der Patienten. Eine Möglichkeit zur Verbesserung ist eine Weiterentwicklung standardisierter Protokolle zur Identifizierung der Patienten, welche sich für eine Probenasservierung eignen und bindende Festlegung, wann diese zu erfolgen hat. Zudem muss das klinische Personal zur Mitarbeit an Forschungsprojekten besonders sensibilisiert werden. Dies erfordert jedoch finanzielle und personelle Ressourcen, welche im klinischen Umfeld und im aktuellen Gesundheitswesen durch begrenzte Budgetierung bekanntermaßen limitiert sind.

Eine weitere Schwäche dieser Arbeit ist, dass nur der HPV-Subtyp 16 und nur die Virus-DNA für E6 und E7 bestimmt wurden. HPV-16 weist mit ca. 87–96 % zwar den größten Anteil unter den HPV-assoziierten OPSCC auf (Mallender, R., 2024), es gibt jedoch weitere onkogene HPV-Typen, welche mit OPSCC assoziiert sind (Faraji et al., 2017; Ferlay et al., 2019). Es werden somit mit unserem qPCR-Assay nicht alle HPV-assoziierten OPSCC, welche in der Bevölkerung auftreten, erfasst. Allerdings war durch die klinische Diagnostik bekannt, dass HPV16 der einzige vertretene Subtyp in unserer Kohorte war.

Trotz der oben genannten Einschränkungen sind die Ergebnisse dieser Arbeit konsistent mit Daten aus der vorhandenen Literatur (Hanna et al., 2018; Chera et al., 2019). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen berichten auch andere qPCR-basierte Nachweisstudien, dass die Konzentration an viraler cfDNA in Blutplasma oder Serum die HPV-Assoziation bei OPSCC vor der Behandlung erfolgreich identifizieren kann (Cao et al., 2012; Dahlstrom et al., 2015; Damerla et al., 2019). Dies unterstreicht die Eignung von cfHPV-DNA-Tests in Liquid Biopsies unabhängig von den für die Analyse verwendeten experimentellen Techniken.

Zu den Stärken dieser Arbeit gehören zum Beispiel die longitudinale Probenerhebung nach stattgefundener Therapie. In der vorhandenen Literatur und ähnlichen Studien werden zumeist nur die prätherapeutischen Proben oder z.B. nur eine posttherapeutische Probe untersucht. In dieser Arbeit hingegen wurden Nachsorgeproben über einen längeren Zeitraum mit einem Median von 7,15 und Maximum von 28,73 Monaten nach erfolgter Therapie mit im Durchschnitt 3,4 (min.: 1, max.: 7) posttherapeutischen Proben gesammelt.

Eine weitere Stärke ist, dass >75% der Patienten primär chirurgisch behandelt wurden, was in früheren Studien nicht der Fall war (Hanna et al., 2018; Chera et al., 2019). Dies führt zu einer besseren Homogenität und somit Vergleichbarkeit innerhalb der Kohorte.

Ein weiterer positiver Punkt in dieser Arbeit ist, dass in einigen Fällen gezeigt wurde, dass sich ein Nachweis von cfHPV-DNA als mögliche Methode zur Detektion von Tumorprogressen bzw. -rezidiven eignen kann.

Der Nachweis von zellfreier DNA weist aktuell nur eine begrenzte Möglichkeit zur Darstellung der Tumorarchitektur, der Entwicklung des Tumors oder der Mikroumgebung des Tumors auf (Lim et al., 2023). Es besteht eine hohe Varianz bzgl. der Höhe der individuellen Konzentration der cfHPV-DNA-Werte zwischen den Patienten, welche auf die unterschiedliche Tumorlast und andere Faktoren zurückzuführen sein kann (Cao et al., 2012; Dahlstrom et al., 2015; Lee et al., 2017; Rettig et al., 2022). Hierbei ist zu beachten, dass bei Verwendung von cfDNA der Konzentrationsverlauf eine höhere Relevanz aufweist als absolute Konzentrationswerte. Dies trifft auf beinahe alle Biomarker zu, welche als Tumormarker im klinischen Alltag verwendet werden (Nordheim et al., 2006).

Zusätzlich zur viralen cfDNA könnten klinische, histopathologische oder serologische Marker für eine bessere Überwachung der Subtypen von OPSCC-Patienten erforderlich sein, um die Diagnose zu verbessern, insbesondere während der Nachsorge nach der Therapie (Lim et al., 2023). Ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von cfHPV-DNA und den Lebensgewohnheiten der Patienten, wie z. B. Alkoholkonsum oder Rauchen, konnte in dieser Arbeit nicht hergestellt werden.

Eine weitere Grenze für die Nutzung von Liquid Biopsy ist die Stabilität der HPV-DNA. Einige Studien haben über einen DNA-Abbau sowie eine schlechte Wiedergewinnung von Nukleinsäuren während der Lagerung über einen längeren Zeitraum berichtet (Castle et al., 2003; Powell et al., 2006). Es hat sich gezeigt, dass HPV-DNA in Medien auf Formalinbasis bis zu 2,5 Jahre gelagert werden kann, aber die Wiederherstellung der DNA aus Formalin ist kompliziert (Agreda et al., 2013). Wiederholte Zyklen des Einfrierens/Auftauens von DNA verschlechtern ebenso die Qualität und Stabilität der Proben, was sich negativ auf die Empfindlichkeit des Nachweises auswirkt (Shao et al., 2012). In dieser Arbeit wurden einmal aufgetaute Plasmaproben nicht erneut eingefroren, sondern die DNA wurde nach dem Auftauen isoliert und in Elutionspufferlösung gelöst.

In Einzelfällen wurde jedoch das Eluat nicht direkt weiterverarbeitet, sondern bei -20 °C bis zur Durchführung der qPCR eingefroren. Hierbei ist ein möglicher Einfluss auf die cfDNA nicht auszuschließen. Für einen besseren Nachweis von cfHPV-DNA sind daher die Handhabung, Lagerung und Qualität der Proben wichtig, weshalb in diesem Bereich ebenfalls standardisierte Abläufe und Vorgaben etabliert werden müssen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen zellfreier DNA von HPV (cfHPV-DNA) in Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen Oropharynxkarzinomen untersucht. Zur Bestimmung dieser Konzentrationen wurden zwei verschiedene qPCR-Assays, SYBR Green und TaqMan, optimiert und deren Ergebnisse miteinander verglichen.

Primäres Ziel der Arbeit war es, die cfHPV-DNA vor sowie nach der Tumorthherapie zu messen und den Verlauf der DNA-Konzentration im Rahmen der Nachsorge zu verfolgen. Damit sollte überprüft werden, ob die Detektion von cfHPV-DNA als möglicher Biomarker im Rahmen der Nachsorge in Zukunft von Nutzen sein kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten qPCR-Assays verglichen mit dem Goldstandard (Immunhistochemie und HPV-DNA-Analyse aus dem Tumormaterial) ebenfalls erfolgreich zur diagnostischen Unterscheidung zwischen HPV-negativem und HPV-assoziiertem OPSCC verwendet werden können. Im Hinblick auf den Konzentrationsverlauf nach erfolgter Tumorthherapie zeigt sich, dass die cfHPV-DNA-Konzentrationen signifikant niedriger ausfielen als vor der Therapie. Im Falle von fehlenden bildgebenden Hinweisen auf eine weiterhin bestehende Tumorerkrankung verblieb die Konzentration von cfHPV-DNA über den beobachteten Zeitraum hinweg niedrig bis nicht nachweisbar. Patienten hingegen, welche eine metastasierte Erkrankung oder ein Tumorrezidiv aufwiesen, präsentierten im Verlauf des Beobachtungszeitraums steigende cfHPV-DNA-Konzentrationen. In einzelnen Fällen zeigte sich dieser Anstieg, bevor sich der Tumorprogress im Rahmen der konventionellen Nachsorgeuntersuchung darbot.

