

Expression der Carboanhydrase 9
bei HPV-assoziierten und HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx
im Hinblick auf eine Hypoxie-Signalwegs-Aktivierung

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

Vorgelegt von Bütow, Carolin Verena
aus Ulm
Gießen, 2020

Aus dem Zentrum für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde unter der Leitung von
Prof. Dr. med. Claus Wittekindt, des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. Schmitz

Tag der Disputation: 30.09.2020

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs	1
1.1.2 Anatomie und Gliederung des Pharynx	1
1.1.3 OPSCC Oropharyngeale Plattenepithelkarzinome	3
1.2 Humane Papillomaviren	7
1.2.1 HPV-Genom und seine Proteine	7
1.2.2 HPV-Infektion	8
1.2.3 Der Einfluss der HPV-Onkoproteine E6 und E7	9
1.2.4 HPV-induzierte Karzinogenese	9
1.3 Hypoxie und Regulation durch HIF-1	10
1.3.1 Zusammenhang von Hypoxie und HPV	11
1.3.2 Nekrose	12
1.3.3 Bestimmung der Tumorphypoxie	13
1.4 Carboanhydrasen	14
1.4.1 Carboanhydrase 9	14
1.4.2 Vorkommen und Funktion	15
1.4.3 Funktion in Tumoren	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Das Patientenkollektiv	17
2.2 Tumorproben und Tumorschnitte	18
2.3 Immunhistochemische Färbung von fixierten Gewebeschnitten	19
2.4 Lichtmikroskopische Auswertung der CA9-Färbung	20
2.5 Zelllinien und Western-Blot	21
2.6 Statistische Auswertung der Daten	21
2.7 Reagenzien und Geräte	22
3 Zielsetzung	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Auswahl des Kollektives und Ermittlung des HPV-Status	26
4.2 Univariate Analyse des Gesamtüberlebens nach klinisch-pathologischen Faktoren und Tumorcharakteristika	26
4.3 Immunhistochemische CA9-Färbung und deren Assoziation zu HPV	31
4.3.1 Analysen des HPV-Status im Bezug zur CA9-Färbeintensität	32
4.3.2 CA9-Score aus gefärbter Tumorfläche und Intensität	34

4.3.3 CA9-Positivität in Bezug zur Tumorgroße und dem HPV-Status.....	36
4.4 CA9-Färbemuster.....	36
4.5 Ergebnisse in Zusammenhang mit Nekrose.....	39
4.5.1 Nekrose, HPV-Status und CA9-gefärbte Tumorfläche.....	39
4.5.2 Vergleich von HPV-Status und Hypoxiemarkern.....	40
4.5.3 Überlebensanalyse in Bezug auf Nekrose.....	41
4.6 CA9-Proteinexpression in HPV-assoziierten und HPV-negativen HNSCC	
Zelllinien bei Normoxie und Hypoxie.....	42
4.6.1 CA9-Grundlevel der Zelllinien.....	42
4.6.2 Zeitliche Entwicklung der CA9-Proteinexpression bei Induktion des	
Hypoxie-Signalwegs (DFO Zeitreihe).....	43
4.6.3 CA9-Proteinexpression nach Behandlung mit DFO für 6 Stunden.....	44
5 Diskussion.....	46
5.1 Überlebensanalyse in Bezug auf den HPV-Status.....	46
5.2 Nekrose bei HPV-assoziierten OPSCC.....	47
5.3 Höheres Hypoxielevel bei HPV-positiven OPSCC.....	49
5.4 Validität der CA9 als endogener Hypoxiemarker.....	50
5.5 CA9, ein Metabolismus-assoziiierter Marker bei HPV-positiven Tumoren.....	51
5.6 Das CA9-Hypoxiemuster als negativer prognostischer Marker.....	53
5.7 Erhöhte CA9-Expression bei HPV-positiven Zelllinien.....	53
5.8 Alternative CA9-Expressionswege.....	54
6 Zusammenfassung.....	56
7 Abstract.....	57
8 Abkürzungsverzeichnis.....	58
9 Abbildungsverzeichnis.....	59
10 Tabellenverzeichnis.....	61
11 Literaturverzeichnis.....	62
12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	74
13 Danksagung.....	75

1. Einleitung

1.1 Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs

Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs („*head and neck cancer*“, *HNC*) sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die unterschiedliche histologische Merkmale aufweisen. Auf anatomischer und topographischer Ebene lässt sich diese Gruppe von Karzinomen sehr gut abgrenzen. Sie entstehen in der Mundhöhle, dem Pharynx und dem Larynx. Die meisten der Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs haben ihren Ursprung im Epithel der Schleimhaut. Diese werden den verhornenden und nicht verhornenden Plattenepithelkarzinomen („*squamous cell carcinoma*“, *SCC*) zugeordnet (Palka et al. 2008). Auf diesen Typ von Karzinomen soll in diesem Kapitel näher eingegangen werden.

Weltweit werden Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs („*head and neck squamous cell carcinoma*“, *HNSCC*) als 6. häufigste Tumordiagnose gestellt. Sie sind der 8. häufigste Grund für das Versterben an einem Karzinom (Wittekindt et al. 2012). Risikofaktoren für die Entwicklung eines HNSCC sind hauptsächlich Rauchen und der Konsum von Alkohol. Eine Assoziation mit Humanen Papillomaviren (HPV) wird mit unterschiedlichsten Prävalenzen beschrieben. In Deutschland wird die Prävalenz mit Werten zwischen 30 und 40% angegeben (Wittekindt et al. 2012; Klussmann et al. 2004; Klussmann, Mooren et al. 2009).

Je nach anatomischer Lage der Karzinome in der Kopf-Hals-Region ergeben sich verschiedene Ätiologien, individuelle Behandlungsarten und unterschiedliche Prognosen. Deshalb ist es sehr wichtig die Lage des Karzinoms richtig zuzuordnen. Nachfolgend eine Auflistung der anatomischen Bezirke der Kopf-Halstumoren, aus TNM-Klassifikation maligner Tumoren (Wittekind 2010).

- Lippe, Mundhöhle
- Pharynx: Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx
- Larynx: Supraglottis, Glottis, Subglottis
- Kieferhöhle
- Nasenhöhle, Siebbeinzellen
- Große Speicheldrüsen
- Schilddrüse

1.1.2 Anatomie und Gliederung des Pharynx

Die Mundhöhle (Cavitas oris) wird kranial durch harten und weichen Gaumen (Palatum durum et molle, kaudal durch den Mundboden (Diaphragma oris) mit Zunge (Lingua) und dorsal durch die Gaumenbögen (Arcus palatoglossus und palatopharyngeus) begrenzt.

1. Einleitung

Seitlich bildet die Backenschleimhaut (Planum baccale) die Begrenzung der Mundhöhle. Die Mundhöhle dient der Speiseaufnahme, Zerkleinerung und Andauung.

Der Rachen (Pharynx) lässt sich in drei Abschnitte einteilen. Er ist diffus mit lymphatischem Gewebe, dem MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*) ausgekleidet. MALT und angrenzende Tonsillen werden als Waldeyer-Rachenring bezeichnet. Der Nasopharynx (Pars nasalis pharyngis), als luftleitender Raum, wird durch folgende Strukturen begrenzt: Ventral die Choanen als Verbindung zur Nasenhöhle. Kranial das Rachendach (Fornix pharyngis) mit der Rachenmandel (Tonsilla pharyngealis). Lateral liegen die Eustachischen Röhren (Ostia pharyngea tubae auditivae). Der Oropharynx (Pars oralis pharyngis) dient sowohl als Luft- als auch als Speiseweg. Er wird kranial in der Ebene des Gaumensegels (Velum palatinum), kaudal durch den Kehldeckel (Epiglottis) und ventral von den Gaumenbögen begrenzt. Die anatomischen Bezirke und Unterbezirke des Oropharynx nach offizieller ICD-O (*International Classification of Diseases for Oncology*) Einteilung nach Wittekind 2010 sind:

- Vorderwand
 - Zungengrund
 - Vallecula
- Seitenwand
 - Tonsillen
 - Fossa tonsillaris und Gaumenbögen
 - Glossotonsillarfurche
- Hinterwand
- Obere Wand
 - Orale Oberfläche des weichen Gaumens
 - Uvula

Den Laryngopharynx (Pars laryngea pharyngis) begrenzt kranial die Epiglottis, ventral der Kehlkopfeingang (Auditus laryngis) und dorsal der Ösophagusmund.

Der Larynx (Kehlkopf) bildet den Übergang von Pharynx in die Luftröhre (Trachea). Er dient als Verschluss-System und ist für Phonation und Atmung verantwortlich (Aumüller 2010, S.827).

1.1.3 OPSCC Oropharyngeale Plattenepithelkarzinome

Plattenepithelkarzinome des Oropharynx stellen 90% der Karzinome im Kopf- Hals- Bereich dar. Mortalität und Morbidität haben sich in den letzten 30 Jahren kaum verbessert, obwohl seither verbesserte therapeutische Strategien und technische Möglichkeiten zur Verfügung stehen. Zusätzlich steigt die Inzidenz des OPSCC, vor allem bei jungen weißen Erwachsenen. Epidemiologisch sind Männer häufiger betroffen als Frauen (M:F 1,5:1). In den USA liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 62 Jahren, die Inzidenz des OPSCC wird vor allem bei jüngeren Menschen als steigend beschrieben (Feller und Lemmer 2012). Prädilektionsstellen für das OPSCC sind Gebiete mit dünnsschichtigem, unverhorntem Plattenepithel. Die Haupttumormanifestationen finden sich an den Lateral- und Ventralseiten der Zunge und am Mundboden im Übergang zum weichen Gaumen und den Tonsillen. An diesen beiden Lokalisationen finden sich 50% der OPSCC (Oliver et al. 1996-, Jovanovic et al. 1993).

OPSCC können aus prämaligen Läsionen wie Leukoplakien oder Erythroplakien hervorgehen, oder auf gesundem Epithel *de novo* entstehen (Markopoulos 2012). Die beiden ausschlaggebenden Faktoren zur Entwicklung eines oropharyngealen Karzinoms stellen neben einer HPV-Infektion, der Alkoholkonsum und der Nikotinabusus dar. Jedoch wurde sogar der verringerte Konsum von frischen Früchten und Gemüse mit der Entstehung eines oropharyngealen Karzinoms in Verbindung gebracht (Feller und Lemmer 2012). Neben den bereits genannten Risikofaktoren für Tumore im Kopf- Hals-Bereich werden als weitere Risikofaktoren für das OPSCC auch eine Co- Infektion mit dem Epstein Barr Virus (EBV) oder mit Hepatitis C Virus (HCV) beobachtet (Markopoulos 2012).

Generell lassen sich zwei Arten der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich unterscheiden. Zum einen wird das HPV-induzierte Karzinom beschrieben auf welches in einem anderen Kapitel genauer eingegangen wird. Zum anderen gibt es das Noxen- assoziierte Karzinom. Hierbei spielen vor allem der Alkohol- und Nikotinkonsum als Hauptrisikofaktoren der zellulären Entartung eine Rolle. Die Tumorentwicklung und Ausbreitung wird anhand des Konzepts der Feldkanzerisierung erklärt. Dieses beschreibt vor allem für Noxen-induzierte Karzinome die Entwicklung von prämaligen Veränderungen, die durch die Akkumulation von Mutationen entstehen. Diese wiederum entstehen durch die Schädigung der Schleimhaut durch hohem Alkohol- und/oder Nikotinkonsum. Es ist anzunehmen, dass diese prämaligen Veränderungen für die Ausbildung von Zweitkarzinomen verantwortlich sind (Wittekindt et al. 2011; Klusmann, Mooren et al. 2009).

Die 5-Jahres Überlebensrate von OPSCC liegt zwischen 40 und 50%. Das liegt daran, dass OPSCC sehr spät diagnostiziert werden und der Diagnosezeitpunkt ein wichtiger

1. Einleitung

prognostischer Faktor ist. Zudem verlaufen sie in den frühen Stadien schmerzlos und die Veränderungen in der Mundhöhle werden von Patienten oft ignoriert (Markopoulos 2012). Erst bei sekundärer Infektion der tumorösen Stellen können Schmerzen entstehen. Weiterhin kann der Tumor visuell auffällig werden, oder sich durch Schluck- oder Sprachstörungen äußern. Faktoren, die das Überleben beeinflussen sind die Größe und Tiefeninfiltration des Tumors, der betroffene anatomische Bezirk, das histo- pathologische *Grading* und das Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen. Ungefähr 2/3 der oralen Plattenepithelkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in die regionären zervikalen Lymphknoten metastasiert. In 20-40% der Fälle ist dies nur mikroskopisch sichtbar, was bei Diagnosestellung eines OPSCC auch eine Biopsie der regionären Lymphknoten zwingend nötig macht (Feller und Lemmer 2012). Hämatogen erfolgt eine Streuung vor allem in die Lunge.

Der primären Prävention, dem Vermeiden von Risikofaktoren und den entsprechenden Verhaltensweisen kommt eine große Bedeutung zu. Für die Behandlung von OPSCC hat sich die Kombination von Operation und Radio- Chemotherapie bewährt. Es stehen weitere Therapiemodalitäten wie die molekulare Therapie mit beispielsweise EGFR- Blockern zur Verfügung. Das letztendliche Behandlungskonzept ist abhängig von der Art des Karzinoms und der Verfassung und Konstitution des Patienten und sollte für jeden Patienten individuell festgelegt werden (Feller und Lemmer 2012).

Das *Staging* der OPSCC wird anhand des TNM-Systems durchgeführt. Das System beschreibt die Ausdehnung eines malignen Tumors. Die Abkürzung „TNM“ steht für: „T“ die Ausbreitung des Primärtumors, „N“ die Ausbreitung des Tumors in die regionären Lymphknoten und „M“ das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (Wittekind 2010). In Tabelle 1 ist die Aufteilung der TNM-Klassifikation veranschaulicht. Für diese Arbeit wurde anhand des TNM-Systems der 7. Version gearbeitet, 2017 wurde diese aktualisiert und als 8. Version herausgebracht. Wesentliche Änderung bei OPSCC betreffen Richtlinien zur p16-Färbung und die Einteilung nach dem T-Status. Laut der 8. Version wurde für OPSCC das Stadium T0 aufgelöst und mit dem sogenannten CUP (*cancer of unknown primary*) ersetzt. Außerdem entfällt bei den Tumoren der Größe T4 die Aufteilung in 4a und 4b (Würdemann et al. 2017).

Tabelle 1: 7.Version der TNM-Klassifikation für p16-positive Oropharynxkarzinome nach Wittekind (2010)

T	Definition – Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Proccessus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer*
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
*	Schleimhautausbreitung zur lateralen Oberfläche der Epiglottis von Primärtumoren der Zungenbasis und Vallecula gilt nicht als Invasion des Larynx
N	Definition - Lymphknotenmetastase
N1	Solitäre Metastase von maximal 3cm Ausdehnung
N2a	Solitäre Metastase größer als 3cm aber maximal 6cm Ausdehnung
N2b	Mehrere Metastasen der ipsilateralen Seite, keine größer als 6cm in der Ausdehnung
N2c	Bilaterale Metastasen, keine größer als 6cm
N3	Metastase(n) größer als 6cm
M	Definition - Fernmetastase
M1	Fernmetastase

Eine weitere Einteilung aller Tumore lässt sich mithilfe der UICC-Klassifikation machen. UICC (*Union internationale contre le cancer*) ist eine Organisation welche unter anderem zur Reduktion der globalen Krebsbelastung gegründet wurde. Die Einteilung nach UICC in vier Stadien erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. In dieser Arbeit wurde aufgrund des Diagnosezeitpunktes der verwendeten Tumorproben anhand der UICC 7. Version 2010 (Tabelle 2) gearbeitet. In Tabelle 3 sind zur Veranschaulichung die Änderungen der

8. Version der UICC-Stadien von 2017, bei p16-positiven Oropharynxkarzinomen aufgeführt.

Tabelle 2: UICC-Stadien der Oropharynxkarzinome 7. Auflage (2010)

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

Tabelle 3: UICC-Klassifikation der p16-positiven Oropharynxkarzinome, 8. Version (2017) nach www.uicc.org

Stadium	T	N	M
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T2, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
III	T1-T4	N3	M0
	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.2 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren sind doppelsträngige-DNA Viren, die verschiedene Krankheitsbilder verursachen können. Sie besitzen die Fähigkeit das Epithel zu infizieren und über einen langen Zeitraum in den Basalzellen des Epithels zu verweilen. Bei Infektion einer Zelle können Humane Papillomaviren benigne oder maligne Veränderungen hervorrufen. Derzeit sind ungefähr 120 verschiedene HPV-Typen bekannt. Diese werden nach ihrer Eigenschaft die Haut oder die Schleimhaut zu infizieren eingeteilt (Bodily und Laimins 2011). Die mukösen HPV-Typen lassen sich nach ihrem onkogenen Potential weiter in zwei Gruppen einteilen. Die sogenannten „*high risk*“ (HR) Typen mit hohem onkogenem Potential und die „*low risk*“ (LR) Typen die bei einer Infektion für harmlose Warzen und benigne Hyperplasien des Epithels verantwortlich sind. Die wichtigsten Vertreter der LR-Typen sind die HPV-Typen 6 und 11. Bei den HR-Typen sind die HPV-Typen 16 und 18 am bekanntesten und besten erforscht, des Weiteren zählen die HPV-Typen 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 zu den HR-Typen. Es gibt Studien und Diskussionen, die weitere Typen als hoch karzinogen einstufen. So zum Beispiel eine französische Studiengruppe, die auch für die Typen 59, 68, 73 und 82 eine Beteiligung an einer malignen Transformation vermuten (Muñoz Nubia et al. 2003).

Eine Infektion mit HR- oder LR-HPV ist für 99% der Zervixkarzinome und 90% der Condylomata acuminata verantwortlich. Das Zervixkarzinom ist das zweithäufigste Karzinom bei Frauen weltweit. Es wurde gezeigt, dass eine HPV-Infektion mit bestimmten Subtypen, der kausale Grund der Entwicklung dieses invasiven Zervixkarzinoms ist (Muñoz Nubia et al. 2003). Für 50% der Vulva-, Penis- und Analtumore als auch für 30% der Karzinome im Hals- und Rachenbereich sind HR- HPV- Typen ursächlich (Gross G et al. 2006).

1.2.1 HPV-Genom und seine Proteine

Das humane Papillomavirus ist ein unbehülltes DNA-Virus, mit einem Kapsid welches sich aus dem Hauptprotein L1 und dem Minorprotein L2 zusammensetzt. Das genaue Arrangement dieser beiden strukturellen Proteine, vor allem die Anzahl der L2 Moleküle in einem Kapsid, ist weiterhin Gegenstand der Forschung noch nicht gänzlich geklärt (Bywaters et al. 2017; Buck et al. 2008). Das doppelsträngige zirkuläre DNA-Genom umfasst ca. 8000 Basenpaare. Es lässt sich in drei Regionen einteilen: die nichtkodierende LCR (*Long control Region*), die die virale Replikation und Transkription kontrolliert. Die E-Region (*Early gene Region*), die für regulatorische Proteine codiert und die L-Region (*Late gene Region*), die für mindestens zwei strukturelle Proteine die genetische Basis darstellt (Graham 2010).

1.2.2 HPV-Infektion

Die Durchseuchung mit HPV ist hoch, die meisten Infektionen heilen folgenlos aus, da das körpereigene Immunsystem den Virus erkennt und aktiv bekämpft. Nur ein niedriger Prozentsatz infizierter Patienten entwickelt ein Karzinom (Iwasaki 2010).

Ein möglicher Weg einer Infektion mit einem HP-Virus, erfolgt über direkten Schleimhautkontakt. Somit ist einer der Hauptrisikofaktoren für eine genitale HPV- Infektion ungeschützter Geschlechtsverkehr mit hoher Promiskuität. Für das oropharyngeale HPV-assoziierte Karzinom spielen hier viele orogenitale Kontakte eine zusätzliche Rolle (Muñoz et al. 2006). Weitere Risikofaktoren für eine HPV-Infektion stellt neben einer hohen Anzahl an Sexualpartnern, auch das männliche Geschlecht, eine HIV-Infektion, ein jüngeres Alter und ein Nikotinabusus dar (Wittekindt et al. 2012).

Die HPV-Infektion erfolgt im Epithel der Haut oder Schleimhaut. Das HP-Virus infiziert undifferenzierte Basalzellen. Während des Differenzierungsprozesses des Epithels erfolgt die virale Replikation und somit die Persistenz der Infektion. Für eine Infektion im Genitalbereich wurde bewiesen, dass das Virus nur eine minimale Läsion der Integrität des Epithels benötigt, wie sie zum Beispiel bei Geschlechtsverkehr entsteht, um zur basalen Schicht vordringen zu können (Iwasaki 2010). Um zu replizieren, wird das HPV- Genom in die Basalzellen eingeschleust und im Nukleus der Wirtszelle vermehrt. Durch Mitosen der infizierten Basalzellen entstehen Tochterzellen, welche das replizierte Virusgenom enthalten. In dieser „Vermehrungsphase“ des HPV werden vor allem die E- Proteine exprimiert. Dies sind regulatorische Proteine, welche unter anderem für die Genom-Replikation und Transkription, den Zell-Zyklus und die Veränderung der infizierten Zelle verantwortlich sind.

In gesundem, nicht infizierten Epithel werden Zellen von der Basalschicht ausgehen, zur Differenzierung in die oberen Schichten geleitet. Der Zyklus endet mit dem Zelltod und schließlich der Abschilferung der Tochterzelle in der obersten Schicht, dem Stratum corneum des Epithels. Die mit HPV-infizierten Zellen besitzen dagegen die Fähigkeit, den Zelltod zu umgehen. Hauptverantwortlich hierfür sind die viralen Onkoproteine E6 und E7, sowie die Zell-Zyklus regulierenden Proteine p53 und Retinoblastom-Protein (pRb) (Graham 2010) (siehe nachfolgendes Kapitel).

Die Expression der späten Gene und die Zusammensetzung der Viren erfolgt ausschließlich in differenzierten Zellen der oberen Schichten. Die Kopien der Virus Genome werden durch die L- Proteine aufgenommen. Sie bilden das Kapsid und werden aufgrund ihrer stark immunogenen Wirkung erst in hochdifferenzierten Schichten des Epithels exprimiert. Somit schützt sich das Virus vor der Erkennung seines Wirtes. Die sich unkontrolliert teilenden Zellen zeigen sich schließlich als Tumore der Haut bzw. Schleimhaut (Graham 2010).

1.2.3 Der Einfluss der HPV-Onkoproteine E6 und E7

Die Onkoproteine E6 und E7 der HR-HPV-Typen sind für den Verlust der Zellzykluskontrolle der Wirtszellen und somit für die maligne Entartung verantwortlich. Sie greifen in die Reparaturmechanismen der gesunden Zelle ein. Sie sorgen für eine Grundlage für die Virus-Replikation. Das Tumorsuppressorprotein p53 und pRb sind das Ziel der viralen Onkoproteine E6 und E7. Beide Proteine sind wichtige Elemente der Zellzykluskontrolle der gesunden Zelle. Normalerweise wird p53 vermehrt exprimiert, wenn die Zelle einen DNA-Schaden aufweist. Somit wird der Zellzyklus arretiert und DNA-Mutationen werden repariert. Oder p53 leitet die Apoptose der mutierten Zelle ein. In HPV-infizierten Zellen sorgt E6 über den Ubiquitin-Proteasom-Regulationsweg für den Abbau von p53. Es kommt zu einem Mangel an p53 und folglich zum Verlust der Zellzykluskontrolle. Zudem kann E6 die zelluläre Telomerase aktivieren (Boyer et al. 1996). Diese verlängert die Lebensdauer der infizierten Zelle. Das Tumorsuppressorprotein pRb ist der zweite wesentliche Bestandteil der Zellzykluskontrolle. Auch dieses Protein wird in den HPV-infizierten Zellen abgebaut. Grund dafür ist das virale Onkoprotein E7 welches das pRb dem Ubiquitin- Proteasom- Regulationsweg zum Abbau zuführt (Boyer et al. 1996). Dies führt zur vermehrten Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Somit erhält die infizierte Zelle das Signal in die S-Phase des Zellzyklus fortzuschreiten und sich zu vermehren. Infolgedessen kommt es zu einer ungehemmten und unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen.

1.2.4 HPV-induzierte Karzinogenese

Für die HPV-induzierte Karzinogenese ist die anhaltende Expression der viralen Onkogene E6 und E7 verantwortlich. In den meisten Fällen bekämpft das körpereigene Immunsystem das Virus erfolgreich. Die HPV-Infektion kann latent im Körper verweilen und sich auch noch Jahre nach dem Erstkontakt mit dem HP-Virus als Malignom manifestieren. Während dieser latenten Infektion ist die HPV-DNA nachweisbar und verschiedene Signalwege sind aktiviert oder arretiert (Klussmann, Mooren et al. 2009). In frühen dysplastischen Stadien der HPV-Infektion wird das Genom epigenetisch repliziert. Für HR-HPV wurde gezeigt, dass die Integration der Virus-DNA in die Wirtszelle entscheidend für die Entwicklung einer Neoplasie zu einem invasiven Karzinom ist (Wentzensen et al. 2004). Jedoch zeigten Olthof et al., dass für die Entwicklung eines soliden Karzinoms die kontinuierliche Expression der onkogenen Genabschriften beiträgt, unabhängig von deren Menge oder ob sie im Nukleus oder episomal repliziert werden. In Bezug auf die zuvor beschriebene Feldkanzerisierung

wurden für HPV-induzierte OPSCC die typischen prämaligen Veränderungen der Mukosa noch nicht nachgewiesen (Wittekindt et al. 2011).

1.3 Hypoxie und Regulation durch HIF-1

Hypoxie bezeichnet eine Verringerung des Sauerstoffgehalts in einem Gewebe. Vor allem bei der Entwicklung von Karzinomen spielt die Sauerstoffarmut eine große Rolle. Solide Tumore weisen aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität und mit zunehmender Größe durch eine Diskrepanz an Sauerstoffbedarf und Sauerstoffverfügbarkeit meist hypoxische Areale auf. Je hypoxischer ein Tumor, desto schlechter ist die Prognose und das *Overall Survival* des Patienten (Bacon und Harris 2004). Die Wahrscheinlichkeit Metastasen zu bilden, steigt deutlich. Außerdem sind hypoxische Tumore eher Chemo- und Strahlentherapie resistent (Airley 2001). Durch Hypoxie im Tumorgewebe wird dieses angeregt, neue Blutgefäße zu bilden (Angiogenese). Dies sichert die bessere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff (Bardos und Ashcroft 2005).

Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) stellt den wichtigsten und weitaus bekanntesten Transkriptionsfaktor für die Regulation der Zellantwort auf eine hypoxische Umgebung dar. Es reguliert die Transkription vieler Gene, sogenannte Zielgene (Airley 2001), die unter anderem für den Sauerstoff Transport, die Glukose Aufnahme, die Glykolyse, die Apoptose, die Metastasierung und die Angiogenese verantwortlich sind. Das HIF-1 Protein setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, HIF-1 α und HIF-1 β , wobei die HIF-1 α Komponente durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff reguliert wird (Nakamura et al. 2009).

Unter Normoxie wird HIF-1 α herunterreguliert bzw. abgebaut. Sauerstoff-empfindliche Prolyl-hydroxylation-domain Proteine die auch als HIF-Prolyl Hydroxylasen bezeichnet werden, initiieren die Hydroxylierung an spezifischen Prolinresten von HIF. Das wiederum schafft eine Bindungsstelle für das von Hippel-Lindau Protein, welches Teil des E3-Ubiquitin-Ligasen-Komplexes ist. Das von-Hippel-Lindau Protein erkennt hydroxyliertes HIF-1 α und führt es dem Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg zu. Folglich wird HIF-1 α in der Anwesenheit von Sauerstoff im Proteasom degradiert (Fong und Takeda 2008).

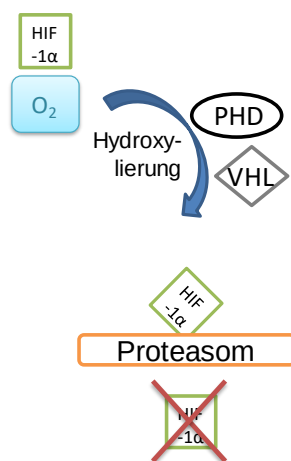
Da die Aktivität der Prolyl-Hydroxylasen von Sauerstoff abhängig ist, wird bei Sauerstoffmangel HIF-1 α durch die ausbleibende Hydroxylierung stabilisiert und akkumuliert in der Zelle. HIF-1 α dimerisiert im Nukleus mit seiner Untereinheit HIF-1 β . Dies führt zur Genmodifikation mit der konsekutiven Expression und Translation der HIF- Zielgene. Dieser Prozess ist essentiell für die zelluläre Adaptation an Hypoxie (Bardos und Ashcroft 2005).

1.3.1 Zusammenhang von Hypoxie und HPV

In Untersuchungen zur Rolle von HPV in hypoxischen Tumoren und der Interaktion von HPV zu HIF-1 α konnte gezeigt werden, dass HPV-assoziierte Tumore eine eigene Untergruppe von Tumoren bilden (Nakamura et al. 2009). Sie weisen gegenüber HPV- negativen Tumoren unterschiedliche molekulare, klinische und pathologische Merkmale auf (Hanns et al. 2015). Für HPV-assoziierte Tumore des Oropharynx konnte eine frühere Metastasierung beobachtet werden. Zudem haben Patienten mit HPV- positiven Kopf und Halstumoren bei weiter fortgeschrittener Erkrankung oft eine bessere Prognose (Wagner et al. 2012). Einer der Gründe hierfür könnte die höhere Sensitivität von HPV-positiven Tumoren auf ionisierende Strahlung sein (Ziemann et al. 2015).

Für HPV-positive Zelllinien konnte die Aktivierung des HIF-Signalweges und deutlich erhöhte HIF-1 α Werte im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien gezeigt werden (Knuth et al. 2017). Die Akkumulation von HIF-1 α lässt sich auf die viralen Onkoproteine E6 und E7 zurückführen. Sie sind nicht nur in der Lage in die Zell-Zyklus-Kontrolle einzugreifen, sie sind ebenso befähigt HIF-1 α zu stabilisieren (Tang et al. 2007). Dementsprechend wird bei einem HPV-assoziierten Tumor, trotz der Anwesenheit von Sauerstoff, die HIF- Kaskade (*hypoxic response*) aktiviert. HIF-1 α dimerisiert mit HIF-1 β und die molekulare Transkription der HIF-Zielgene wird induziert (Abbildung 1).

Normoxie: Modifizierung von HIF-1 α durch Prolyl-Hydroxylasen $\rightarrow$ Abbau von HIF-1 α über von-Hippel-Lindau Protein im Proteasom



Hypoxie: Ausbleibende Hydroxylierung von HIF-1 α führt zu dessen Stabilisation und Transkription

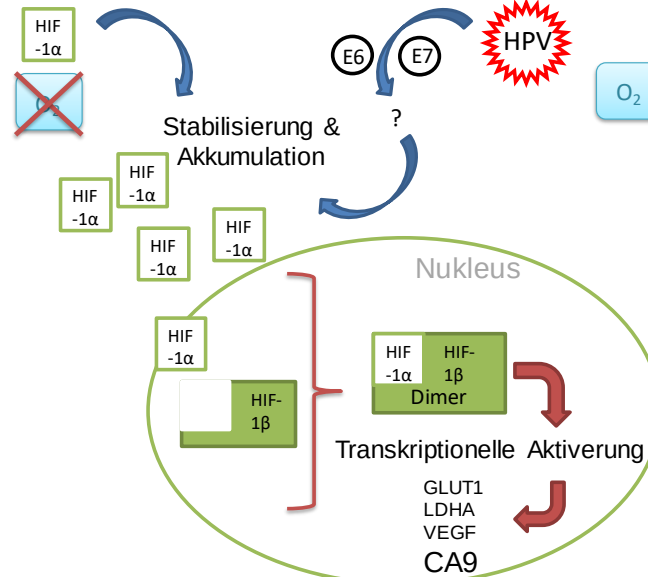


Abbildung 1: HIF-1 α Signalweg bei Normoxie und Hypoxie und unter dem Einfluss von HPV.

Durch die Aktivierung der HIF-Kaskade trotz der Anwesenheit von Sauerstoff und der nachfolgenden Transkription der Zielgene verfügt der Tumor über viele Baustoffe, die zur optimierten und schnellen Tumorpherifation führen (Pérez-Sayáns et al. 2011). Im Zusammenhang mit HPV konnte bereits die vermehrte Produktion des Signalmoleküls für Angiogenese, VEGF nachgewiesen werden (Chen et al. 2007). In diesem Sinne wurde ebenso eine erhöhte Gefäßdichte in präkanzerösen, HPV- assoziierten Läsionen der Zervix und in HPV-assoziierten Zervixkarzinomen beschrieben und die verhältnismäßig frühe Bildung von angiogenetischen Proteinen beobachtet (Smith Mc- Cune et al. 1994).