Das sekundäre Untersuchungsziel war es, den Zusammenhang zwischen der Konzentration von cfHPV-DNA und den Tumorcharakteristika, sprich TNM-Status und UICC-Stadium, zu beleuchten. Hierbei konnte mithilfe des TaqMan-Assays eine Korrelation gezeigt werden zwischen der cfHPV-DNA-Konzentration und der Tumorgröße, stratifiziert gemäß dem T-Status. Plasmaproben von Patienten mit Tumoren in der Größenkategorie T3-4 wiesen im Vergleich zur Gruppe mit T1-2 eine statistisch signifikante höhere Konzentration von cfHPV-DNA auf. Im Falle des SYBR Green-Assays erwies sich hierbei ein Trend in gleicher Richtung, jedoch ohne statistische

Signifikanz. Bezüglich der weiteren Tumorcharakteristika wie N-Status, M-Status und UICC-Stadium konnte kein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Als weiteres Untersuchungsziel der Arbeit wurden die beiden verwendeten qPCR-Assays hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität und der gemessenen Konzentrationshöhe verglichen. Hierbei wurden prätherapeutische Plasmaproben von einem Anteil der Patientenkohorte mittels beider Methoden getestet und die Ergebnisse nebeneinandergestellt. Beide Methoden wiesen eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität bei der Detektion von cfHPV-DNA auf. Die mittels der TaqMan-PCR gemessenen Konzentrationen von cfHPV-DNA überstiegen hierbei um ein Vielfaches die mit dem SYBR Green-Assay gemessenen. Mittels einer Regressionsanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass eine hohe Korrelation der gemessenen Werte zwischen den beiden Methoden besteht (E6: R^2 90,6%, $p < 0,001$; E7: $R^2 = 94,3\%$, $p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser explorativen Studie wertvolle Daten gesammelt werden konnten, welche zeigen, dass cfHPV-DNA in Liquid Biopsies ein vielversprechender Biomarker bei HPV-bedingtem OPSCC zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens ist. Es konnte an beispielhaften Fällen präsentiert werden, dass der Nachweis von zellfreier HPV-DNA als Indikator für das Vorliegen einer residualen Erkrankung oder eines Rezidivgeschehen dienen kann.

Zu den Einschränkungen dieser Arbeit gehört unter anderem der geringe Stichprobenumfang der Kohorte und die ungleiche Verteilung der Tumorcharakteristika innerhalb dieser Kohorte. Dies ist auf die monozentrische Probensammlung im Universitätsklinikum Gießen und die niedrige Inzidenz HPV-assoziiierter OPSCC zum Zeitpunkt der Probensammlung zurückzuführen. Zudem präsentierte sich die Probenabnahme im klinischen Alltag während der Nachsorgeuntersuchungen oftmals als nicht lückenfrei und in Abhängigkeit der Termine der Patienten variierten die Abnahmezeitpunkte.

Zur Verifizierung der Ergebnisse dieser Arbeit und für die Etablierung von cfHPV-DNA als validen Biomarker im klinischen Alltag sind daher weitere prospektive Untersuchungen mit größeren Patientenkohorten und definierten Probenabnahmeplänen erforderlich.

Summary

In this study, the concentrations of cell-free HPV DNA (cfHPV-DNA) in plasma samples from patients with HPV-associated and HPV-negative oropharyngeal carcinomas were investigated. For measurement of these concentrations two different qPCR assays, SYBR Green and TaqMan, were optimized and the results compared.

The primary objective of the study was to measure cfHPV-DNA levels before and after tumor therapy and to monitor the DNA concentration over time during follow-up. The aim was to assess whether the detection of cfHPV-DNA could be useful as a potential biomarker in future follow-up care.

It was demonstrated that the qPCR assays used, when compared with the gold standard (immunohistochemistry and HPV DNA analysis from tumor tissue), were also successful in differentiating between HPV-negative and HPV-associated OPSCC. Regarding concentration trends following tumor therapy, cfHPV-DNA levels were significantly lower than before treatment. In cases where imaging such as CT-scans showed no evidence of residual tumor disease, cfHPV-DNA concentrations remained low or undetectable over the observation period. In contrast, patients with metastatic disease or tumor recurrence exhibited rising cfHPV-DNA levels during follow-up. In some cases, the increase of cfHPV-DNA levels was observed before tumor progression became apparent through conventional follow-up examinations.

The secondary aim of the study was to investigate the relation between cfHPV-DNA concentration and tumor characteristics, specifically TNM classification and UICC staging. A correlation between cfHPV-DNA concentration and tumor size, stratified by T status, was shown using the TaqMan assay. Plasma samples from patients with T3-4 tumors displayed statistically significantly higher cfHPV-DNA concentrations compared to those with T1-2 tumors. The SYBR Green assay presented a similar trend, although without statistical significance. Regarding other tumor characteristics such as N status, M status, and UICC stage, no significant differences in cfHPV-DNA concentration were observed.

Another objective of the study was to compare the two qPCR assays in terms of sensitivity, specificity and measured concentration levels. Pre-therapeutic plasma samples from a subset of the patient cohort were tested using both methods and the results were compared. Both methods demonstrated similarly high sensitivity and specificity in

the detection of cfHPV-DNA. However, the concentrations measured by TaqMan PCR were significantly higher than those measured with the SYBR Green assay. Regression analysis nonetheless revealed a high correlation between the values obtained by the two methods (E6: $R^2 = 90.6\%$, $p < 0.001$; E7: $R^2 = 94.3\%$, $p < 0.001$).

In summary, this exploratory study was able to gather valuable data indicating that cfHPV-DNA in liquid biopsies is a promising biomarker for monitoring disease progression and treatment response in HPV-associated OPSCC. Exemplary cases demonstrated that the detection of cell-free HPV DNA can serve as an indicator for the presence of residual disease or recurrence.

Limitations of this study include the small sample size of the cohort and the unequal distribution of tumor characteristics within it. This is due to the monocentric sample collection at the University Hospital of Giessen and the low incidence of HPV-associated OPSCC. Additionally, in routine clinical follow-up, blood sampling was often incomplete and time points of collection varied depending on patient appointments.

To validate the results presented in this study and to establish cfHPV-DNA as a reliable biomarker in clinical practice further prospective studies with larger patient cohorts and defined sampling protocols are required.

Literaturverzeichnis

Agreda et al. 2013

Agreda, P. M., G. H. Beitman, E. C. Gutierrez, J. M. Harris, K. R. Koch, W. D. LaViers, S. V. Leitch, C. E. Maus, R. A. McMillian, W. A. Nussbaumer, M. L. Palmer, M. J. Porter, G. A. Richart, R. J. Schwab and L. M. Vaughan (2013). "Long-term stability of human genomic and human papillomavirus DNA stored in BD SurePath and Hologic PreservCyt liquid-based cytology media." J Clin Microbiol 51(8): 2702-2706.

Amin et al. 2017

Amin, M. B., S. B. Edge, F. L. Greene, D. R. Byrd, R. K. Brookland, M. K. Washington, J. E. Gershenwald, C. C. Compton, K. R. Hess and D. C. Sullivan (2017). "The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging." CA Cancer J Clin 2017 Mar;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388. Epub 2017 Jan 17

Ang et al. 2010

Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tân, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond und M. L. Gillison (2010). "Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer." The New England Journal of Medicine 363(1): 24–35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217

Araldi et al 2018

Araldi, R. P., Sant'Ana, T. A., Módolo, D. G., de Melo, T. C., Spadacci-Morena, D. D., de Cassia Stocco, R., . . . de Souza, E. B. (2018). The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 1537-1556. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>

Arikawa et al. 2008

Emi Arikawa, Yanyang Sun, Jie Wang, Qiong Zhou, Baitang Ning, Stacey L Dial, Lei Guo & Jingping Yang (2008). "Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study" BMC Genomics volume 9, Article number: 328 (2008)

Aziz et al. 2017

Aziz, H., C. Y. Ping, H. Alias, N. S. Ab Mutalib and R. Jamal (2017). „Gene Mutations as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets for Relapsed Acute Myeloid Leukemia.“ Front Pharmacol. 2017; 8: 897.

Bradley, 2022

Bradley, A. S. (2022). “Oropharyngeales Plattenepithelkarzinom.” <https://www.msdmanuals.com/de/profi/hals-nasen-ohren-krankheiten/kopf-und-halstumoren/oropharyngeales-plattenepithelkarzinom> (dl. 27.07.2025)

Brierley et al. 2017

James D. Brierley, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind, Daniel Raben, David M. Byrd, Mahul B. Amin & Brian O'Sullivan (2017). „TNM Classification of Malignant Tumours (8th edition).“ Wiley-Blackwell, Chichester, UK. ISBN: 978-1-119-26356-2.