1.3.2 Nekrose

Nekrose bezeichnet den pathologischen Untergang von einzelnen Zellen oder Zellverbänden in Folge einer Zellschädigung. Diese kann durch unterschiedlichste Einflüsse wie mechanische Schädigung, Schädigung durch Krankheitserreger oder auch Sauerstoffmangel ausgelöst werden. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt der Zelluntergang durch die Störung des Ablaufs von biochemischen Reaktionen. Es kommt zu zytotoxischen Prozessen, in der Folge bildet sich eine Nekrose (Beasley et al. 2001). Dieser Vorgang wird in Abbildung 2 veranschaulicht.

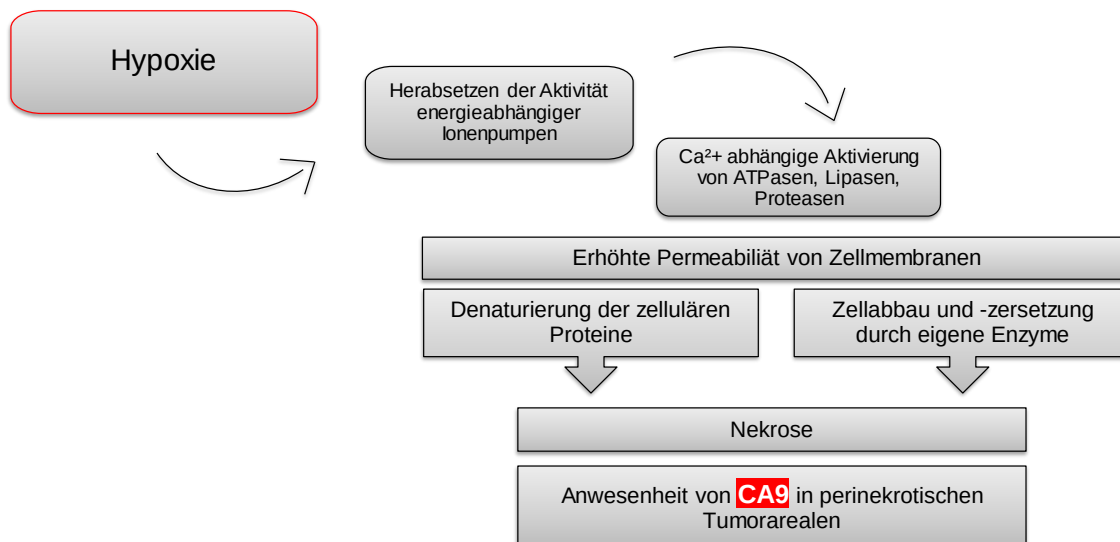


Abbildung 2: Zusammenhang von Hypoxie und der Ausbildung von Nekrosen und der CA9-Expression. (Mit freundlichem Dank an Univ.- Prof. Dr. K. W. Schmid, Universitätsklinikum Essen, modifiziert nach Beasley et al. 2001)

1.3.3 Bestimmung der Tumorphypoxie

Hypoxie stellt ein Kennzeichen von malignen soliden Tumoren dar. Der Oxygenierungsstatus eines Tumors stellt einen prognostischen Faktor dar (Nordsmark et al. 2000). Eine valide Methode für die Bestimmung des Oxidationsstatus eines Tumors ist die Methode nach Eppendorf. Mittels polarographischen Nadelelektroden, welche direkt in den Tumor eingebracht werden wird der Sauerstoffgehalt gemessen. Sie stellt einen invasiven Eingriff dar (Airley 2001). Sie ist zudem nur an Tumoren durchführbar, welche für die Mikroelektroden zur Messung des Sauerstoffgehaltes zugänglich sind. Eine weitere Methode der Bestimmung des Sauerstoffgehalts eines Tumors stellen 2- Nitroimidazol-Derivate als exogene Hypoxiemarker dar. Hierbei handelt es sich um natürliche Antibiotika, welche sich in hypoxischen Arealen des Tumors anreichern. Sie müssen dem Körper von außen zugeführt werden und können somit einen Einfluss auf das Körpergleichgewicht haben.

Hypoxie kann an archiviertem, in Paraffin gebettetem Tumormaterial mittels der Bestimmung der endogenen Hypoxiemarker nachgewiesen werden. Diese stellen körpereigene Proteine dar, welche in Zusammenhang zu einer Tumorphypoxie nachweisbar sind. Hypoxie-spezifische Proteine werden im Rahmen der Anpassung der Zelle an Sauerstoffmangel exprimiert (Mayer et al 2006). Indem man diese Proteine über Detektionsmethoden, wie zum Beispiel der Immunhistochemie identifiziert, lassen sich Zellen, die einer hypoxischen Situation ausgesetzt sind, visualisieren und erkennen. Zu diesen, vom eigenen Organismus produzierten Proteinen, gehört neben dem VEGF, die Laktatdehydrogenase, der Glucosetransporter-1 (GLUT-1), das HIF-1 α Protein sowie die Carboanhydrase 9 (CA9). Im Folgenden soll auf CA9 als endogenen Hypoxiemarker näher eingegangen werden.

1.4 Carboanhydrasen

Carboanhydrasen sind eine große Gruppe von Enzymen, die eine umkehrbare Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid katalysieren. Sie haben ein Zinkion in ihrem aktiven Zentrum, weshalb man sie zu den Metalloproteasen zählt. Carboanhydrasen lassen sich in der Systematik der Lebewesen in allen Reichen widerfinden. Generell werden sie in fünf verschiedene Gen-Familien eingeteilt (α - ϵ), wobei die α -Carboanhydrasen überwiegend in Wirbeltieren (als einzige CA-Klasse in Säugetieren) gefunden wurden (Pastorekova et al. 2004). Derzeit sind 15 Isoformen der α -Carboanhydrasen bekannt. Diese werden nach ihrer Lokalisation eingeteilt:

- zytosolisch
- mitochondriell
- sezerniert
- membran-assoziiert

Carboanhydrasen sind an multiplen biologischen Vorgängen beteiligt. Hierzu gehören die pH-Regulation, die Tumorentstehung und die Atmung. Zudem haben sie die Funktion Körperflüssigkeiten wie den Speichel, den Liquor oder das Kammerwasser zu produzieren. Des Weiteren sind sie an der Knochenresorption und der Homöostase beteiligt.

1.4.1 Carboanhydrase 9

Die Carboanhydrase 9 wurde als neuntes Mitglied der Familie der Carboanhydrasen auf der Oberfläche von Zervixkarzinom Zellen entdeckt. Es ist ein transmembranöses Protein, das aus 459 Aminosäuren aufgebaut ist. Dieses Protein weist einen Bereich (CA-Domäne) auf, der in seiner Aminosäuren-Sequenz typisch ist für die Familie der Carboanhydrasen. Das CA9 Gen befindet sich auf Chromosom 9p 12-13 und kodiert für ein 49,7 kDa schweres Protein. Der Aufbau der CA9 setzt sich wie in Tabelle 4 gezeigt zusammen (Opavsky et al. 1996).

Tabelle 4: Aufbau der CA9

	Aminosäuren	
N-terminales Signal Peptid	1 - 37	
Extrazelluläre Region	38 - 414	<u>2 Domänen</u> Katalytische CA Domäne Proteoglykan like Domäne
Transmembranöse Region	415 - 434	
Intrazellulärer C-Terminus	435 - 459	

Die enzymatische Reaktion spielt sich im Extrazellulärraum ab. Die Proteoglykan like Domäne ist in der Familie der Carboanhydrasen einzigartig bei der CA9 zu finden.

1.4.2 Vorkommen und Funktion

Aufgabe der CA9 ist die Regulation des Säure-Basen-Haushalts. Die CA9 wird hauptsächlich in Tumorgewebe exprimiert, sie wird als tumorspezifische CA beschrieben (Pérez-Sayáns et al. 2011). Der intrazelluläre Teil der CA9 bestimmt die katalytische Aktivität des Enzyms. Je niedriger der pH-Wert in der Zelle ist, desto mehr wird das Enzym CA9 aktiviert. Verglichen mit den anderen Carboanhydrasen hat die CA9 zusammen mit der CA2 das höchste kinetische Potential und arbeitet bei einem pH- Optimum von pH 6,49 (Benej et al. 2014). Als aktives Enzym ist CA9 in membranständiger Form zu finden. Zudem lässt es sich zytoplasmatisch nachweisen, allerdings ist die Metalloprotease dort als nicht funktionell beschrieben.

CA9 katalysiert die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Bikarbonat und Protonen im Rahmen der pH-Regulation bzw. des Säure-Basen-Haushaltes (Abbildung 3). Hierbei sorgt das Enzym für eine intrazelluläre Neutralisation. Parallel wird durch Ausschleusung des Endproduktes CO₂, der extrazelluläre Raum kontinuierlich saurer. Durch die Beteiligung von CA9 wird die Hydratisierung von CO₂ erheblich beschleunigt. Die Endprodukte HCO₃⁻ und H⁺ werden dann mit Hilfe von Na⁺/HCO₃⁻ Co-Transportern, Na⁺ abhängigen Cl⁻/HCO₃⁻ Austauschern oder Anion-Austauscher wieder in die Zelle hinein transportiert (Benej et al. 2014).

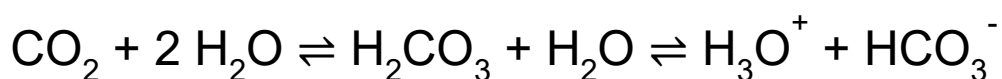


Abbildung 3: Reversible durch CA9 katalysierte Reaktion.

Die CA9-Expression erfolgt unter hypoxischen Bedingungen. Hierbei spielt HIF-1α eine bedeutende Rolle. CA9 ist weitgehend das häufigste Protein, welches durch Hypoxie exprimiert wird (Pérez-Sayáns et al. 2013). Wie bereits beschrieben entsteht infolge einer Sauerstoffarmut Nekrose. Somit kann die CA9 auch in perinekotischen Arealen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2, Kapitel 1.3.2). Das Enzym sorgt durch die Regulation des pH-Wertes und folglich der Adaptation an die toxische saure Bedingung für das Weiterleben und die Weiterentwicklung der Zellen.

1.4.3 Funktion in Tumoren

Durch schnelles und unkontrolliertes Wachstum müssen sich Tumore an ihre Umwelt anpassen. Durch die massive Zunahme an Gewebe entsteht Sauerstoffmangel, vor allem in den Regionen, die am weitesten von Blutkapillaren entfernt sind. Tumorzellen sind in der Lage ihren Metabolismus in Richtung anaerobe Glykolyse zu verschieben, um somit die Energieversorgung der stets wachsenden Zellmasse sicher zu stellen. Dass Tumorzellen dies trotz der Anwesenheit von Sauerstoff tun wurde erstmals im Jahre 1924 von Otto Heinrich Warburg beschrieben. Durch diese hohe Rate an Glykolyse fällt als Endprodukt auch viel Laktat an. Dieses ist verantwortlich für die Übersäuerung der Zellen. Zur Adaptation der Tumorzellen an diese toxische Umgebung sorgt die CA9 in malignen Zellen für einen konstanten intrazellulären pH- Wert und stellt das Tumorwachstum sicher.

Der Prozess der Metastasierung ist durch verschiedene Schritte gezeichnet. Das Auflösen der Zell-Zell-Kontakte, der Abbau der extrazellulären Matrix, die Invasion und Migration, die Lockerung der Zell Tumorzellen und schließlich das Wiederauwachsen in einem entfernten Gewebe, sowie die weitere Proliferation. Die Invasion wird durch die *epithelial mesenchymal transition* (EMT) ermöglicht. EMT bedeutet, dass Epithelzellen ihre Zellkontakte und Polarität verlieren und als Zellen mit mesenchymalem Charakter agieren können. CA9 nimmt am Prozess der Metastasierung aktiv teil. Es wurde gezeigt, dass die CA9 die Fähigkeit besitzt E-Cadherin vermittelte Zellkontakte von Epithelzellen zu destabilisieren. Das fördert signifikant die Migration der Tumorzellen und somit deren Potential der EMT (Benej et al. 2014). Die Metastasierungskaskade wird durch ein azidotisches Milieu begünstigt. Durch die Aktivität der CA9 wird das metastatische Potential der Tumorzellen durch den reduzierten extrazellulären pH-Wert erhöht. Außerdem sorgt das azidotische Milieu für eine Schwächung der physiologischen Immunzellen, die für die Tumor-Antigen-Erkennung verantwortlich sind. Durch schlechtere Erkennung des Immunsystems schafft sich der Tumor so einen weiteren Überlebensvorteil. Diese, durch CA9 vermittelten Eigenschaften machen Tumorzellen aggressiv und invasiv.

2. Material und Methoden

2.1 Das Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Fälle von OPSCC der HNO-Klinik des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen untersucht. Es wurden Tumorproben von 74 Patienten bearbeitet, analysiert und ausgewertet. Der Untersuchungszeitraum wurde hierbei vom 01.01.2000 – 31.12.2016 gewählt. Aus dem Untersuchungszeitraum wurden alle Patienten mit der Erstdiagnose „Oropharynxkarzinom“ mit relevanten Informationen wie klinisch und pathologische Patientenmerkmale sowie die Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholkonsum in eine Datenbank aufgenommen. Bedingung zur Aufnahme in die Datenbank stellte eine sanierende Operation oder eine Operation zur Probengewinnung des Tumors dar. Limitationen zur Aufnahme in die Datenbank ergaben sich durch fehlende Gewebeproben. Durch den immunhistochemischen Nachweis von p16 und die HPV-DNA-PCR wurde der HPV-Status der Gewebeproben bestimmt.

Das in dieser Studie verwendete Kollektiv (n=74) stellt sich aus einer spezifischen Auswahl von Patienten mit OPSCC Tumorproben zusammen. Das Kriterium zur Auswahl in das Kollektiv stellte die Tumorgroße, der HPV-Status und eine Lymphknotenmetastasierung dar. Da große Tumoren (T4) in ihrem Zentrum eine Sauerstoffmangelversorgung aufweisen, gelingt hier der immunhistochemische Nachweis von CA9 unabhängig des HPV-Status. Aus diesem Grund wurden in dieses Kollektiv nur Tumorgroßen von T1 bis einschließlich T3 inkludiert. Nachfolgend wurden passend zu diesen selektierten Patienten, weitere Patienten mittels *matched pairs* Analyse zugeordnet. Die Auswahl wurde hier anhand des HPV-Status, einer Lymphknotenmetastasierung, dem Alter (< oder > 56 Jahre bei Diagnose) und dem Geschlecht getroffen. Somit konnten 74 Patienten in das Kollektiv eingeschlossen werden. Die Einteilung der Fälle erfolgte in vier Gruppen (Abbildung 4). Die kleinste Gruppe stellt dabei HPV+/N0 mit n=9 Patienten dar.

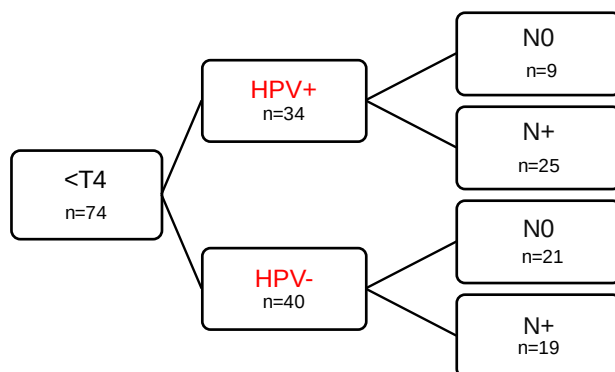


Abbildung 4: Aufteilung des Patientenkollektives.

2. Material und Methoden

Das Kollektiv (n=74) enthält zu 54% Tumore mit negativem HPV-Status und zu 46% Tumore mit positivem HPV-Status. Der Großteil der Patienten im Kollektiv ist über 60 Jahre (64%). Das Tumorstadium T1&2 fand sich bei 73% der Gewebeproben. Der nachfolgenden Tabelle 5 lassen sich die klinischen und pathologischen Patientenmerkmale sowie die Risikofaktoren entnehmen.

Tabelle 5: Klinische und pathologische Patientenmerkmale sowie Risikofaktoren anhand des HPV-Status

		Gesamtkollektiv		HPV-negativ		HPV-positiv		p-Werte
		n=74	%	n=40	%	n=34	%	
HPV	DNA-/p16-	40	54,1	-	-	-	-	
	DNA+/p16+	34	45,9	-	-	-	-	
Alter	unter 60	26	35,1	15	37,5	11	32,4	0,644
	über 60	48	64,9	25	62,5	23	67,6	
Geschlecht	w	21	28,4	8	20	13	38,2	0,083
	m	53	71,6	32	80	21	61,8	
UICC	I-II	21	28,4	14	35	7	20,6	0,171
	III	53	71,6	26	65	27	79,4	
ECOG	gesund	61	82,4	34	85	27	79,4	0,529
	krank	13	17,6	6	15	7	20,6	
Differenzierung	schlecht	48	64,9	23	57,5	25	73,5	0,15
	gut	36	48,6	17	42,5	9	26,5	
T	T1-2	54	73	29	72,5	25	73,5	0,921
	T3	20	27	11	27,5	9	26,5	
N	N0	44	59,5	19	47,5	25	73,5	0,023
	N+	30	40,5	21	52,5	9	26,5	
M	M0	2	2,7	1	2,5	1	2,9	0,907
	M+	72	97,3	39	97,5	33	97,1	
Rezidiv lokal	nein	69	93,2	37	92,5	32	94,1	0,782
	ja	5	6,8	3	7,5	2	5,9	
Nikotin	≤10PY <16 J.	18	24,3	5	12,5	13	38,2	0,001
	>10 PY <16 J.	42	56,8	31	77,5	11	32,4	
Alkohol	≤2 SG/d	37	50	10	25	27	79,4	0
	>2 SG/d	28	37,8	25	62,5	3	8,8	
CA9	<7,25%	37	50	23	57,5	14	41,2	0,162
	>7,25%	37	50	17	42,5	20	58,8	
Nekrose	nein	35	47,3	23	57,5	12	35,3	0,057
	ja	39	52,7	17	42,5	22	64,7	

p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test); **fett gedrucktes:** signifikantes Ergebnis; PY: pack years; SG/d: Standardglas pro Tag

2.2 Tumorproben und Tumorschnitte

Die Tumorproben stammen von HNO-Operationen der Patienten im Universitätsklinikum Gießen. Hierbei wurden Gewebeproben verwendet, welche nach Abschluss der regulären pathologischen Untersuchungen archiviert wurden. Die Proben wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin gebettet konserviert (FFPE). Der Verwendung dieser Proben für wissenschaftliche Zwecke wurde von der Ethikkommission am 14.07.2011 und 15.12.2011 - Aktenzeichen 151/11 und 296/11 - zugestimmt. Die Selektion der Tumorprobe erfolgte anhand der Berichte der histologischen Untersuchung durch die Abteilung der Pathologie des UKGMs, sowie anhand der mikroskopischen Untersuchung der durch die Pathologie angefertigten

HE- Schnitten der jeweiligen Probe. Diese HE-Schnitte wurden mikroskopisch auf das Vorhandensein von Tumorgewebe untersucht. Es wurde diejenige Probe ausgewählt, welche den größtmöglichen Anteil des Primärtumors aufwies. Trotzdem wurde darauf geachtet, dass auch etwas Normalgewebe auf einem Paraffin-Block vorhanden war, um später eine Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe zu gewährleisten. Von den ausgewählten Tumorproben-Blöcken wurden mit einem Mikrotom 2,5µm dicke Schnitte angefertigt. Hierfür wurden die Blöcke vor dem Schneideprozess gekühlt. Zur Entfaltung wurden die Schnitte direkt nach dem Schneideprozess in ein 37°C warmes Wasserbad gelegt und anschließend auf einen Objektträger gezogen. Im Wärmeschrank wurden die Schnitte bei 37°C getrocknet.

2.3 Immunhistochemische Färbung von fixierten Gewebeschnitten

Die Immunhistochemie beruht auf dem Nachweis spezifischer Zell- oder Gewebestrukturen durch eine enzymatische Reaktion nach einer Antigen- Antikörperreaktion. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE- Gewebeschnitten wurden die Objektträger jeweils eingestellt in:

- Xylol 2x10 Minuten
- 100%Ethanol 2x5 Minuten
- 96% Ethanol 2x5 Minuten
- 70% Ethanol 5 Minuten.

Die Demaskierung der Antigenbindungsstellen erfolgte durch Erhitzung auf 100°C für 45 Minuten in Target Retrieval Solution (TRS), pH 6. Abkühlung für 30 Minuten auf Raumtemperatur. Waschung in 1:1 TRS:TBST für 5 Minuten. Waschung in VE-H₂O 3x2 Minuten. Auftragen einer hydrophoben Barriere. Inkubation in 3% H₂O₂ für 20 Minuten. Erneute Waschung: VE-H₂O 2x2 Minuten, TBST-Puffer 5 Minuten. Blockierung des endogenen Biotins in 2% BSA für mindestens 60 Minuten. Waschung in TBST-Puffer für 1 Minute. Auftragen des Primärantikörpers CA9 in einer Verdünnung von 1:500, Inkubation über Nacht. Negativkontrolle mit 1% BSA anstatt Primärantikörper inkubieren. Einstellen der Objektträger in TBST-Puffer 2x5 Minuten. Sekundärantikörper in Verdünnung 1:160 auftragen, 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Waschung in TBST-Puffer für 2x5 Minuten. Dann Inkubation nach ABC-Methode für 40 Minuten in einer Konzentration von 1:142 Lösung A, 1:142 Lösung B (vor Benutzung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren). Waschung in TBST Puffer 2x5 Minuten. Detektion für 12 Minuten bei Raumtemperatur mithilfe des NovaRED Peroxidase Substrate Kit Mischung aus 1:76 Reagenz 1, 1:81 Reagenz 2 und 1:81 Reagenz 3 mit 1:76 H₂O₂ und HLPLC-H₂O. Waschung für 2x5 Minuten in VE-H₂O. Kernfärbung mittels Hämalun, 30

2. Material und Methoden

Sekunden. Bläuing in leicht fließendem, kalten Leitungswasser für 10 Minuten.

Einstellen der Objektträger in:

- 70% Ethanol 1x1 Minute
- 96% Ethanol 2x1 Minute
- 100% Ethanol 2x1 Minute
- Xylol 2x3 Minuten

Eindeckeln und aushärten der Schnitte.

Zur Kontrolle der Färbungen wurde als Negativkontrolle bei jedem Färbegang ein Oropharynxkarzinomschnitt extra gefärbt, auf welchen nicht der primäre Antikörper sondern eine 1% BSA Lösung aufgetragen wurde. Alle anderen Färbeschritte erfolgten wie in oben beschriebenem Protokoll. Ebenso wurde bei jedem Färbegang ein Gewebeschnitt mit bekannter Färbereaktion als Positivkontrolle hinzugenommen.

2.4 Lichtmikroskopische Auswertung der CA9-Färbung

Alle Schnitte wurden mit einem Leica Lichtmikroskop in 5-facher, 10-facher, 20-facher und 40-facher Vergrößerung begutachtet und ausgewertet. Eine membranständige Rotfärbung, die die Tumorzelle vollständig oder nahezu umschließt, wurde hierbei als positives Färbemuster beurteilt.

Die Auswertung richtete sich nach verschiedenen Kategorien. Der prozentuale Anteil der membranständigen und damit funktionellen CA9-Färbung der Tumormasse wurde abgeschätzt. Des Weiteren wurde in dichotomen Kategorien beurteilt ob ein Schnitt nekrotische Anteile aufweist und ob ein Hypoxie-typisches oder ein uniformes Färbemuster von CA9 vorliegt. Hierbei sei das hypoxietypische Färbemuster definiert als perinekrotische Färbung und/oder Färbung im Zentrum eines Tumornests, das uniforme Färbemuster als gleichmäßige Färbung der Tumorfläche. Die Intensität der Färbung wurde in 4 Gruppen eingeteilt: 0=keine Färbung, 1=leichte Färbung, 2=mittlere Färbung und 3=starke Färbung.

Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Doktoranden, die durch den Laborleiter Dr. Steffen Wagner eingewiesen wurden. Bei nicht-Übereinstimmung der Auswertung wurde bei den Prozentwerten der Mittelwert verwendet, bei den dichotomen Kategorien wurde durch den Laborleiter entschieden.

2.5 Zelllinien und Western-Blot

Die untersuchten Zelllinien (siehe Tabelle 7) wurden durch die Mitarbeiter des Forschungslabor Frau Roth und Frau Knuth unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Der Hypoxie-Signalweg wurde durch das Zugabe von 150µg Deferoxamine aktiviert. Protein-Proben für die Western-Blot Analysen wurden von oben genannten Mitarbeitern bereitgestellt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie bereits im Paper von Knuth et al. 2017 beschrieben. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Mittels SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Zuerst wurde ein 12% PAA- Trenngel mit Taschen zur Proteinapplikation gegossen. Anschließend die Proteine in die Taschen gefüllt und schließlich das elektrische Feld (150V für 75 Minuten) angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (10V für 50 Minuten). Mittels Ponceau S wurden die Peptide auf der Membran lokalisiert und nachgewiesen. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Primärantikörper gegen CA9 in einer Verdünnung von 1:2500 (in 6ml 2% BSA in TBST). Nachfolgend wurde der an HRP gekoppelte Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:6000 in 6ml 0,5% BSA in TBST aufgetragen. Mittels chemo- luminiszierendem Substrat wurden die Proteinbanden in einem speziellen Gerät (ChemiDoc XRS+ Imager) sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines Protein Markers mit bekannter Zusammensetzung konnte das molekulare Gewicht der Protein Banden auf der Membran bestimmt werden. Anschließend wurde die CA9-Protein-Expression quantifiziert und in Bezug zu den β -Aktin Signalen (als *housekeeper*) normiert.

2.6 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programmes SPSS sowie für die Daten des Western Blots mithilfe Microsoft Excel. Es wurde der Pearson- Chi² Test zur Hypothesentestung verwendet. Mithilfe der Vierfeldertafel wurden jeweils zwei Merkmale auf stochastische Unabhängigkeit getestet. Bei einer Stichprobengröße von $n > 50$ ($n = 74$) wurde dieser asymptotisch 2-seitig ausgewertet. Es lässt sich keine Aussage über die Richtung der Korrelation treffen. Getestet wird ob zwei Merkmale stochastisch unabhängig voneinander sind. Die Häufigkeitsverteilung wurde graphisch in gruppierten Balkendiagrammen veranschaulicht. P-Werte $< 0,005$ wurden als signifikant angesehen. Mittels der Kaplan- Meier- Überlebensanalyse wurden Überlebensfunktionen im Rahmen der Ereigniszeitanalyse angefertigt. Der t-test wurde zum Mittelwertvergleich verwendet. Er zeigt an, ob sich zwei Stichproben signifikant unterscheiden. Dieser wurde als zweiseitiger Test bei gleichen Varianzen durchgeführt.

2.7 Reagenzien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte sind den folgenden Tabellen 6, 7 und 8 zu entnehmen.

Tabelle 6: Material – Zelllinien

Zelllinien	HPV-Status	Erstbeschreibung / Herkunft
UM-SCC-47	positiv	Brenner et al. 2009 / T.E. Carey, University of Michigan, USA
UM-SCC-6	negativ	Brenner et al. 2009 / Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
93-VU-147T	positiv	Steenbergen et al. 1995 / J.P. de Winter, VU Medical Centre, Amsterdam, Netherlands
UT-SCC-33	negativ	Kiuru et al. 1997 / R.A. Grenman, Turku University, Finland

Tabelle 7: Material – Chemikalien/ Reagenzien/ Kit, Antikörper, Geräte

Chemikalien/ Reagenzien/ Kit	Hersteller	Bestellnummer
BSA	Sigma Aldrich	A7030-10G
Deferoxamin	Sigma Aldrich	
Ethanol absolut	Otto Fischer	27690
H ₂ O ₂ 100%	AppliChem	A1134,0250
Hämalaun	Carl Roth	T865.1
HCl 100%	Sigma Aldrich	H1758-500
HPLC- H ₂ O	Sigma Aldrich	34877
NaCl	AppliChem	A2942.1000
PBS	Sigma Aldrich	D8537-500ML
Ponceau	Sigma Aldrich	P7170-1L
Target Retrieval Solution pH6	AppliChem	S169984
Tris	AppliChem	A3452.1000
Tween 20	AppliChem	A4974.0250
Xylol	Carl Roth	CN80.1
NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories Inc.	SK-4800
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
Immun-Star WesternC Substrat	BioRad	170-5070S

2. Material und Methoden

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
CA9 <i>rabbit</i> (Primär)	Proteintech	11071-1-AP
anti-rabbit IgG-HRP (Sekundär)	Cell signalling tech.	7074
β -Aktin <i>mouse</i>	Cell signalling tech.	8H10D10
Geräte	Hersteller	Modell
Lichtmikroskop	Leica	DMI300B
Kamera am Mikroskop	Leica	DFC425
Vortexer Lab dancer	IKA	3365000
Reiskocher Serie S04	Tefal	VC100232/90A-1512R
PAP pen-immun	Sigma Aldrich	1001419477
Mikrotom	Leica	Modell SM2010R
Wasserbad	GFL	1052
Trockenschrank	Binder	ED53
Objektträger	Langenbrinck Lab&Medizintechnik	Superfrost Plus
Ultrasonic-processor	Hielscher Ultrasonics GmbH	UIS250L
Nitrozellulose Membran	GE Healthcare Life Science	Protran
ChemiDoc XRS + Imager	BioRad	
Semi-dry Blot (Blotter)	BioRad	Trans-Blot SD Semi- dry Transfer Cell
Spannungsquelle für SDS- PAGE	BioRad	PowerPac Basic Power Supply
Spannungsquelle für Western- Blotting	BioRad	PowerPac HC Power Supply
Gelelektrophoresekammer	BioRad	Mini-Protean Tetra Cell System
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Fresco 21
Color Plus protein Marker	New England Biolabs	

Tabelle 8: Material – Lösungen/ Puffer, Software

Lösungen/ Puffer	Ansatz
TBST	TBS 10x 50ml, Tween 20 500µl, H ₂ O 450ml
TBS 10x	HCl (mit 10% oder höher konzentriertem HCl titrieren), NaCl 40g, Tris 12,1g, H ₂ O
Tris Lysepuffer	Tris/HCl 1ml 1M (pH7,5), SDS 10% 20ml, EDTA 74mg, NaF 8mg
Trenngel 12%	Trenngelpuffer 5ml, ddH ₂ O 8,8ml, 40% PAA 5ml, 160µl 6% APS, 16µl TEMED
Software	
Computerprogramm Mikroskop	LAS Leica Application Suite V4.3
SPSS	SPSS (IBM SPSS Statistics Version 25.0, USA)
Microsoft Excel	Version 14.4.8, Microsoft, Redmond, Washington, USA

3 Zielsetzung

Diese Dissertation entstand im Rahmen von Untersuchungen zu molekularen Besonderheiten von HPV-assoziierten oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen (OPSCC). Das Forschungsteam konnte in HPV-assoziierten OPSCC die Aktivierung des HIF-Signalwegs zeigen (Knuth et al. 2017). Durch die Stabilisation von HIF-1 α werden dessen Zielgene aktiviert und entsprechende Proteine produziert. Zu diesen Zielproteinen gehört unter anderem die Carboanhydrase 9 (CA9). Die Rolle der CA9 als endogener Hypoxiemarker ist umfassend untersucht, jedoch nicht im Zusammenhang mit Veränderungen des Hypoxie-Signalwegs in HPV-assoziierten OPSCC. HPV- assoziierte und HPV-negative Tumoren stellen unterschiedliche Tumorentitäten dar. Es sollten anhand immunhistochemischer Färbungen Unterschiede in der CA9- Expression bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC untersucht werden. Hierzu besteht die Annahme, dass bei Tumorzellen von HPV-assoziierten OPSCC durch die Stabilisierung von HIF-1 α eine einheitliche Mehrexpression der CA9 zu finden ist. Im Gegensatz dazu sollte bei HPV-negativen Tumoren jede Tumorzelle eine individuelle CA9-Expression aufweisen, in Abhängigkeit ihrer Lokalisation zu versorgenden Gefäßen und entsprechender Sauerstoffversorgung. Somit sollte die Expression der CA9 bei HPV- negativen OPSCC in einer weniger einheitlichen Verteilung (CA9-Hypoxiemuster) vorliegen. Zusammenfassend lautet die Fragestellung, inwiefern sich die Expression der CA9 in HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC verhält, spezifisch im Hinblick auf eine Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich mittels der Analyse der Expression von CA9 bei HPV-positiven OPSCC eine Aussage über die Prognose bzw. das Überleben der Patienten machen lässt.