Bronkhorst et al. 2019

Bronkhorst, A. J., V. Ungerer and S. Holdenrieder (2019). "The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management." Biomolecular Detection and Quantification 17: 100087.

Cao et al. 2012

Cao, H., A. Banh, S. Kwok, X. Shi, S. Wu, T. Krakow, B. Khong, B. Bavan, R. Bala, B. A. Pinsky, D. Colevas, N. Pourmand, A. C. Koong, C. S. Kong and Q. T. Le (2012). "Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients." Int J Radiat Oncol Biol Phys 82(3): e351-358.

Cao et al. 2022

Cao, Y., Haring, C. T., Brummel, C., Bhambhani, C., Aryal, M., Lee, C., . . . Brenner, J. C. (2022). „Early HPV ctDNA Kinetics and Imaging Biomarkers Predict Therapeutic Response in p16+ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.” Clin Cancer Res, 28(2), 350-359. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-21-2338

Carlander et al. 2024

Carlander, A. L. F., S. K. Bendtsen, J. H. Rasmussen, et al. (2024). "Clinical and prognostic differences in oropharyngeal squamous cell carcinoma in USA and Denmark, two HPV high-prevalence areas." European Journal of Cancer doi: 10.1016/j.ejca.2024.02.015.

Castle et al. 2003

Castle, P. E., A. Hildesheim, M. Schiffman, C. A. Gaydos, A. Cullen, R. Herrero, M. C. Bratti and E. Freer (2003). "Stability of archived liquid-based cytologic specimens." Cancer 99(5): 320-322.

Chan et al. 2017

Chan, K. C. A., J. K. S. Woo, A. King, B. C. Y. Zee, W. K. J. Lam, S. L. Chan, S. W. I. Chu, C. Mak, I. O. L. Tse, S. Y. M. Leung, G. Chan, E. P. Hui, B. B. Y. Ma, R. W. K. Chiu, S. F. Leung, A. C. van Hasselt, A. T. C. Chan and Y. M. D. Lo (2017). "Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer." N Engl J Med 377(6): 513-522.

Chera et al. 2019

Chera, B. S., S. Kumar, B. T. Beaty, D. Marron, S. Jefferys, R. Green, E. C. Goldman, R. Amdur, N. Sheets and R. Dagan (2019). "Rapid clearance profile of plasma circulating tumor HPV type 16 DNA during chemoradiotherapy correlates with disease control in HPV-associated oropharyngeal cancer." Clinical Cancer Research 25(15): 4682-4690.

Christin et al. 2013

Christin, G., Aykut, T., Marc, D., Davina, G., Timo, S., & Jens, W. (2013). “The Role of p16 Expression as a Predictive Marker in HPV-positive Oral SCCHN – A Retrospective Single-center Study.” Anticancer Research, 33(3), 913.

Dahlstrom et al. 2015

Dahlstrom, K. R., G. Li, C. S. Hussey, J. T. Vo, Q. Wei, C. Zhao and E. M. Sturgis (2015). "Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer." Cancer 121(19): 3455-3464.

Damerla et al. 2019

Damerla, R. R., N. Y. Lee, D. You, R. Soni, R. Shah, M. Reyngold, N. Katabi, V. Wu, S. M. McBride and C. J. Tsai (2019). "Detection of early human papillomavirus-associated cancers by liquid biopsy." JCO precision oncology 3: 1-17.

Deutsch et al. 2024

Thomas M Deutsch, Fabian Riedel, Kathrin Haßdenteufel, Laura L Michel, Marc Sütterlin, Sabine Riethdorf, Klaus Pantel, Markus Wallwiener, Andreas Schneeweiss, Stefan Stefanovic (2024). „Relationship of Ki-67 index in biopsies of metastatic breast cancer tissue and circulating tumor cells (CTCs) at the time of biopsy collection.“ Arch Gynecol Obstet. 2024 Jan;309(1):235-248. doi: 10.1007/s00404-023-07080-y. Epub 2023 Jul 22.

Dietz et al. 2021

Dietz, A., Wichmann, G., & Wiegand, S. (2021). „Update zur Therapie des HPV-16-positiven Oropharynxkarzinoms.“ Laryngorhinootologie, 100(10), 832-844. doi:10.1055/a-1523-9045

Dorlass et al. 2020

Dorlass, E. G., C. O. Monteiro, A. O. Viana, C. P. Soares, R. R. G. Machado, L. M. Thomazelli, D. B. Araujo, F. B. Leal, E. D. Candido, B. L. Telezynski, C. A. Valério, V. N. Chalup, R. Mello, F. J. Almeida, A. S. Aguiar, A. C. M. Barrientos, C. Sucupira, M. De Paulis, M. A. P. Sáfiadi, D. G. B. P. Silva, J. J. M. Sodré, M. P. Soledade, S. F. Matos, S. R. Ferreira, C. M. N. Pinez, C. P. Buonafine, L. N. F. Pieroni, F. M. Malta, R. A. F. Santana, E. C. Souza, R. A. Fock, J. R. R. Pinho, L. C. S. Ferreira, V. F. Botosso, E. L. Durigon and D. B. L. Oliveira (2020). "Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR." Braz J Microbiol 2020 Sep;51(3):1117–1123. doi: 10.1007/s42770-020-00347-5.

Douillard et al. 2014

Douillard, J.-Y., G. Ostoros, M. Cobo, T. Ciuleanu, R. Cole, G. McWalter, J. Walker, S. Dearden, A. Webster, T. Milenkova and R. McCormack (2014). "Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC: Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status." Journal of Thoracic Oncology 9(9): 1345-1353.

El et al. 2013

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. „Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations.“ Clin Chim Acta, 2013, Vol. 424C, Page 222-230

Engel et al. 2008

Engel, K., Schmid, H., Hanke, J., Kaufmann, M., & Müller, A. (2008). „CA 15-3 und CEA als Tumormarker zur Rezidivdiagnostik beim Mammakarzinom.“ Gynäkologische Endokrinologie, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1026508>

Esfahani et al. 2022

Mohammad Shahrokh Esfahani, Emily G. Hamilton, Mahya Mehrmohamadi, Barzin Y. Nabet, Stefan K. Alig, Daniel A. King, Chloé B. Steen, Charles W. Macaulay, Andre Schultz, Monica C. Nesselbush, Joanne Soo, Joseph G. Schroers-Martin, Binbin Chen, Michael S. Binkley, Henning Stehr, Jacob J. Chabon, Brian J. Swarder, Angela B-Y Hui, Matthew J. Frank, Everett J. Moding, Chih Long Liu, Aaron M. Newman, James M. Isbell, Charles M. Rudin, Bob T. Li, David M. Kurtz, Maximilian Diehn & Ash A. Alizadeh (2022). „Inferring gene expression from cell-free DNA fragmentation profiles.“ Nature Biotechnology, volume 40, pages 585–597, <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01222-4>

Faraji et al. 2017

Faraji, F., D. W. Eisele and C. Fakhry (2017). "Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma." Laryngoscope Investigative Otolaryngology 2(1): 10-18.

Ferlay et al. 2018

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). „Cancer statistics for the year 2018: An overview.“ International Journal of Cancer, 144(8), 1–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

Ferlay et al. 2019

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., . . . Bray, F. (2019). “Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.” Int J Cancer, 144(8), 1941-1953. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

Ferreira et al. 2020

Ferreira, A. R., Ramalho, A. C., Marques, M., & Ribeiro, D. (2020). “The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections.” Cancers, 12(3). doi:10.3390/cancers12030646

Funk et al. 1997

Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., & Galloway, D. A. (1997). “Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein.” Genes Dev, 11(16), 2090-2100. doi:10.1101/gad.11.16.2090

Garnett et al. 2006

Garnett, T. O., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. J. (2006). “Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis.” Cell Death & Differentiation, 13(11), 1915-1926.

Geißler et al. 2013

Geißler, C., Tahtali, A., Diensthuber, M., Gassner, D., Stöver, T., & Wagenblast, J. (2013). “The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCs—a retrospective single-center study.” Anticancer Res, 33(3), 913-916.

Gorphe et al. 2022

Philippe Gorphe, Marion Classe, Samy Ammari, Gabriel Garcia, Caroline Even, Odile Casiraghi, Ingrid Breuskin, Yungan Tao, Stéphane Temam, Pierre Blanchard, Antoine Moya-Plana (2022). "Patterns of disease events and causes of death in patients with HPV-positive versus HPV-negative oropharyngeal carcinoma." Radiotherapy and Oncology, volume 168, Seiten 40–45. doi: 10.1016/j.radonc.2022.01.021. Epub 2022 Jan 29.

Hanna et al. 2018

Hanna, G. J., J. G. Supplee, Y. Kuang, U. Mahmood, C. J. Lau, R. I. Haddad, P. A. Jänne and C. P. Paweletz (2018). "Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer." Annals of Oncology 29(9): 1980-1986.

Holland et al. 1991

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). „Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.“ Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(16), 7276-7280.

Huibregtse et al, 1993

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1993). „Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins.” Mol Cell Biol, 13(8), 4918-4927. doi:10.1128/mcb.13.8.4918-4927.1993

Jamal et al. 2023

Jamal Z, & F, A. (2023). „Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.” In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. (dl. 27.07.2025)

Jiang et al. 2006

Jiang, W.-W., Zahurak, M., Goldenberg, D., Milman, Y., Park, H. L., Westra, W. H., . . . Califano, J. (2006). „Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients.” Int J Cancer, 119(11), 2673-2676. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.22250>

Jimenez Jimenez et al. 2016

Jimenez Jimenez AM, Ruttkay-Nedecky B, Dostalova S, Krejcova L, Michalek P, Richtera L, Adam V. (2016). „Specific magnetic isolation of E6 HPV16 modified magnetizable particles coupled with PCR and electrochemical detection.” Int J Mol Sci. 2016 17(5):585. doi:10.3390/ijms17050585.

Josko, 2010

Josko, D. (2010). "Molecular virology in the clinical laboratory." Clin Lab Sci 23(4): 231-236.

Kentnowski et al. 2023

Kentnowski, M., A. J. Cortez, A. M. Mazurek, J. Mrochem-Kwarciak, A. Hebda, U. Kacorzysk, K. Drosik-Rutowicz, E. Chmielik, P. Paul, K. Gajda, I. Łasińska, B. Bobek-Billewicz, A. d'Amico, K. Składowski, M. Śnietura, D. L. Faden and T. W. Rutkowski (2023). "Determinants of the level of circulating-tumor HPV16 DNA in patients with HPV-associated oropharyngeal cancer at the time of diagnosis." Scientific Reports 13(1): 21226.

Kobayashi et al. 2018

Kobayashi, K., Hisamatsu, K., Suzui, N., Hara, A., Tomita, H., & Miyazaki, T. (2018).” A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer.” Journal of Clinical Medicine, 7(9). Retrieved from doi:10.3390/jcm7090241

Koole et al. 2015

Koole, K., Van Kempen, P. M. W., Van Bockel, L. W., Smets, T., Van Der Klooster, Z., Dutman, A. C., Van Es, R. J. J. (2015). „FGFR4 is a potential predictive biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.” Pathobiology, 82(6), 280-289.

Kwon et al. 2020

Kwon, S., Ahn, S.-H., Jeong, W.-J., Jung, Y. H., Bae, Y. J., Paik, J. H., Kim, H. (2020). „Estrogen receptor α as a predictive biomarker for survival in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma.” Journal of Translational Medicine, 18(1), 1-12.

Kustanovich et al. 2019

Anatoli Kustanovich, Ruth Schwartz, Tamar Peretz, Albert Grinshpun (2019). "Life and death of circulating cell-free DNA" Cancer Biol Ther. 2019;20(8):1057-1067. doi: 10.1080/15384047.2019.1598759.

Laban et al. 2021

Laban, S., Brand, M., Ezić, J., Doescher, J., Völkel, G., Kestler, H. A., Hoffmann, T. K. (2021). "Tumorbiologie des Oropharynxkarzinoms." HNO, 69(4), 249-255. doi:10.1007/s00106-020-00964-4

Lauritano et al. 2019

Lauritano, D., L. Oberti, F. Gabrione, A. Lucchese, M. Petruzzi, F. Carinci and L. Lo Muzio (2019). "Liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma: Prognostic significance of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. A systematic review." Oral Oncology 97: 7-17.

Leemans et al. 2011

Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). „The molecular biology of head and neck cancer.“ Nature Reviews Cancer, 11(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2982

Lee et al. 2017

Lee, J. Y., I. Garcia-Murillas, R. J. Cutts, D. G. De Castro, L. Grove, T. Hurley, F. Wang, C. Nutting, K. Newbold, K. Harrington, N. Turner and S. Bhide (2017). "Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma." British Journal of Cancer 117(6): 876-883.

Lewis et al. 2010

Lewis, J. S. Jr., W. L. Thorstad, R. D. Chernock, B. H. Haughey, J. H. Yip, Q. Zhang und S. K. El-Mofty (2010). "p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status." American Journal of Surgical Pathology 34(8): 1088–1096. doi:10.1097/PAS.0b013e3181e84652.

Lim et al. 2014

Lim, A. M., Do, H., Young, R. J., Wong, S. Q., Angel, C., Collins, M., Solomon, B. (2014). "Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome." Int J Cancer, 135(4), 887-895. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.28727>

Lim et al. 2023

Lim, A. M., H. Do, R. J. Young, S. Q. Wong, C. Angel, M. Collins, E. A. Takano, J. Corry, D. Wiesenfeld, S. Kleid, E. Sigston, B. Lyons, S. B. Fox, D. Rischin, A. Dobrovic and B. Solomon (2014). "Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome." International Journal of Cancer 135(4): 887-895.

Lin et al. 2004

Lin, J. C., W. Y. Wang, K. Y. Chen, Y. H. Wei, W. M. Liang, J. S. Jan and R. S. Jiang (2004). "Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma." N Engl J Med 350(24): 2461-2470.

Mallender 2024

Mallender, R. (2024). „The Pathogenesis of Human Papillomavirus (HPV) in Cancer of the Oropharynx.“ PhD Thesis University of Derby College of Science and Engineering doi: <https://doi.org/10.48773/q8x99>

Mandel & Metais 1948

Mandel, P., & Metais, P. (1948). "Nuclear Acids In Human Blood Plasma." C R Seances Soc Biol Fil, 142(3-4), 241-243.

Marinowic et al. 2021

D. R. Marinowic, G. Zanirati, F. V. F. Rodrigues, M. V. C. Grahl, A. M. Alcará, D. C. Machado & J. C. Da Costa (2021). "A new SYBR Green real-time PCR to detect SARS-CoV-2" Scientific Reports volume 11, Article number: 2224 (2021)

Mauer et al. 2015

Mauger, F., Dulary, C., Daviaud, C., Deleuze, J.-F., & Tost, J. (2015). "Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma." Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407(22), 6873-6878. doi:10.1007/s00216-015-8846-4

McLaughlin-Drubin et al. 2013

McLaughlin-Drubin, M. E., Park, D., & Munger, K. (2013). "Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(40), 16175–16180. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1310432110>

Mehanna et al. 2023

Mehanna, H., Taberna, M., von Buchwald, C., Tous, S., Brooks, J., Mena, M., Alemany, L. (2023). "Prognostic implications of p16 and HPV discordance in oropharyngeal cancer (HNCIG-EPIC-OPC): a multicentre, multinational, individual patient data analysis." Lancet Oncol, 24(3), 239-251. doi:10.1016/s1470-2045(23)00013-x

Mirghani et al. 2011

Mirghani, H., F. Moreau, M. Lefèvre, C. Tam, S. Périé, P. Soussan and J. L. St Guily (2011). "Human Papillomavirus Type 16 Oropharyngeal Cancers in Lymph Nodes as a Marker of Metastases." Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery 137(9): 910-914.