Bisherige Therapieansätze zur Behandlung der OPSCC unterscheiden nicht nach dem HPV-Status der Tumore. Für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC wird ein besseres Gesamtüberleben beschrieben (Ang et al. 2010; Swartz et al. 2016). Die Forschung gilt dem Verständnis der molekularen Unterschiede der HPV-induzierten Karzinogenese. Die Expression der CA9 und deren veränderte Expression bei Hypoxie stellt einen Aspekt des komplexen Ablaufs der HPV-induzierten Karzinogenese und deren Folgen dar. Ziel der Forschung an HPV-assoziierten OPSCC ist es, eine differenzierte Therapie zur Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität des Patienten zu etablieren.

4. Ergebnisse

4.1 Auswahl des Kollektives und Ermittlung des HPV-Status

Das Kollektiv setzt sich aus 74 Patienten mit OPSCC zusammen. Ausgewählt wurde aus einem Pool von Patienten der Hals-Nasen-Ohren Klinik des Universitätsklinikums Gießens, mit der histologisch gesicherten Diagnose OPSCC. Kriterien zur Auswahl bildeten neben dem HPV-Status, eine Lymphknotenmetastasierung, die Tumorgöße, das Alter und das Geschlecht der Patienten. Tumoren mit einer Größe von T4 wurden bewusst aus diesem Kollektiv ausgeschlossen. Durch ihre Größe kann man von einem hypoxischen Zentrum ausgehen, welches die natürliche Expression von CA9 als Folge hätte und die zu untersuchenden, potenziell HPV-bedingten Effekte überlagern würde. Mittels *matched pairs* Analyse wurden die Patienten insgesamt vier Gruppen zugeordnet (siehe Abbildung 4, Kapitel 2.1). In der Zusammenschau lassen sich die Tumorproben in HPV-negative (n=40) und HPV-assoziierte (n=34) Fälle einteilen. Bei den HPV- negativen Fällen fanden sich bei n=19 Fällen eine Lymphknotenmetastasierung, bei den HPV-assoziierten Fällen trat diese in n=25 Fällen auf.

Die Tumorproben des gewählten Kollektivs wurden in der Abteilung für Angewandte Tumorbiologie des Pathologischen Instituts am Heidelberger Universitätsklinikum auf ihren HPV-Status untersucht. Durchgeführt wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum HPV-DNA Nachweis mit anschließender HPV-Genotypisierung und der immunhistochemische Nachweis von p16 als indirekter Marker für die HPV- Onkogen- Aktivität (Schmitt et al. 2006; Prigge et al. 2015). Wenn sowohl HPV- DNA nachgewiesen werden konnte, als auch der Nachweis für das p16-Protein positiv ausfiel, wurden Proben als HPV-positiv bewertet. Positivität von nur einem Parameter führte zum Ausschluss der Probe aus dem Kollektiv, da in der Untersuchung nur Proben mit eindeutigem HPV-Status analysiert werden sollten. HPV-negative Proben wiesen dementsprechend keine HPV-DNA auf, und zeigten zudem keine immunhistochemische Reaktion für p16.

4.2 Univariate Analyse des Gesamtüberlebens nach klinisch-pathologischen Faktoren und Tumorcharakteristika

Die 2-, 5- und 10- Jahres Überlebensraten wurden für die klinisch-pathologischen Faktoren und Tumorcharakteristika ermittelt und in Tabelle 9 dargestellt. In Abhängigkeit des HPV-Status zeigen sie zu allen Zeitpunkten für Patienten mit HPV- positiven Tumoren ein besseres Überleben, im Vergleich zu Patienten mit HPV- negativen Tumoren (Abbildung 5, $p=0,001$).

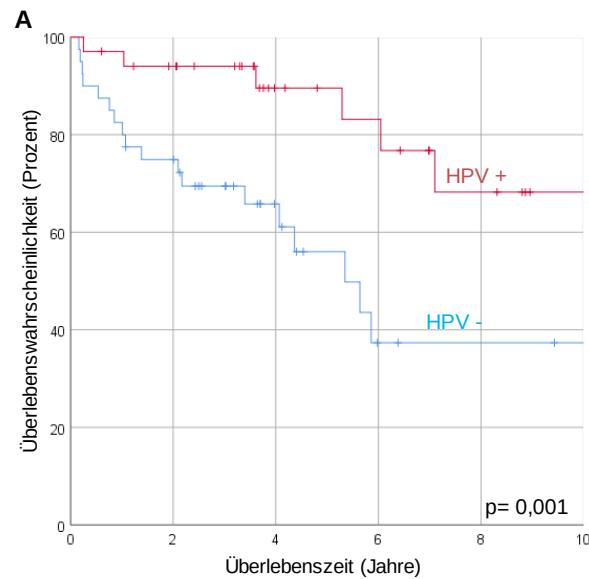


Abbildung 5: Gesamtüberleben des Patientenkollektives von 74 Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit des HPV-Status. Für Patienten mit Tumoren mit HPV-Assoziation (HPV+) zeigt sich ein signifikant besseres Überleben. p: p-Wert (Log- Rank Test).

Innerhalb der Gruppe der HPV-assoziierten Fälle, zeigt sich ein besseres Überleben für Patienten mit Lymphknotenmetastasierung mit dem Signifikanzniveau eines Trends ($0,05 < p < 0,10$; Abbildung 6 (A), $p=0,064$). Für Patienten mit HPV-negativen OPSCC lässt sich ein solcher Trend nicht beschreiben (Abbildung 6 (B)).

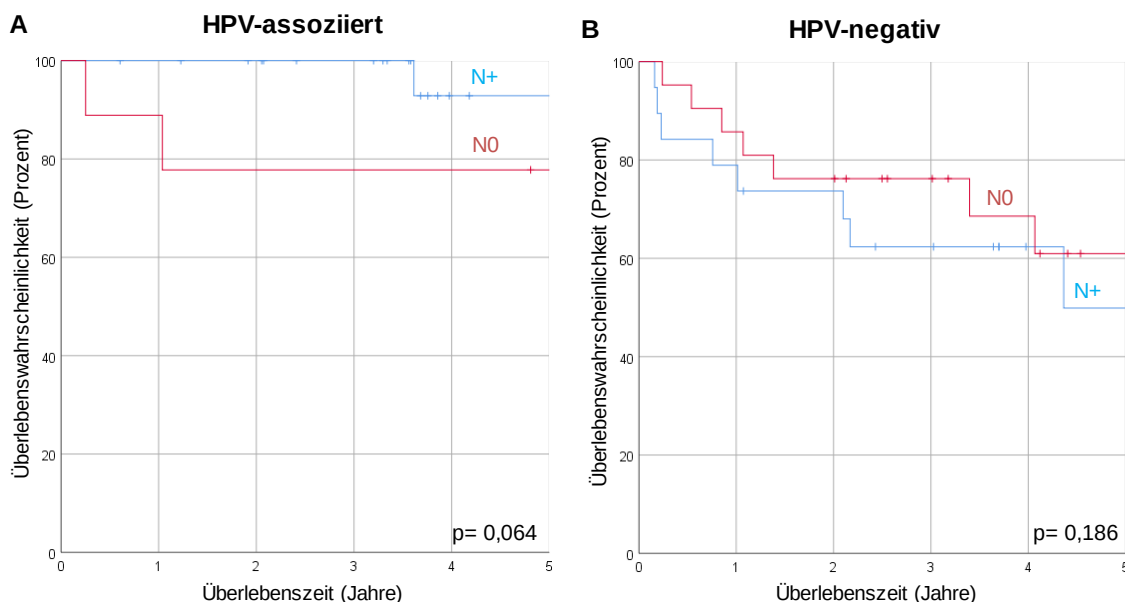


Abbildung 6: Überleben der Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit des N-Status nach Kaplan-Meier. (A) HPV-Assoziation (B) HPV-negative OPSCC. p: p-Wert (Log- Rank Test).

4. Ergebnisse

Die Überlebensanalyse anhand der Tumorgroße ergibt für Patienten mit kleinen Tumoren (T1&2) ein signifikant besseres Überleben als für Patienten mit größeren Tumoren (T3) (Abbildung 7 (A), $p=0,031$). Für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC zeigt sich kein Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Tumorgroße (Abbildung 7 (B), $p=0,841$). In der Gruppe der HPV-negativen OPSCC spielt die Tumorgroße eine signifikante Rolle bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten mit kleinen HPV-negativen Tumoren (T1&2) haben eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit größeren (T3) HPV- negativen OPSCC (Abbildung 7 (C), $p=0,009$).

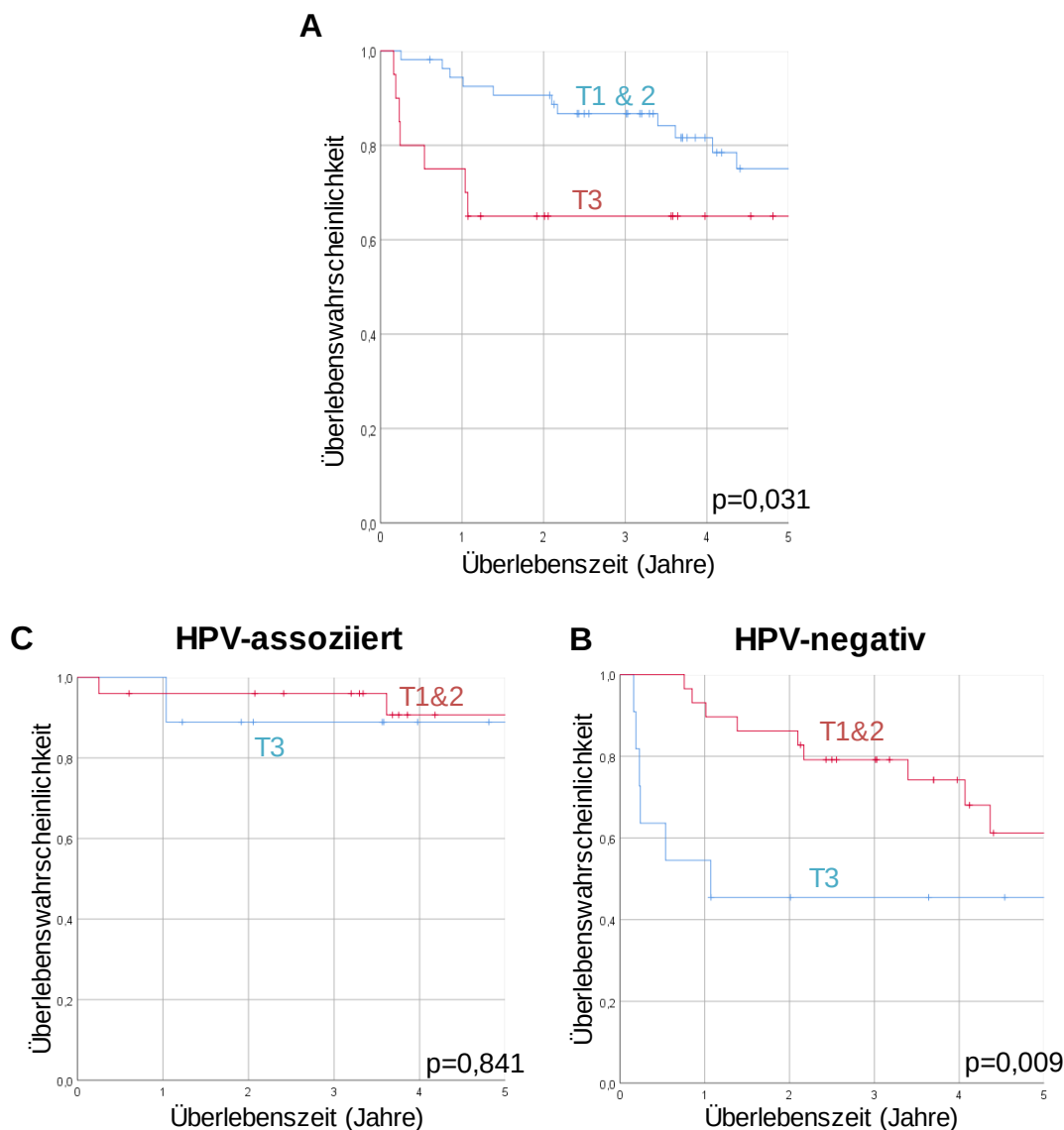


Abbildung 7: Überleben der Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit der Tumorgroße und des HPV-Status nach Kaplan-Meier. (A) Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Tumorgroße des gesamten Kollektives und für (B) HPV-positive OPSCC und (C) HPV-negative OPSCC getrennt aufgezeigt. p: p-Wert (Log-Rank Test).

4. Ergebnisse

Patienten im niedrigen UICC-Stadium haben im Vergleich zum höheren UICC- III- Stadium ein besseres Überleben (Tabelle 9). Hiermit im Einklang sind die Überlebensraten für kleine Tumore (T1-2). Diese spiegeln ebenfalls zu allen Zeitpunkten ein besseres Überleben der Patienten im Vergleich zu jenen mit T3 Tumoren wider. Diese beiden Ergebnisse sind im Einklang miteinander, da das UICC-Stadium mitunter aus dem T-Stadium gebildet wird. Auch die Patienten, die in einen besseren ECOG- Score eingestuft werden, zeigen in der Überlebensanalyse bessere Überlebensraten. Bei Auftreten eines Lokalrezidivs ist für dieses Kollektiv ein schlechtes Überleben für die betroffenen Patienten dokumentiert. Bezüglich der Differenzierung des Tumors zeigen Patienten mit OPSCC mit schlechterer Differenzierung bessere Überlebensraten als jene mit guter Differenzierung.

Tabelle 9: 2-, 5 und 10-Jahres Überlebensraten für klinisch-pathologische Faktoren und Tumorcharakteristika

Gesamtkollektiv			n	Überlebensraten			p-Wert
				2-Jahre (95% CI)	5-Jahre (95% CI)	10-Jahre (95% CI)	
				in %	in %	in %	
HPV-Status	HPV -negativ		40	74,9	56	37,3	0,001
	HPV-positiv		34	94	89,5	68,2	
Alter	unter 60		26	88,1	83,7	65,9	0,172
	über 60		48	81,2	64,2	42,3	
Geschlecht	w		21	90,2	90,2	78,9	0,219
	m		53	81,1	64,6	41,5	
UICC	I-II		21	90,5	77,6	77,6	0,029
	III		53	80,8	68,8	35,3	
ECOG	gesund		61	86,7	74,3	49,5	0,03
	krank		13	69,2	57,7	57,7	
Differenzierung	schlecht		48	89,3	81,4	64,8	0,034
	gut		26	73,1	56,1	37,4	
T	T1-2		54	90,6	75,1	55,9	0,031
	T3		20	65	65	32,5	
N	N0		30	76,7	67,6	61,5	0,603
	N+		44	88,5	73,4	40,8	
Rezidiv lokal	nein		69	85,4	76,9	57,9	0,001
	ja		5	60	20	0	
Nikotin	nein		18	93,8	80,4	k.A.	0,196
	ja		42	81	66,2	45,2	
Alkohol	<2 Standartgläser/d		36	85,9	81,1	64,9	0,305
	>2Standartgläser/d		29	82,6	60,8	52,1	
Nekrose	nein		35	76,8	62,1	48,9	0,117
	ja		39	89,6	79,8	53,7	
	nein	HPV-negativ n=40	23	69,6	48,8	48,8	0,386
	ja		17	81,9	68,3	27,3	
	nein	HPV-positiv n=34	12	90,9	90,9	60,6	0,391
	ja		22	95,9	89,1	76,4	
Hypoxiemuster	nein		41	87,6	78,3	61,9	0,442
	ja		33	78,8	68,9	41,3	
	nein	HPV-negativ n=40	24	83,3	61,2	51	0,085
	ja		16	62,5	50	16,7	
	nein	HPV-positiv n=34	17	93,8	93,8	80,4	0,533
	ja		17	94,1	86,9	62,1	
Uniformes Muster	nein		55	83,6	69,7	47,7	0,692
	ja		19	83,6	76,6	63,9	
IRS	LOW		45	84,4	64,6	49,2	0,333
	HIGH		29	82,4	82,4	56,5	

CI: Konfidenzintervall; p: p-Wert(Log-Rank-Test); IRS: *Immunireactive Score* ; **fett gedrucktes:** signifikantes Ergebnis

4.3 Immunhistochemische CA9-Färbung und deren Assoziation zu HPV

An allen Tumorproben wurde eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis einer CA9-Expression durchgeführt. Anhand der prozentualen Tumorfläche mit Positivität für eine membranständige CA9-Färbung erfolgte eine Einteilung der Tumore in hohe und niedrige CA9-Expressionswerte. Als Grenze wurde hierfür der Median aller ermittelten Prozentwerte verwendet. Zudem wurde unter dem Mikroskop beurteilt, ob ein Tumorschnitt Nekrosen aufweist oder nicht (Abbildung 8).