Mohamadhasan et al. 2014

Tajadini, Mohamadhasan; Panjehpour, Mojtaba; Javanmard, Shaghayegh Haghjooy (2014) "Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes" Advanced Biomedical Research 3(1):p 85, | DOI: 10.4103/2277-9175.127998

Mouliere et al. 2011

Florent Mouliere, Bruno Robert, Erika Arnau Peyrotte, Maguy Del Rio, Marc Ychou, Franck Molina, Celine Gongora, Alain R. Thierry (2011). "High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA" PLOS ONE doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023418>

Munger et al. 2013

Munger, K., Gwin, T. K., & McLaughlin-Drubin, M. E. (2013). "p16 in HPV-associated cancers." Oncotarget, 4(11), 1864-1865. doi:10.18632/oncotarget.1523

Nakahara & Kiyono 2016

Nakahara, T., & Kiyono, T. (2016). "Interplay between NF-κB/interferon signaling and the genome replication of HPV." Future Virology, 11(2), 141-155. doi:10.2217/fv.16.2

Nguyen et al. 2002

Nguyen, D. X., Westbrook, T. F., & McCance, D. J. (2002). "Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest." Journal of virology, 76(2), 619-632.

Nordheim et al. 2006

A. Nordheim, B. Lüscher (auth.), Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll, Prof. Dr. med. Klaus Höffken, Prof. Dr. med. Kurt Possinger (eds.) (2006). "Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie" Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2006. ISBN: 978-3-540-20657-6

Pal & Kundu 2020

Pal, A., & Kundu, R. (2020). "Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy." Frontiers in Microbiology, 10.

Pan et al. 2018

Pan, C., Issaeva, N., & Yarbrough, W. G. (2018). "HPV-driven oropharyngeal cancer: current knowledge of molecular biology and mechanisms of carcinogenesis." Cancers of the Head & Neck, 3(1), 12. doi:10.1186/s41199-018-0039-3

Peng et al 2017

Xiujuan Peng, Alex Nguyen, Debadyuti Ghosh (2017). "Quantification of M13 and T7 bacteriophages by TaqMan and SYBR green qPCR" Journal of Virological Methods Volume 252, February 2018, Pages 100-107

Pereira-Gómez et al. 2021

Pereira-Gómez, M., Á. Fajardo, N. Echeverría, F. López-Tort, P. Perbolianachis, A. Costáble, F. Aldunate, P. Moreno and G. Moratorio (2021). "Evaluation of SYBR Green real-time-PCR for detecting SARS-CoV-2 from clinical samples." J Virol Methods 289: 114035.

Pimolbutr et al. 2024

Pimolbutr, Kununya, Sopee Poomsawat, Nat Na-Ek, Saman Warnakulasuriya, and Waranun Buajeeb (2024). "Prevalence of human papillomavirus in oral cancer in Asia: A systematic review and meta-analysis." Oral Diseases. 2024 May 8. DOI: 10.1111/odi.14979. PMID: 38716741.

Ponchel et al. 2003

Ponchel, F., C. Toomes, K. Bransfield, F. T. Leong, S. H. Douglas, S. L. Field, S. M. Bell, V. Combaret, A. Puisieux, A. J. Mighell, P. A. Robinson, C. F. Inglehearn, J. D. Isaacs and A. F. Markham (2003). "Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions." BMC Biotechnol 3: 18.

Powell et al. 2006

Powell, N., K. Smith and A. Fiander (2006). "Recovery of human papillomavirus nucleic acids from liquid-based cytology media." J Virol Methods 137(1): 58-62.

Rainsbury et al. 2013

Rainsbury, J. W., Ahmed, W., Williams, H. K., Roberts, S., Paleri, V., & Mehanna, H. (2013). "Prognostic biomarkers of survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis." Head & Neck, 35(7), 1048-1055. doi: <https://doi.org/10.1002/hed.22950>

Reck et al. 2016

Reck, M., K. Hagiwara, B. Han, S. Tjulandin, C. Grohé, T. Yokoi, A. Morabito, S. Novello, E. Arriola, O. Molinier, R. McCormack, M. Ratcliffe and N. Normanno (2016). "ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with

Advanced NSCLC: The ASSESS Study." Journal of Thoracic Oncology 11(10): 1682-1689.

Reder, Taferner et al. 2020

Reder, H., Taferner, V. F., Wittekindt, C., Bräuninger, A., Speel, E.-J. M., Gattenlöhner, S., Wagner, S. (2020). "Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." The Journal of Molecular Diagnostics, 22(11), 1333-1343. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002

Rettig et al. 2022

Rettig, E. M., D. L. Faden, S. Sandhu, K. Wong, W. C. Faquin, C. Warinner, P. Stephens, S. Kumar, C. Kuperwasser, J. D. Richmon, R. Uppaluri, M. Varvares, R. Sethi, G. J. Hanna and H. Sroussi (2022). "Detection of circulating tumor human papillomavirus DNA before diagnosis of HPV-positive head and neck cancer." Int J Cancer 151(7): 1081-1085.

Sarkar et al. 2022

Shovon Lal Sarkar, A. S. M. Rubayet Ul Alam, Prosanto Kumar Das, Md. Hasan Ali Pramanik, Hassan M. Al-Emran, Iqbal Kabir Jahid & M. Anwar Hossain (2022). "Development and validation of cost-effective one-step multiplex RT-PCR assay for detecting the SARS-CoV-2 infection using SYBR Green melting curve analysis" Scientific Reports volume 12, Article number: 6501

Schalhorn 2019

Schalhorn, B. (2019). "Oropharynxkarzinom: p16 und HPV-DNA Biomarker für primäres Tumorrezidiv." Im Fokus Onkologie, 22(3), 58-58. doi:10.1007/s15015-019-0137-z

Scheurer et al. 2007

Scheurer, M. E., L. M. Dillon, Z. Chen, M. Follen and K. Adler-Storthz (2007). "Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens." Infect Agent Cancer 2: 8.

Schneeberger et al. 1995

Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., & Zeillinger, R. (1995). "Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain." Genome Research, 4(4), 234-238.

Schrader et al. 2012

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). "PCR inhibitors – occurrence, properties and removal." Journal of Applied Microbiology, 113(5), 1014–1026.

Schrank et al. 2021

Schrank, T. P., N. Lenze, L. P. Landess, A. Hoyle, J. Parker, A. Lal, S. Sheth, B. S. Chera, S. N. Patel and T. G. Hackman (2021). "Genomic heterogeneity and copy number variant burden are associated with poor recurrence-free survival and 11q loss in human papillomavirus-positive squamous cell carcinoma of the oropharynx." Cancer 127(15): 2788-2800.

Schwarzenbach et al. 2011

Schwarzenbach, H., D. S. B. Hoon and K. Pantel (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." Nature Reviews Cancer 11(6): 426-437.

Senba & Mori 2012

Senba, M., & Mori, N. (2012). "Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection." Oncol Rev, 6(2), e17. doi:10.4081/oncol.2012.e17

Shao et al. 2012

Shao, W., S. Khin and W. C. Kopp (2012). "Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis." Biopreserv Biobank 10(1): 4-11.

Shimura et al. 2017

Shimura, E., T. Hama, T. Suda, M. Ikegami, M. Urashima and H. Kojima (2017). "The Presence of HPV DNA in Neck Lymph Node Metastasis Correlates with Improved Overall Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer Undergoing Surgical Treatment." Oncology 92(2): 87-93.

Siegel 2020 et al. 2020

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). "Cancer statistics, 2020." CA: A Cancer Journal for Clinicians, 70(1), 7-30. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21590>

Sim et al. 2023

Sim, N. S., S. J. Shin, I. Park, S. O. Yoon, Y. W. Koh, S. H. Kim and Y. M. Park (2023). "Investigation of somatic mutation profiles and tumor evolution of primary oropharyngeal cancer and sequential lymph node metastases using multiregional whole-exome sequencing." Molecular Oncology 17(6): 981-992.

Siravegna et al. 2022

Siravegna, G., O'Boyle, C. J., Varmeh, S., Queenan, N., Michel, A., Stein, J., Faden, D. L. (2022). "Cell-Free HPV DNA Provides an Accurate and Rapid Diagnosis of HPV-Associated Head and Neck Cancer." Clin Cancer Res, 28(4), 719-727. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-21-3151

Stejskal et al. 2023

Pavel Stejskal, Hani Goodarzi, Josef Srovnal, Marián Hajdúch, Laura J. van 't Veer & Mark Jesus M. Magbanua (2023). "Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. " Molecular Cancer volume 22, Article number: 15

Sung et al. 2021

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." CA Cancer J Clin 71(3): 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660 PMID: 33538338

Syrjänen & Syrjänen 2019

Syrjänen, S., & Syrjänen, K. (2019). "HPV in Head and Neck Carcinomas: Different HPV Profiles in Oropharyngeal Carcinomas – Why?" Acta Cytologica, 63(2), 124-142. doi:10.1159/000495727

Szymonowicz & Chen 2020

Szymonowicz, K. A., & Chen, J. (2020). "Biological and clinical aspects of HPV-related cancers." Cancer Biol Med, 17(4), 864-878. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370

Tanaka et al. 2022

Tanaka, H., M. Suzuki, N. Takemoto, T. Fukusumi, H. Eguchi, E. Takai, H. Kanai, M. Tatsumi, M. Horie, Y. Takenaka, S. Yachida and H. Inohara (2022). "Performance of oral HPV DNA, oral HPV mRNA and circulating tumor HPV DNA in the detection of HPV-related oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary." International Journal of Cancer 150(1): 174-186.

Thomas et al. 1999

Thomas, M., Pim, D., & Banks, L. (1999). "The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV." Oncogene, 18(53), 7690-7700.

Tommasino et al. 1993

Tommasino, M., Adamczewski, J. P., Carlotti, F., Barth, C. F., Manetti, R., Contorni, M., Crawford, L. (1993). "HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A." Oncogene, 8(1), 195-202.

Trigg et al. 2018

Trigg, R. M., Martinson, L. J., Parpart-Li, S., & Shaw, J. A. (2018). "Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature." Heliyon, 4(7). doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00699

Valpione et al. 2018

Valpione S., G. Gremel , P Mundra , P Middlehurst , E Galvani , M R Girotti , R J Lee , G Garner , N Dhomen , P C Lorigan, R Marais (2018). „Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients.“ Eur J Cancer. 2018;88:1–9 doi: 10.1016/j.ejca.2017.10.029.

van Gysen et al. 2019

van Gysen, K., M. Stevens, L. Guo, D. Jayamanne, D. Veivers, A. Wignall, L. Pang, A. Guminski, A. Lee, G. Hruby, P. Macleod, A. Taylor and T. Eade (2019). "Validation of the 8(th) edition UICC/AJCC TNM staging system for HPV associated oropharyngeal cancer patients managed with contemporary chemo-radiotherapy." BMC Cancer 19(1): 674.

Veyer et al. 2020

David Veyer, Maxime Wack, Marion Mandavit, Sonia Garrigou, Stéphane Hans, Pierre Bonfils, Eric Tartour, Laurent Bélec, Shu-Fang Wang-Renault, Pierre Laurent-Puig, Haitham Mirghani, Bastien Rance, Valérie Taly, Cécile Badoual, Hélène Péré (2020). "HPV circulating tumoral DNA quantification by droplet-based digital PCR: A promising predictive and prognostic biomarker for HPV-associated oropharyngeal cancers" International Journal of Cancer Volume 147, Issue 4 p. 1222-1227

Wagner, Wuerdemann et al., 2020

Wagner S, Prigge E-S, Wuerdemann N, Reder H, Bushnak A, Sharma SJ, Obermueller T, von Knebel Doeberitz M, Dreyer T, Gattenlöhner S, Wolf G, Pons-Kühnemann J, Wittekindt C, Klusmann JP. (2020). „Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation.“ Br J Cancer. 2020 Jul 6;123(7):1114–1122. doi: 10.1038/s41416-020-0964-x.

Waldron et al. 2017

Waldron, L. K., & Demarest, K. T. (2017). „Comparison of SYBR Green and TaqMan qPCR assays for quantification of gene expression.“ Journal of Clinical Laboratory Analysis, 31(4), e22199. <https://doi.org/10.1002/jcla.22199>

Wang et al. 2019

Wang, H.-f., Wang, S.-s., Tang, Y.-J., Chen, Y., Zheng, M., Tang, Y.-l., & Liang, X.-h. (2019). “The Double-Edged Sword—How Human Papillomaviruses Interact With Immunity in Head and Neck Cancer.” Frontiers in Immunology, 10:653. doi: 10.3389/fimmu.2019.00653

Warlow et al. 2022

Warlow, S. J., Adamowicz, M., Thomson, J. P., Wescott, R. A., Robert, C., Carey, L. M., . . . Aitman, T. J. (2022). “Longitudinal measurement of HPV copy number in cell-free DNA is associated with patient outcomes in HPV-positive oropharyngeal cancer.” Eur J Surg Oncol, 48(6), 1224-1234. doi: 10.1016/j.ejso.2022.03.232

Wuerdemann et al. 2020

Wuerdemann, N., R. Jain, A. Adams, E.-J. M. Speel, S. Wagner, S. A. Joosse and J. P. Klussmann (2020) "Cell-Free HPV-DNA as a Biomarker for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma—A Step Towards Personalized Medicine?" Cancers 12 DOI: 10.3390/cancers12102997.

Yamashita et al. 2008

Yamashita, Keishi, Watanabe, Masahiko (2008). "Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer." Cancer Science, 100(2), 195–199. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01022.x.

Yingchi et al. 2017

Yingchi Yang, Jun Li, Lan Jin, Dong Wang, Jinghui Zhang, Jin Wang, Xiaomu Zhao, Guocong Wu, Hongwei Yao, Zhongtao Zhang (2017) „Independent Correlation Between Ki67 Index and Circulating Tumor Cells in the Diagnosis of Colorectal Cancer“ Anticancer Res. 2017 Aug;37(8):4693-4700. doi: 10.21873/anticancer.11874.

Zerfass-Thome et al. 1996

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., & Jansen-Dürr, P. (1996). “Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein.” Oncogene, 13(11), 2323-2330.

Zhang et al. 2022

Zhang, Q., F. Yang, J. Gao, W. Zhang and X. Xu (2022). "Development of multiplex TaqMan qPCR for simultaneous detection and differentiation of eight common swine viral and bacterial pathogens." Braz J Microbiol 53(1): 359-368.

Ziegler et al. 2002

Ziegler, A., Zangemeister-Wittke, U., & Stahel, R. A. (2002). “Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?” Cancer Treatment Reviews, 28(5), 255-271. doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00077-4)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomisches Schaubild des Oropharynx. User: Arcadian, via Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pharynx_diagram-fr.svg (dl. 30.07.2025), freie Nutzung und Anpassung unter Lizenz von Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, 3.0 Unported, 2.5 Generic, 2.0 Generic and 1.0 Generic license.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des HPV-Genoms. Adaptiert von Pal & Kundu, 2020; freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz.

Abbildung 3: Die Phasen des HPV-Reproduktionszyklus und maligne Transformation. Adaptiert von Ferreira et al., 2020; freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz.

Abbildung 4: Pathophysiologie von E6 und E7 in der Wirtszelle. Adaptiert von Pal & Kundu, 2020; freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Mechanismen des Fluoreszenzsignals für die Messung der Genexpression durch qPCR-Analyse mit TaqMan (A) und SYBR Green (B). Adaptiert von: Thermo Fisher Scientific (o. D.): TaqMan™ vs. SYBR™ chemistry in real-time PCR. URL: <https://www.thermofisher.com/ch/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>, (Zugriffsdatum: 23.07.2025)
Nutzungsfreigabe s. Kapitel: Einverständniserklärungen

Abbildung 6: Quantitative Echtzeit-PCR-Amplifikationskurve (A) der seriellen Verdünnung des Standards und entsprechende Best-Fit-Linie (B) mit Bestimmungsmaß.

Abbildung 7: Darstellung der ROC-Kurven-Analyse von HPV E6- und E7-cfDNA.

Abbildung 8: qPCR-Nachweis von HPV-cfDNA mittels SYBR Green-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte

Abbildung 9: qPCR-Nachweis von HPV-cfDNA mittels TaqMan-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte.

Abbildung 10: qPCR-Nachweis von cfHPV-DNA mittels SYBR Green- und TaqMan-Assay bei Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC und Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte.