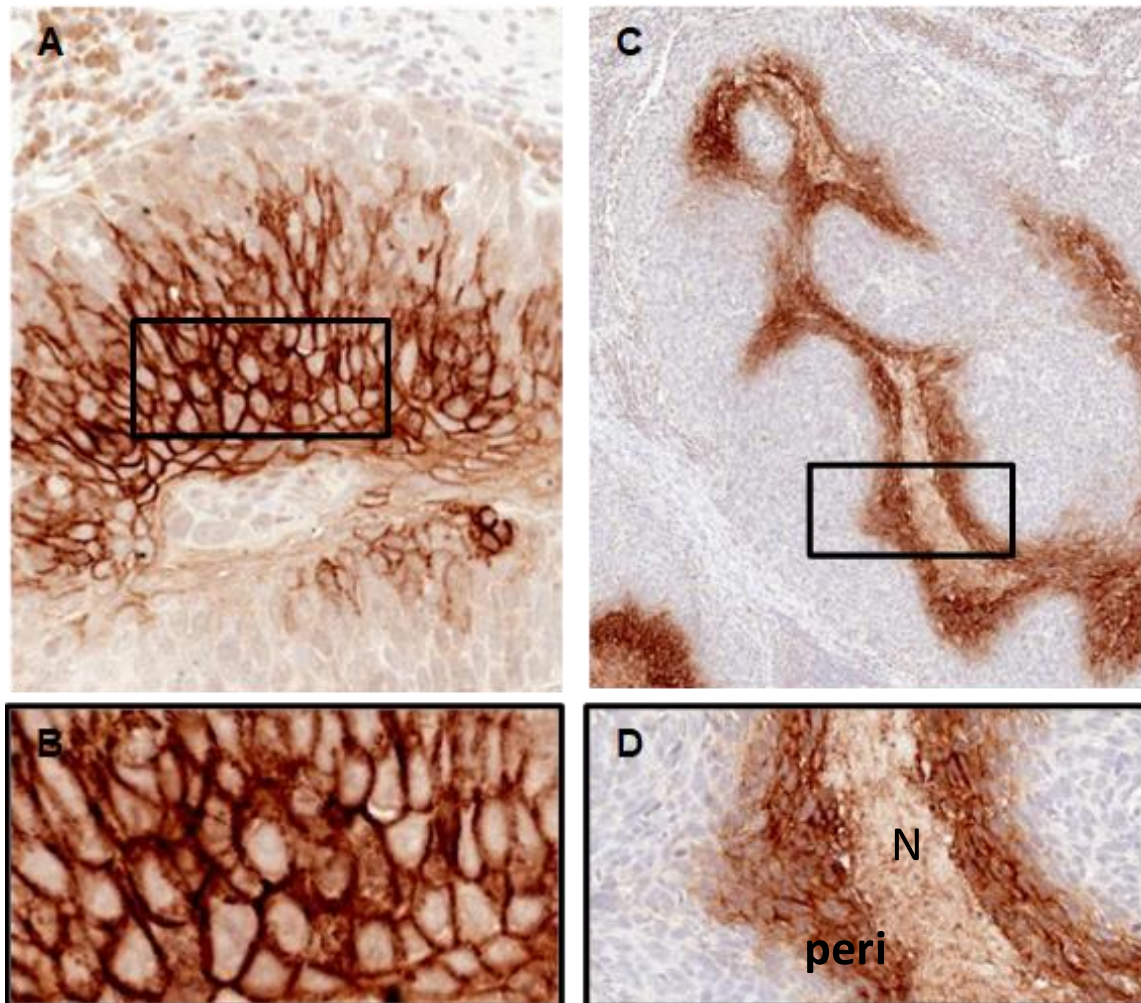


Abbildung 8: Darstellung der immunhistochemischen Färbung der CA9- Expression. (A) Funktionelle membranständige CA9-Färbung. (B) Detailaufnahme der funktionellen membranständigen CA9-Färbung. (C) Nekrose und perinekrotische CA9-Färbung. (D) Ausschnittvergrößerung des in C markierten Bereichs: Nekrose (N) und perinekrotische CA9-Färbung (peri).

4.3.1 Analysen des HPV-Status im Bezug zur CA9-Färbeintensität

Bei Betrachtung der Gewebeproben unter dem Mikroskop stellte sich die CA9-Färbung in unterschiedlichen Intensitäten dar. Diese wurden visuell, durch zwei unabhängige Betrachter bestimmt. Wenn innerhalb der Tumorfläche unterschiedliche Intensitäten auftraten, wurde der Schnitt der jeweils höchsten auftretenden Intensitätsstufe zugeteilt. Erfasst wurden insgesamt vier Stufen der Intensität (vergleiche Tabelle 10 (A)). Die erfassten Intensitäten wurden anschließend in zwei Gruppen zusammengefasst: starke und schwache CA9-Intensität (Abbildung 9).

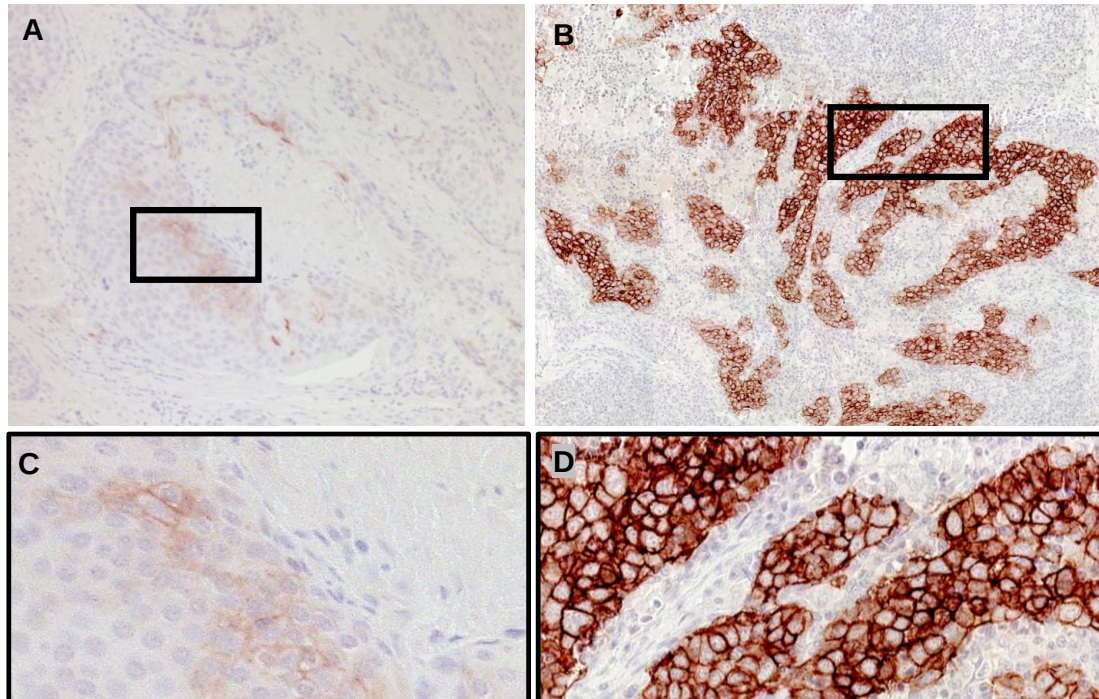


Abbildung 9: Darstellung der CA9-Färbeintensitäten. (A) schwache Färbeintensität. (B) starke Färbeintensität. (C) Detailaufnahme schwache Färbeintensität. (D) Ausschnittvergrößerung des in B markierten Bereiches: starke Färbeintensität.

4. Ergebnisse

Der Vergleich der Färbeintensität mit dem HPV-Status der Tumorproben zeigt, dass eine HPV-Assoziation häufiger mit einer starken Färbeintensität einhergeht (Abbildung 10, $p = 0,067$).

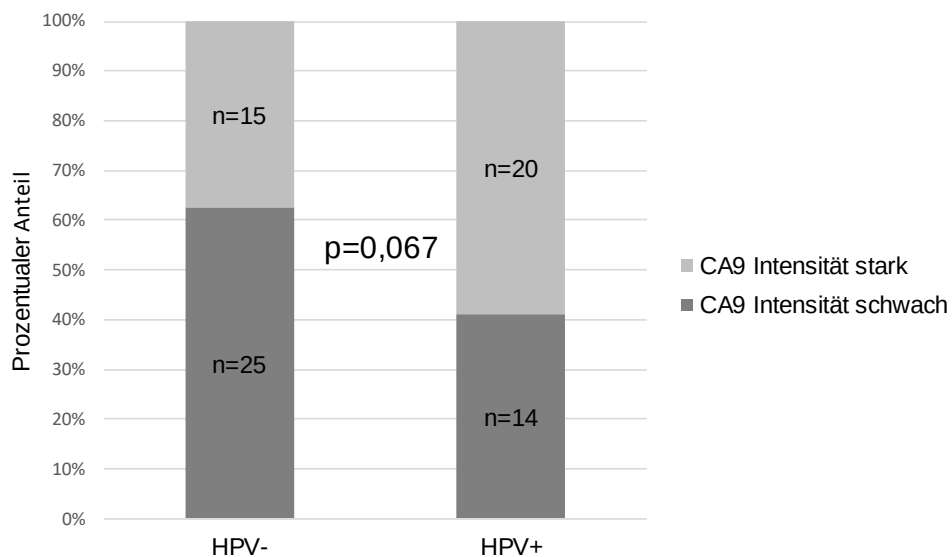


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung von starker und schwacher Färbeintensität der CA9-Färbung bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC (n=74). Bei HPV- Assoziation (HPV+) finden sich häufiger starke CA9-Färbeintensitäten (Signifikanzniveau eines Trends $0,05 < p < 0,10$). p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test).

4.3.2 CA9-Score aus gefärbter Tumorfläche und Intensität

Zur weiteren Evaluation und Quantifizierung der Daten, wurde ein sogenannter *Immunoreactive Score* (IRS) erstellt (Tabelle 10 (A)). Der Wert des Produkts aus Färbeintensität und prozentualem Anteil der Tumorfläche mit membranständiger CA9-Färbung wurden zur Weiterverwendung in der Statistik als CA9-Expressionsstärke definiert. Dies ist Tabelle 10 (B) zu entnehmen.

Tabelle 10: *Immunoreactive Score (IRS)*, (A) Zusammensetzung des IRS (B) Verteilung der Punktwerte

(A)

IRS [I × PMF]		Färbeintensität [I; 0-3]			
		Negativ (0)	Schwach (1)	Mittel (2)	Stark (3)
Prozent der membranständigen CA9-Färbung [PMF; 0-3]	Negativ (0)	0	0	0	0
	<7,25% (1)	0	1	2	3
	≥7,25% (2)	0	2	4	6
	≥20% (3)	0	3	6	9

(B)

Erreichter Punktwert	Definition der Expressionsstärke	Zusammengefasst
0 bis 1	Keine Expression	LOW
2 bis 3	Wenig Expression	
4	Mittelstarke Expression	HIGH
6 bis 9	Starke Expression	

4. Ergebnisse

Abbildung 11 (A) zeigt die Verteilung der IRS-Werte bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC. HPV-assoziierte Tumormproben zeigen signifikant häufiger hohe IRS-Werte (Abbildung 11 (B), $p=0,025$).

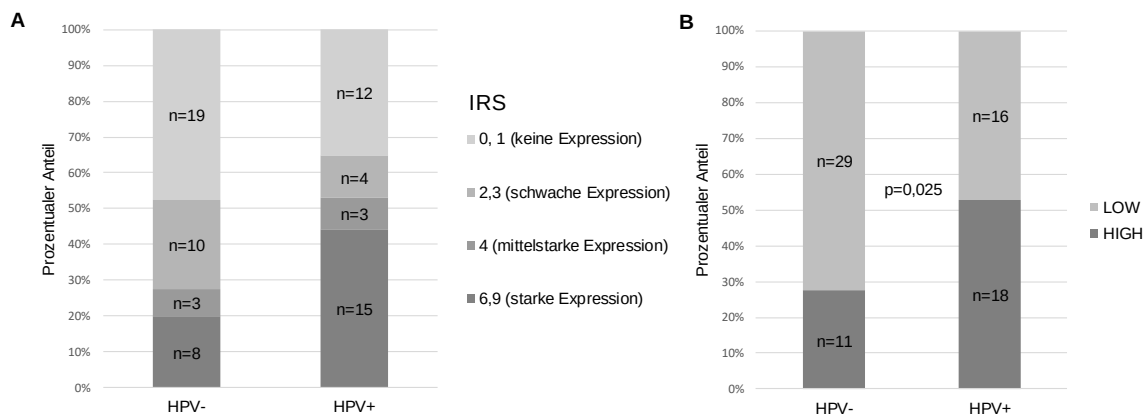


Abbildung 11: IRS bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC. (A) Verteilung der IRS Werte. (B) Zusammenfassung der IRS-Werte in einem Score (Low/High). p: p- Wert (Chi-Quadrat-Test).

Bei Abgleich des IRS mit dem Auftreten von Nekrosen, fanden sich Gewebeproben ohne Nekrosen signifikant häufiger im niedrigen Score wieder (Abbildung 12, $p=0,024$). Weitere Parameter wie zum Beispiel die Tumorgöße, das CA9-Färbemuster oder der N-Status im Vergleich zum IRS-Score ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

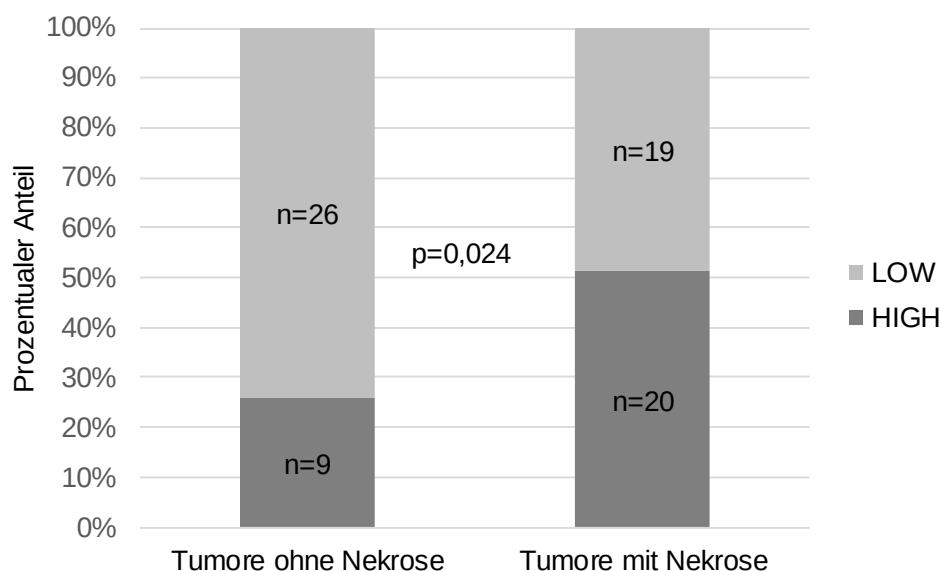


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung des niedrigen und hohen IRS und dem Auftreten von Nekrosen (n=74). Gewebeproben ohne Nekrose finden sich signifikant häufiger im niedrigen Score. p: p-Wert (Chi-Quadrat Test).

4.3.3 CA9-Positivität in Bezug zur Tumorgroße und dem HPV-Status

Verglichen wurde die CA9-positiv gefärbte Tumorfläche mit der Größe des Primärtumors. Dabei zeigte sich für HPV-assoziierte Fälle (n=34) kein Unterschied in der Verteilung der CA9-stark und -schwach gefärbten Proben in Bezug auf die Tumorgroße (Abbildung 13 (A)). Im Gegensatz dazu ließ sich bei HPV-negativen Tumorproben eine ungleiche Verteilung erkennen (jedoch ohne statistische Signifikanz): Kleine Tumore (T1&2) weisen wenig CA9-Färbung auf, größere Tumoren (T3) viel CA9 positiv gefärbte Tumorfläche (Abbildung 13 (B), $p=0,153$).