Abbildung 11: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt durch TaqMan qPCR im prätherapeutischen Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem (n=30) und HPV-negativem (n=20) OPSCC. Daten auch in (Reder, Taferner et al. 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 12: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt durch TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Tumorgroße (T1-2 versus T3-4). Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 13: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach dem Lymphknotenstatus (N0-1 versus N $\geq$ 2). Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 14: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Fernmetastasen (M0 versus M1). Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt mittels TaqMan qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach UICC-Tumorstadien (I-II versus. III-IV). Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne klinisch nachweisbare residuale Tumorerkrankung. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung.

Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), die mittels SYBR Green qPCR-Assay in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC vor Therapiebeginn nachgewiesen wurden.

Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) bestimmt durch SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Tumorgröße (T1-2 versus T3-4).

Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Lymphknotenstatus (N0-1 versus $N \geq 2$).

Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach Fernmetastasen (M0 versus M1).

Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot), bestimmt mittels SYBR Green qPCR im Plasma von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC vor Therapiebeginn, stratifiziert nach UICC-Tumorstadien (I-II versus III-IV).

Abbildung 23: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung.

Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA E6 (blau) und E7 (rot) vor und nach der Therapie in den Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne residuale Tumorerkrankung.

Abbildung 25: Vergleich der Konzentration von cfHPV-DNA in denselben prätherapeutischen Plasmaproben von HPV-assoziierten OPSCC-Patienten, nachgewiesen durch SYBR Green qPCR und TaqMan qPCR.

Abbildung 26: Vergleich der Konzentration von cfDNA von Beta-Globulin in den Blutplasmaproben von OPSCC-Patienten vor der Therapie, bestimmt durch SYBR Green qPCR (links) und durch TaqMan qPCR (rechts).

Abbildung 27: Lineare Regressionsanalyse der prätherapeutischen Konzentrationen von cfHPV-DNA bei OPSCC-Patienten, gemessen mittels qPCR-Analyse unter Verwendung von SYBR Green gegenüber TaqMan.

Abbildung 28: Lineare Regressionsanalyse der prätherapeutischen Konzentrationen von Beta-Globulin bei OPSCC-Patienten, gemessen mittels qPCR-Analyse unter Verwendung von SYBR Green gegenüber TaqMan.

Abbildung 29: Detektion von E6 und E7 cfHPV-DNA mittels SYBR Green- und TaqMan qPCR bei Patient A mit Tumorprogress und Fernmetastasierung.

Abbildung 30: Detektion von E6 und E7 cfHPV-DNA mittels SYBR Green und TaqMan qPCR bei Patient A mit Darstellung Therapieverlauf. Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Abbildung 31: Detektion von E6 und E7 cfHPV-DNA mittels SYBR Green und TaqMan qPCR bei OPSCC-Patienten mit Tumorprogress/-rezidiv und Fernmetastasierung (A-D). Daten auch in (Reder, Taferner et al., 2020) präsentiert, Abbildung angepasst und neu erstellt.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. TNM (Tumor, Knoten, Metastasen) -Klassifikation des Oropharynxkarzinoms, pathologische Nodalstatus-Klassifikation. angepasst von TNM Classification of Malignant Tumors 2017, 8th Edition (International Cancer Control, UICC), (Brierley et al., 2017).

Tabelle 2. Das UICC-Stadiensystem für HPV-positiv (HPV-assoziierten) und HPV-negativ-OPSCC. T= Tumorgroße, N= Lymphknoten, M= Metastasen. angepasst von Classification of Malignant Tumours 2016, 8th Edition (International Cancer Control, UICC), (Brierley et al., 2017).

Tabelle 3. Liste der kommerziell erhältlichen Test-Kits

Tabelle 4. Liste der Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5. Liste der verwendeten Geräte

Tabelle 6. Liste der verwendeten Analysesoftware

Tabelle 7. Primer- und Sondensequenzen mit entsprechender Schmelztemperatur (°C) und Amplikonlänge des qPCR-Assays.

Tabelle 8. Reagenzien und Zyklusbedingungen pro Reaktion für TaqMan- und SYBR Green-basierte qPCR-Tests für die Detektion von HPV E6- und E7-cfDNA. qPCR, quantitative PCR in Echtzeit.

Tabelle 9. Patienten- und Tumormerkmale der in dieser Arbeit untersuchten HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC-Proben.

Tabelle 10. Koordinaten der ROC-Kurven (s. Abb. 1) von HPV E6- und E7-cfDNA (Kopien/ml) aus prätherapeutisch gewonnenen Plasmaproben von Patienten mit HPV-assoziiertem und HPV-negativem OPSCC, die mittels A) TaqMan und B) SYBR Green real-time-qPCR gemessen wurden.

Tabelle 11. Vergleich der Spezifität und Sensitivität der HPV-Assoziation bei prätherapeutischen OPSCC durch qPCR-basierten Nachweis von E6- und/oder E7-cfHPV-DNA mit TaqMan oder SYBR Green.

Abkürzungsverzeichnis

μM	micromolar
ml	Milliliter
nmol/l	nanomolar
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bzw	beziehungsweise
cf	zellfrei
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dsDNA	Doppelstrang-DNS
HPV	Humanes Papillomvirus
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
min	Minuten
Molar	Stoffmengenkonzentration
OPSCC	Oropharynxkarzinom
p	Statistische Signifikanz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative real-time PCR
sec	Sekunden
UICC	Union for International Cancer Control

Anhang

Vollständige ROC-Kurven Koordinaten-Tabelle von Tabelle 10, Abschnitt 3.2:

Koordinaten der ROC-Kurve, SYBR Green

Variable(n) für Testergebnis	Konzentration	Y-Achse	X-Achse	
		Sensitivität	1 - Spezifität	Youden-Index
E6 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,0000	1,000	1,000	,000
	3,2400	,941	,000	,941
	11,2450	,882	,000	,882
	17,0700	,824	,000	,824
	19,9600	,765	,000	,765
	22,0400	,706	,000	,706
	22,6150	,647	,000	,647
	28,8300	,588	,000	,588
	47,6900	,529	,000	,529
	76,7800	,471	,000	,471
	106,1750	,412	,000	,412
	129,8250	,353	,000	,353
	143,9131	,294	,000	,294
	165,0381	,235	,000	,235
	245,9500	,176	,000	,176
	1729,4500	,118	,000	,118
	4469,7350	,059	,000	,059
	5791,0200	,000	,000	,000
E7 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,0000	1,000	1,000	,000
	5,8150	,941	,000	,941
	17,2250	,882	,000	,882
	28,1650	,824	,000	,824
	36,1350	,765	,000	,765
	61,3100	,706	,000	,706
	87,2150	,647	,000	,647
	103,1200	,588	,000	,588
	207,2600	,529	,000	,529
	313,9050	,471	,000	,471
	342,2850	,412	,000	,412
	423,4650	,353	,000	,353
	586,5500	,294	,000	,294
	711,5652	,235	,000	,235
	920,5652	,176	,000	,176
	4571,5250	,118	,000	,118
	11050,3600	,059	,000	,059
	14058,4500	,000	,000	,000

Koordinaten der ROC-Kurve, TaqMan

Variable(n) für Testergebnis	Konzentration	Y-Achse	X-Achse	
		Sensitivität	1 - Spezifität	Youden-Index
E6 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,00	1,000	1,000	,000
	8,50	,867	,200	,667
	25,50	,867	,150	,717
	35,39	,867	,100	,767
	36,89	,833	,100	,733
	66,94	,833	,050	,783
	153,67	,800	,050	,750
	220,92	,767	,050	,717
	247,68	,733	,050	,683
	277,85	,700	,050	,650
	308,33	,700	,000	,700
	444,99	,667	,000	,667
	618,05	,633	,000	,633
	820,55	,600	,000	,600
	1239,50	,567	,000	,567
	1674,00	,533	,000	,533
	1867,50	,500	,000	,500
	1914,00	,467	,000	,467
	1938,29	,433	,000	,433
	2041,29	,400	,000	,400
	2226,46	,367	,000	,367
	3011,09	,333	,000	,333
	4539,63	,300	,000	,300
	5810,00	,267	,000	,267
	7373,50	,233	,000	,233
	9624,00	,200	,000	,200
	15974,49	,167	,000	,167
	24104,60	,133	,000	,133
	34028,32	,100	,000	,100
	48205,21	,067	,000	,067
	67606,50	,033	,000	,033
	79851,00	,000	,000	,000
E7 cfHPV-DNA, Kopien/ml Plasma	-1,00	1,000	1,000	,000
	45,53	,833	,150	,683
	103,03	,833	,100	,733
	129,00	,800	,100	,700
	169,00	,800	,050	,750
	272,31	,800	,000	,800
	365,04	,767	,000	,767
	390,19	,733	,000	,733
	443,96	,700	,000	,700
	548,10	,667	,000	,667
	720,10	,633	,000	,633
	989,50	,600	,000	,600
	1160,91	,567	,000	,567
	1561,41	,533	,000	,533
	1996,13	,500	,000	,500
	2137,63	,467	,000	,467
	2265,50	,433	,000	,433
	2323,50	,400	,000	,400
	2831,06	,367	,000	,367
	3649,79	,333	,000	,333
	4493,24	,300	,000	,300
	5773,50	,267	,000	,267
	7465,91	,233	,000	,233
	10800,72	,200	,000	,200
	16437,95	,167	,000	,167
	24874,81	,133	,000	,133
	35924,84	,100	,000	,100
	53422,18	,067	,000	,067
	107960,50	,033	,000	,033
	150839,00	,000	,000	,000

Einverständniserklärungen

Die Daten wurden teilweise veröffentlicht in:

*Reder, H., *Taferner, V. F., Wittekindt, C., Bräuninger, A., Speel, E. M., Gattenlöhner, S., Wolf, G., Klussmann, J. P., #Wuerdemann, N., & #Wagner, S. (2020). Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 22(11), 1333–1343. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002

* H.R. und V.F.T. haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

#N.W. und S.W. haben gleichermaßen als Senior-Autoren zu dieser Arbeit beigetragen.

Autor*innenbeiträge in der veröffentlichten Arbeit: S.W., N.W., J.P.K. und C.W. konzipierten die Forschung; S.W. und H.R. entwickelten die Methoden; V.F.T. führte die Validierung durch; V.F.T. und H.R. führten die formale Analyse durch; V.F.T. führte die Untersuchung durch; H.R., V.F.T., S.W., N.W. und C.W. stellten Ressourcen bereit; H.R. verfasste den ursprünglichen Entwurf; V.F.T., S.W., N.W., C.W., J.P.K., E.-J.M.S. und G.W. verfassten, überprüften und überarbeiteten den Entwurf; A.B. und S.G. verfassten, überprüften und überarbeiteten den Entwurf und stellten Ressourcen bereit; H.R., V.F.T. und S.W. erstellten die Visualisierungen; S.W., C.W. und J.P.K. beaufsichtigten die Forschung; S.W., C.W., N.W. und J.P.K. koordinierten das Projekt; J.P.K., C.W. und S.W. beschafften die Finanzierung.

Entsprechend der Nutzungslizenz und Autorenrechte des Verlegers Elsevier, unter welchen das Journal of Molecular Diagnostics verlegt wird, hat ein Autor das Recht die veröffentlichten Daten ohne schriftliche Erlaubnis des Verlags in einer Dissertation zu verwenden, solange diese einer nicht-kommerziellen Nutzung entspricht. Eine Veröffentlichung im Bereich der Universität (z.B. Universitätsbibliothek) ist erlaubt, solange ein DOI-Link inkludiert ist, welche auf die originale Publikation verweist.

Einverständniserklärung Nutzung Abbildungen außerhalb der o.g. Veröffentlichung und eigenständiger Erstellung:

Abbildung 1: freie Nutzung und Anpassung unter Lizenz von Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, 3.0 Unported, 2.5 Generic, 2.0 Generic and 1.0 Generic license.

Abbildung 2 bis 4: freie Nutzung und Anpassung unter CC-BY 4.0-Lizenz.

Abbildung 5: Adaptiert von: Thermo Fisher Scientific (o. D.): TaqMan™ vs. SYBR™ chemistry in real-time PCR. E-Mail-Kontakt (Thermofisher Vertreterin Frau Schirmacher): siehe folgenden Screenshot E-Mail-Verkehr

FW: Request for Permission to Use an Illustration in Medical Doctoral Thesis



Schirmacher, Verena

Details

04.12.2023 - 14:49

Vollansicht

Mehr

Feel free to use the image by indicating the 'normal' information like source etc.

Thanks and good luck with your thesis,

Verena Schirmacher

Sent 03-Dec-23 5:19 PM | Subject: Request for Permission to Use an Illustration in Medical Doctoral Thesis; From: Victor Taferner (taferner.mondsee@gmx.at); To: (orders.austria@lifetech.com); Cc: ()

Dear Sir/Madam,

I trust this email finds you well. My name is Victor Taferner, and I am a doctoral candidate at the Justus-Liebig-University Giessen in Germany. Currently, I am working on my medical doctoral thesis regarding cell-free DNA of HPV in patients with oropharyngeal carcinomas. Hereby i used two techniques: SYBR-Green-qPCR and Taqman-qPCR. For explaining how these methods work i would like to use an illustration.

Upon careful examination, I have identified a specific illustration I would like to use, located at [https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/images/ics-organized/applications/nucleic-acid-amplification/data-chart/560-wide.par.98012.image.560.505.1.gif_.gif]. Before proceeding to include this illustration in my thesis, I am writing to kindly request your permission. It is important to me to adhere to all copyright regulations and ensure that the use of the illustration aligns with your company's guidelines. The doctoral thesis is non-profit and will only be able to be seen in the library of my university.

If you agree to this usage, I would appreciate it if you could confirm this in writing. I am, of course, willing to provide any necessary details to ensure proper citation and referencing.

I appreciate your time and attention to this matter. If further information is required or if you have any questions, please feel free to contact me.

Thank you in advance for your consideration.

Yours faithfully,

Victor Taferner

Email: taferner.mondsee@gmx.at

Publikationsverzeichnis

Präsentation Kongress 18.-19.01.2019: International Meeting on Precision Oncology and Personalized Medicine for Head and Neck Cancer, DKFZ Heidelberg

Taferner et al.: “Monitoring of patients with HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) using cell-free HPV-DNA in liquid biopsies”

Poster 17.-18-01.2020: Meeting on Experimental and Translational Research in Head and Neck Cancer, Köln

Taferner et al.: “Monitoring of patients with human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma using cell-free DNA in liquid biopsies”

Paper 11/2020: H. Reder*, V.F. Taferner*, C. Wittekindt, A. Bräuninger, E-J. M. Speel, S. Gattenlöhner, G. Wolf, J.P. Klussmann, N. Wuerdemann#, S. Wagner#: „Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma”. The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 22, No. 11, November 2020, P1333-1343, DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002

* H.R. and V.F.T. contributed equally to this work.

N.W. and S.W. contributed equally to this manuscript as senior authors.

Ehrenwörtliche Erklärung

„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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.“

Ort/Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wittekindt, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die vielfältigen Einblicke in die akademische Welt während meines Medizinstudiums. Ich danke ihm insbesondere für seine Geduld und die Möglichkeit meine Promotion trotz des langwierigen Prozesses erfolgreich zu vollenden. Seine großzügige Unterstützung und hervorragende Expertise in dem Forschungsgebiet haben maßgeblich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Wagner, dem Laborleiter der HNO-Tumorforschung an der Justus-Liebig-Universität Gießen, meinen besonderen Dank aussprechen. Seine umfassende fachliche Hilfe, die zahlreichen konstruktiven Ratschläge sowie die wiederholten Korrekturen dieser Arbeit waren von unschätzbarem Wert und haben wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. biol. hom. Reder für ihre engagierte Anleitung und ihre unermüdliche Unterstützung im Rahmen der Laborarbeiten sowie bei der späteren Interpretation der gewonnenen Daten. Ohne ihren wertvollen Beitrag wären wesentliche Teile dieser Dissertation nicht in der vorliegenden Form entstanden und hätten nicht zur Veröffentlichung gelangen können.

Mein Dank gilt zudem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der HNO-Tumorforschung in Gießen für ihre tatkräftige Unterstützung und die stets angenehme Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit mit Geduld, Verständnis und beständigem Rückhalt begleitet haben.