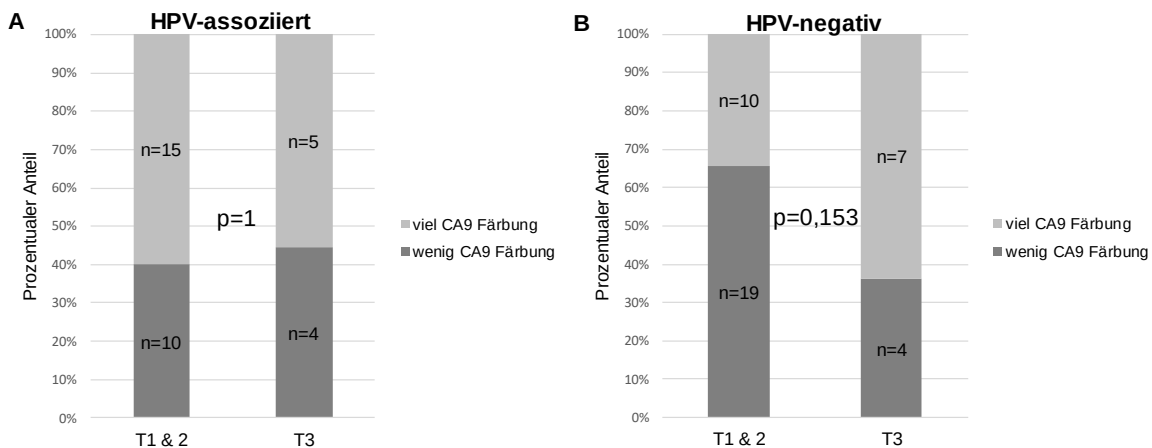


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der CA9-Positivität (gefärbte Tumorfläche) in Bezug zur Tumorgroße für HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC. Getrennte Darstellung für (A) HPV-assoziierte OPSCC und (B) HPV-negative OPSCC. p: p-Wert (Exakter Test nach Fisher).

4.4 CA9-Färbemuster

Die immunhistochemische Färbung der Tumorproben mit Antikörpern gegen CA9 zeigte bei der Auswertung unter dem Mikroskop zwei unterschiedliche Färbemuster. Zum einen stellte sich bei n=33 Fällen die CA9-Färbung zentral innerhalb von Tumornestern oder als perinekrotische Färbung dar. Dieses Färbemuster wird forthin als „Hypoxiemuster“ bezeichnet (Abbildung 14(A)). Zum anderen zeigten sich bei n=19 der Gewebeschnitte ein in der Tumormasse gleichmäßig verteiltes Färbemuster, welches weiterfolgend als „uniformes Muster“ bezeichnet werden soll (Abbildung 14(B)). N=22 der Proben des Kollektives konnten durch diffuse CA-9 Färbung keinem der beiden Muster eindeutig zugeordnet werden. Diese 22 Proben wurden bei Analysen bezüglich des CA9- Hypoxiemusters zusammen mit den 19 Proben (uniformes Muster) als „kein CA9- Hypoxiemuster“ gewertet, da sie eine Färbung mit CA9 aufweisen, die nicht zu vernachlässigen ist.

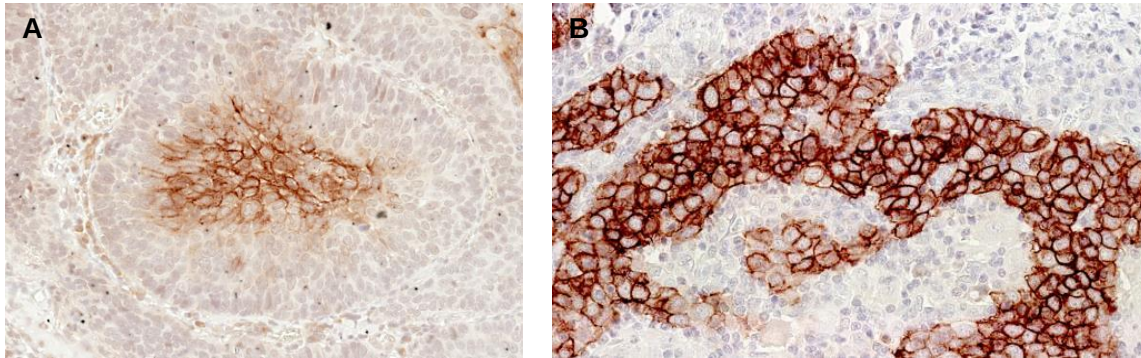


Abbildung 14: Darstellung der immunhistochemischen Färbemuster. (A) Hypoxiemuster. (B) Uniformes Muster.

Beim Vergleich des Hypoxiemusters und dem Auftreten von Nekrosen zeigte sich, dass Tumore mit Nekrose häufig ein hypoxisches CA9-Färbemuster aufweisen (Abbildung 15 (A), $p=0,002$). Das Hypoxiemuster tritt zudem HPV-unabhängig auf (Abbildung 15 (B), $p=0,388$).

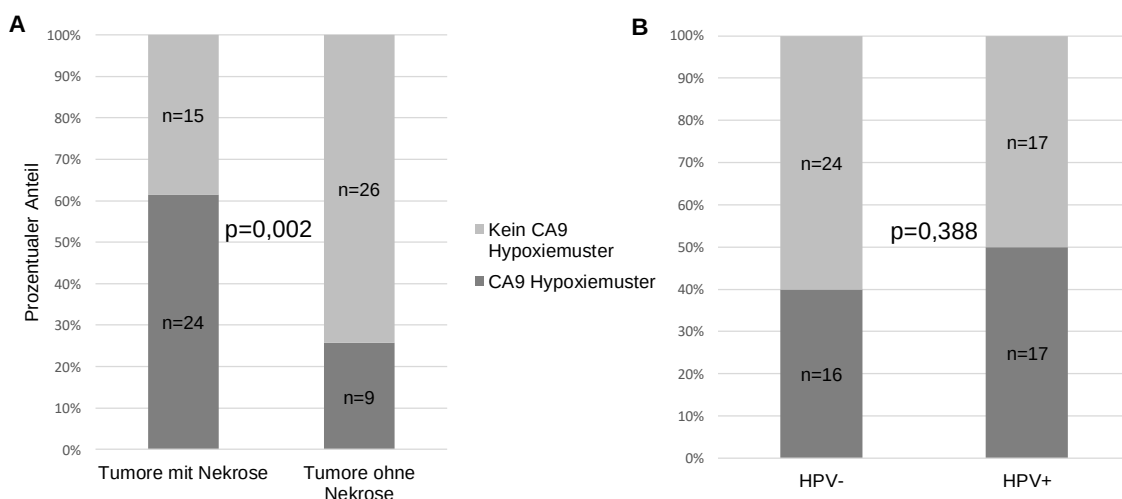


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Auftretens eines CA9-Hypoxiemusters bei Tumoren mit und ohne Nekrose und bei HPV- und HPV+ OPSCC (n=74). (A) Tumore mit Nekrose weisen im immunhistochemischen CA9-Nachweis ein hypoxisches Färbemuster auf. (B) Das CA9-Hypoxiemuster tritt HPV-unabhängig auf. p: p-Wert (Chi-Quadrat Test).

Bei Betrachtung des Lebensalters wiesen OPSCC von jüngeren Menschen seltener das Hypoxiemuster auf (mit einem Trend der Signifikanz (Tabelle 11, $p=0,078$)). Zudem fanden sich häufiger Fälle die ein Hypoxiemuster aufweisen in einem hohen UICC- Stadium (mit einem Trend der Signifikanz (Tabelle 11, $p=0,081$)). In Kapitel 4.3.2 wurde aus der CA9-Färbung und Intensität der CA9-Färbung ein IRS gebildet. Vergleicht

4. Ergebnisse

man diesen mit dem CA9-Hypoxiemuster, zeigen sich die Tumorproben ohne CA9- Hypoxiemuster signifikant häufiger (Tabelle 11, $p < 0,001$) im niedrigen IR-Score.

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilungen für das Hypoxiemuster

		Anzahl Tumorproben (n)		p-Wert
		CA9 - Hypoxiemuster	Kein CA9 - Hypoxiemuster	
Alter	Unter 60 Jahre	8	18	0,078
	Über 60 Jahre	25	23	
UICC-Stadium	I-II	6	15	0,081
	III	27	26	
IRS	LOW	11	34	<0,001
	HIGH	22	7	

Fett gedrucktes: signifikantes Ergebnis

Bei der Überlebensanalyse für das CA9-Hypoxiemuster zeigte sich ein schlechteres Überleben für Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit nachweisbarem Hypoxiemuster (Abbildung 16 (A), $p=0,085$). Bei den HPV-assoziierten Fällen konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden (Abbildung 16 (B), $p=0,533$).

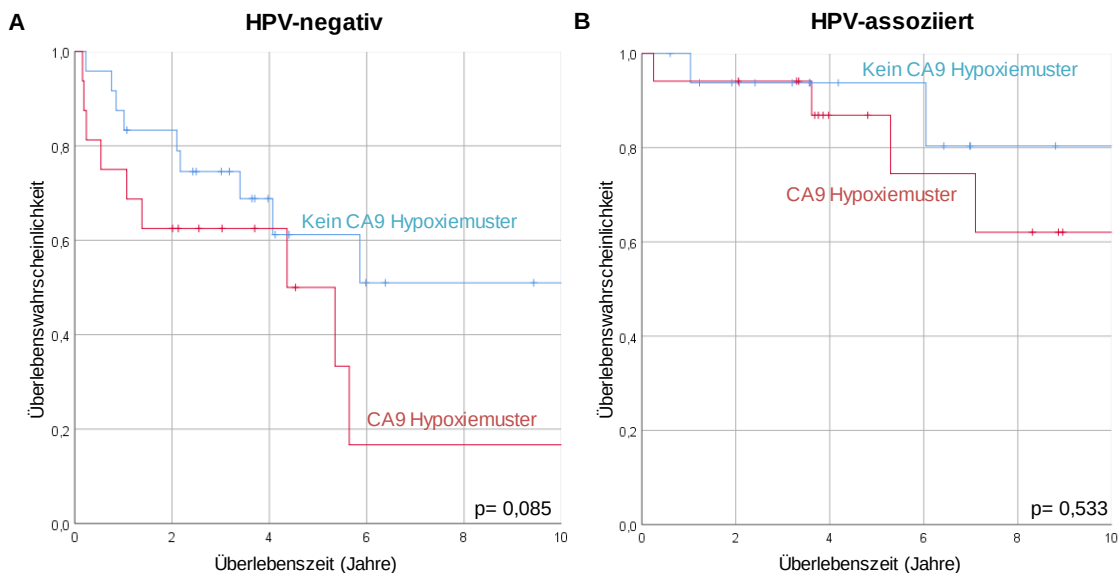


Abbildung 16: Überlebensprofile für das CA9-Hypoxiemuster bei HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC. Getrennte Darstellung für (A) HPV-negative OPSCC (n=40) und (B) HPV-assoziierte OPSCC (n=34). p: p-Wert (Log-Rank Test).

4. Ergebnisse

Die Auswertung anhand des Auftretens des uniformen Musters zeigte keine Korrelationen zu den untersuchten Tumorcharakteristika und Risikofaktoren. Auch in der Überlebensanalyse, ergab das uniforme Muster keinen Anhalt für besseres oder schlechteres Überleben.

4.5 Ergebnisse in Zusammenhang mit Nekrose

Nekrosen entstehen durch Zelluntergang an Orten im Tumorgewebe mit verringertem Sauerstoffgehalt. Durch Betrachtung der Gewebeproben unter dem Mikroskop wurde bestimmt, ob ein Tumor nekrotische Bereiche aufweist oder nicht. Dies wurde abschließend mit verschiedenen Faktoren verglichen (siehe unten).

4.5.1 Nekrose, HPV-Status und CA9-gefärbte Tumorfläche

Bei HPV-Assoziation der Tumore finden sich häufiger Nekrosen in den Gewebeproben (Abbildung 17 (A), $p=0,057$). Anhand der prozentualen Tumorfläche mit Positivität für eine membranständige CA9-Färbung erfolgte eine Einteilung der Tumore in hohe und niedrige CA9-Expressionswerte. Als Grenze wurde hierfür der Median aller Prozentwerte verwendet. Bei dem Vergleich der mit CA9-gefärbten Tumorfläche und dem Auftreten von Nekrose zeigte sich, dass Tumore mit Nekrose signifikant häufiger einen ausgeprägten Anteil der membranständigen CA9-Färbung aufweisen (Abbildung 17 (B), $p=0,036$).

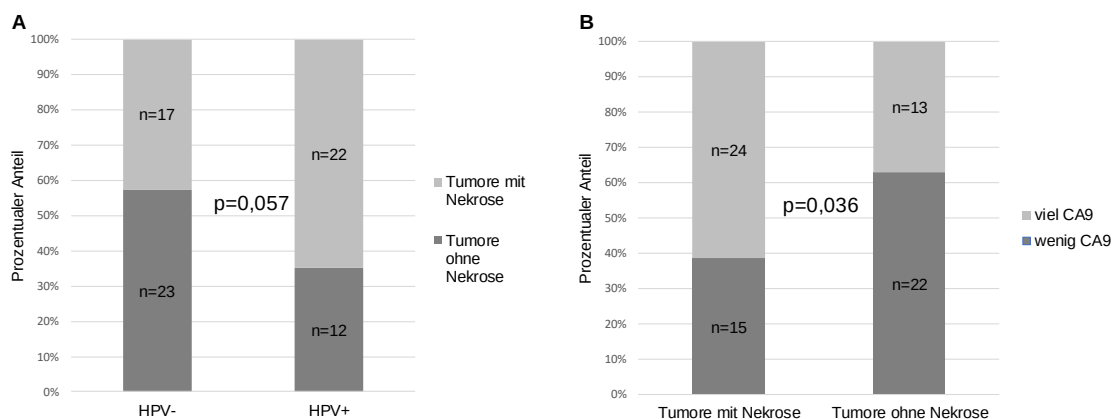


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen HPV-Status, Nekrose und CA9-Färbung in der IHC-Färbung (n=74). (A) Bei HPV-Assoziation finden sich häufiger Tumore mit Nekrosen. (B) Tumore mit Nekrose weisen signifikant häufiger einen ausgeprägten Anteil der membranständigen CA9-Färbung auf. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test).

4.5.2 Vergleich von HPV-Status und Hypoxiemarkern

Als indirekte Reaktion auf eine Sauerstoffarmut wird die CA9 in hypoxischen Geweben exprimiert. Als weiteres Anzeichen für hypoxische Zustände gelten Nekrosen, diese entstehen durch Zelluntergang. Wie bereits beschrieben, zeigten sich in HPV- assoziierten Tumorproben häufiger Tumore mit Nekrose. Es sollte mittels dieser beiden Zeichen für Hypoxie (CA-Färbung und Nekrose) der Zusammenhang von Sauerstoffarmut zum HPV-Status der Gewebeproben näher untersucht werden. Es wurden Gewebeproben mit prozentual viel CA9-Positivität und dem zusätzlichen Vorhandensein von Nekrosen als Anzeiger für eine hypoxische Situation gewertet (hohes Hypoxielevel). Proben mit prozentual wenig gefärbter Tumorfläche ohne Nekrosen sollen ein niedriges Hypoxielevel veranschaulichen. Jene Proben, die keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten (viel gefärbte Tumorfläche ohne Nekrosen und wenig Färbung mit Nekrosen) wurden als „uneinheitliche Marker“ zusammengefasst. Bei dem Vergleich des HPV-Status mit diesen Hinweisen auf Hypoxie zeigten sich bei HPV-Assoziation häufiger Tumorproben mit Nekrose und einem hohen Maß an funktioneller CA9-Färbung (Abbildung 18, $p=0,093$). Bezüglich der Überlebensanalyse konnte für diese Konstellation keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben festgestellt werden.

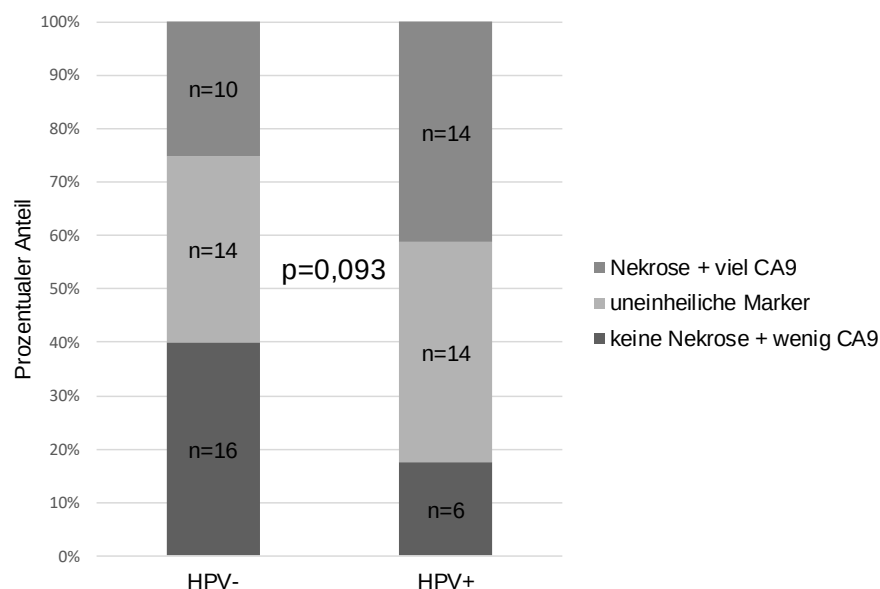


Abbildung 18: Kombinierte Auswertung der CA9-Expression und dem Auftreten von Nekrosen bei HPV+ und HPV- OPSCC (n=74). Bei HPV-positiven OPSCC finden sich häufiger Tumorproben mit Nekrose und einem hohen Maß an funktioneller CA9- Färbung. p: p-Wert (Chi-Quadrat Test).

4. Ergebnisse

Bei Betrachtung des CA9-Hypoxiemusters (Kapitel 4.4.1) in Zusammenhang mit der Gruppierung aus Nekrose und gefärbter CA9-Tumorfläche, fanden sich die Fälle mit Hypoxiemuster häufiger in der Kategorie mit viel gefärbter CA9-Fläche und Nekrosen (Abbildung 19, $p < 0,001$).

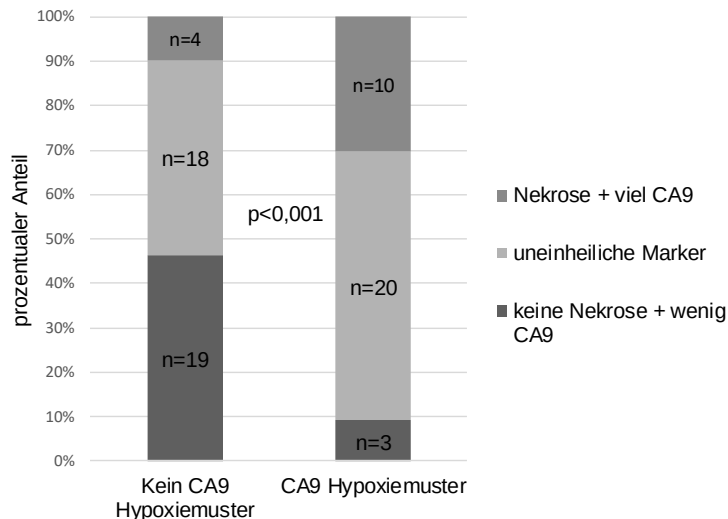


Abbildung 19: Verteilung des CA9-Hypoxiemusters und der Hypoxiemarker (Nekrose und CA9-Positivität). OPSCC die der Gruppe aus Nekrose und CA9-Positivität zugeordnet wurden, weisen häufiger das CA9-Hypoxiemuster auf. p: p-Wert (Chi-Quadrat Test).

4.5.3 Überlebensanalyse in Bezug auf Nekrose

Die Untersuchung des Auftretens von Nekrosen bei OPSCC ergab keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben der Patienten (Abbildung 20, $p = 0,117$).

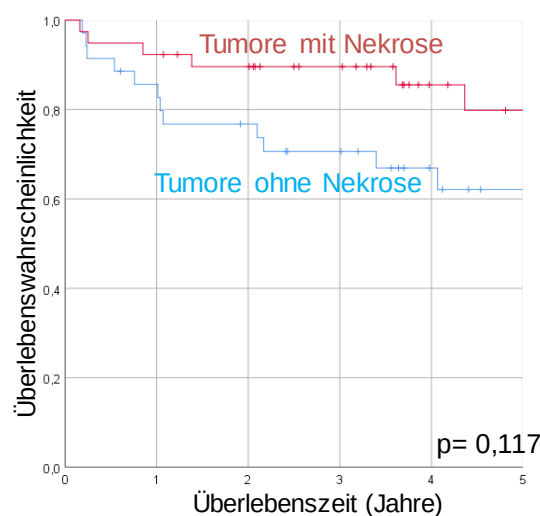


Abbildung 20: Überlebensprofil stratifiziert nach dem Vorhandensein von Nekrose im Tumor. Patienten mit nekrotischen Tumoren haben ein besseres Gesamtüberleben. p: p-Wert (Log-Rank Test).

4.6 CA9-Proteinexpression in HPV-assoziierten und HPV-negativen HNSCC Zelllinien bei Normoxie und Hypoxie

Molekularbiologisch konnte bereits gezeigt werden, dass HPV-Onkogene in der Lage sind HIF-1 α zu stabilisieren (Bodily, 2011). Die Auswirkung von Hypoxie auf HPV-assoziierte Tumorzellen soll hier näher untersucht werden. Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der HPV-assoziierten Tumore, wurde die Expression der CA9 an HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien 93-VU-147T und UM-SCC-47 als HPV-positive und die Zelllinien UT-SCC-33 und UM-SCC-6 als HPV-negative Beispiele herangezogen. Diese wurden mit dem Chelatbildner Deferoxamin mesylate (Deferoxamin, DFO) zur chemischen Induktion des HIF-1 α Signalweges unter Standard-Kulturbedingungen behandelt. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, mithilfe einer Antigen-Antikörperreaktion markiert und schließlich mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers und einer entsprechenden Substratumsetzung sichtbar gemacht.

4.6.1 CA9-Grundlevel der Zelllinien

Um Unterschiede im Grundlevel der CA9-Expression zu detektieren, wurde die relative CA9-Expression ohne weitere Behandlung der Zellkulturen („T0“) von drei repräsentativen Western-Blots quantifiziert und in einem Diagramm als Mittelwert aufgetragen. Es zeigten sich geringe Unterschiede im Grundlevel der CA9-Expression, die unabhängig vom HPV-Status der Zelllinien sind. Im Vergleich von HPV-positiven Zelllinien zu HPV-negativen Zelllinien ergab der t-Test ein Ergebnis von $p=0,687$ (Abbildung 21).

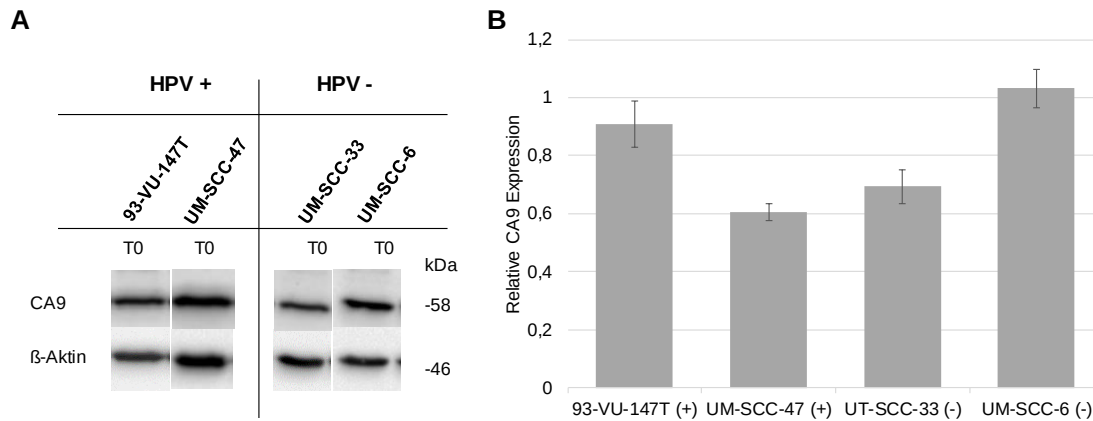


Abbildung 21: Grundlevel der CA9-Proteinexpression. (A) Repräsentative Western- Blots der CA9-Expression unter Standard-Kulturbedingungen bei HPV- assoziierten und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien. (B) Quantitative Auswertung der CA9-Expression unter Standard-Kulturbedingungen. Die Daten zeigen den Mittelwert mit +/- Standartabweichung bei n= 3.

4.6.2 Zeitliche Entwicklung der CA9-Proteinexpression bei Induktion des Hypoxie-Signalwegs (DFO Zeitreihe)

Ziel dieses Experiment war es, einen möglichen Unterschied in der CA9-Expression bei der Aktivierung des Hypoxie-Signalweges in HPV-assozierten und HPV-negativen Zelllinien zu detektieren und zu veranschaulichen. Hierfür wurden die Zelllinien für verschiedene Zeitintervalle mit DFO behandelt. Quantifiziert wurde die CA9-Expression an sechs Zeitpunkten: Ohne Behandlung mit DFO (T0), nach 3, 6, 8, 24 und 48 Stunden Behandlung mit DFO (Abbildung 22 (A)). Es zeigen sich Unterschiede in der CA9- Proteinexpression bei HPV-assozierten und HPV-negativen Zelllinien. Die HPV- positive 93-VU-147 zeigt, mit Ausnahme des letzten Zeitwerts, annähernd konstante CA9-Expressionswerte (Abbildung 22 (B)). Vor allem die HPV-positive UM- SCC-47 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der CA9-Expression in Anwesenheit von DFO (Abbildung 22 (D)). Die HPV-negativen Zelllinien UM-SCC-6 und UT-SCC-33 zeigen hingegen einen erkennbaren Trend in Richtung eines CA9-Protein Abfall in Anwesenheit von DFO (Abbildung 22 (C&E)).

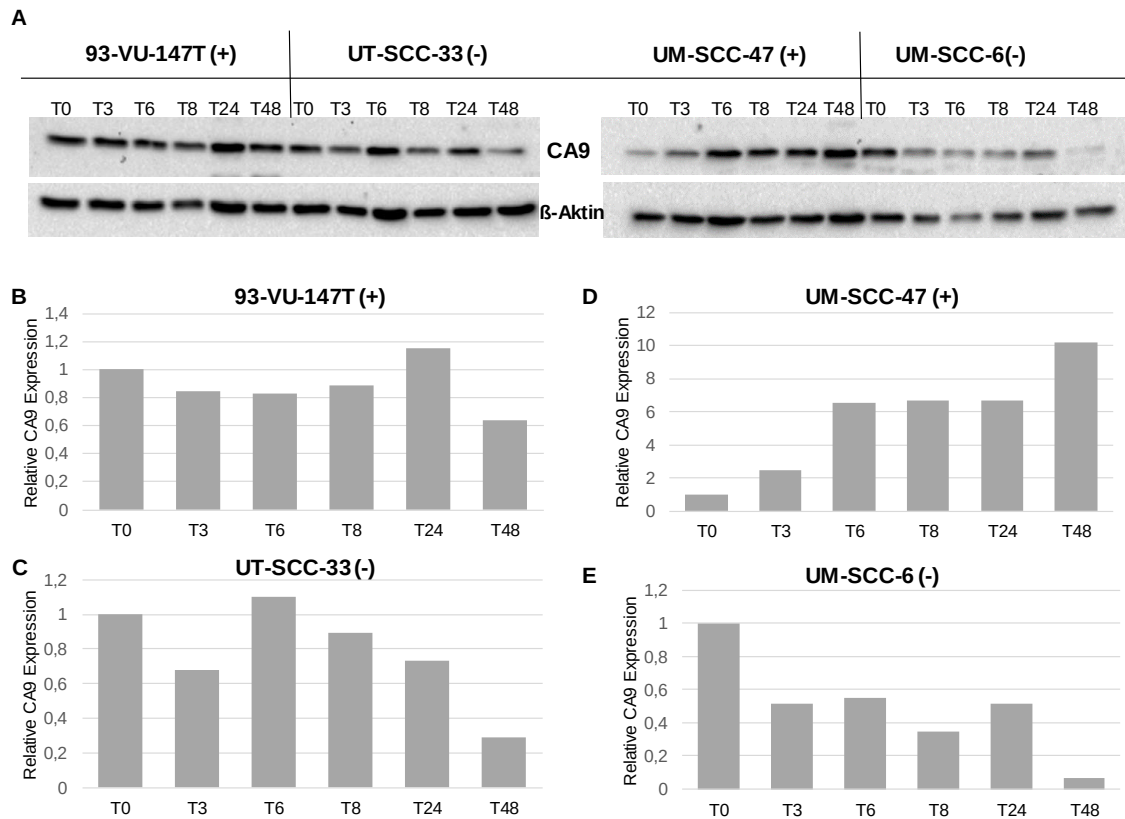


Abbildung 22: CA9-Proteinexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten von HPV- positiven und HPV-negativen HNSCC- Zelllinien unter Inkubation mit DFO.

(A) Western-Blots von Zellextrakten HPV-positiver und HPV-negativer HNSCC- Zelllinien, welche für unterschiedliche Zeitdauer mit DFO zur chemischen Induktion des HIF-1 α Signalweges behandelt wurden. CA9-Bande bei 58 kDa, β -Aktin bei 46 kDa. (B bis E) Quantifizierung der CA9-Expression während Inkubation mit DFO bei HPV- positiven und -negativen Zelllinien (Blots aus Abb. 21 (A)). Die T0 Werte wurden auf 1 gesetzt.

4.6.3 CA9-Proteinexpression nach Behandlung mit DFO für 6 Stunden

In der Annahme, dass nach Behandlung mit DFO die HIF-1 α Expression bei allen vier Zelllinien erhöht ist (Knuth et al. 2017), und in Anbetracht der Voruntersuchung (siehe Abbildung 22) wurde nach 6-stündiger Behandlung mit DFO die CA9-Expression als Zielgen (*downstream* von HIF-1 α) untersucht. Von besonderem Interesse ist hierbei die unterschiedliche CA9-Expression bei HPV-Assoziation und HPV-Negativität, weshalb in Abbildung 23 (B) die Zelllinien nach ihrem HPV-Status zusammengefasst worden sind. Hierbei zeigte sich im Mittel eine stärkere CA9-Expression bei HPV-assoziierten Zelllinien im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien (Abbildung 23, $p=0,132$).

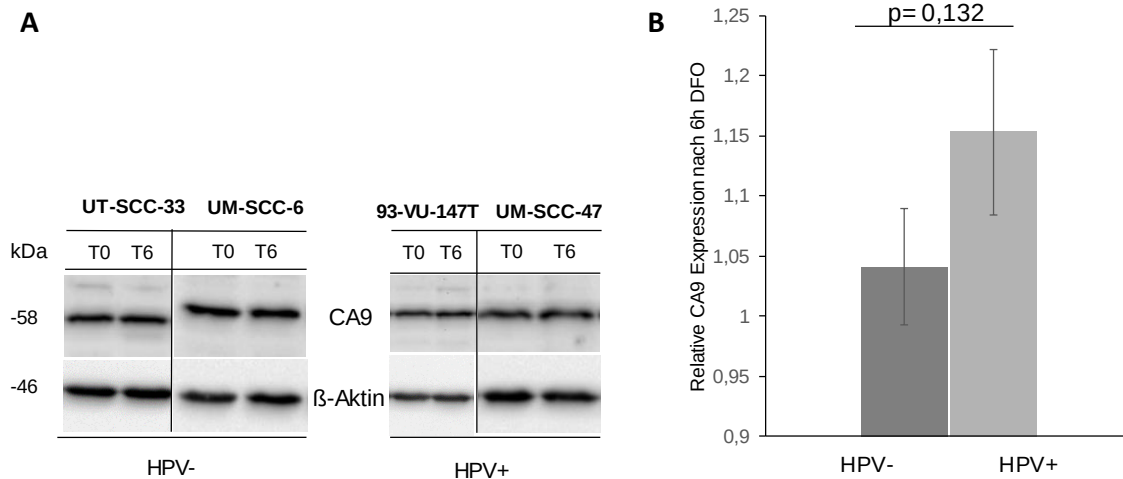


Abbildung 23: Stärkere CA-Expression nach Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs durch DFO bei HPV-positiven HNSCC Zelllinien. (A) Repräsentative Western-Blots von Zellextrakten HPV-positiver (93-VU-147T und UM-SCC-47) und HPV-negativer (UT-SCC-33 und UM-SCC-6) Zelllinien, die für 6 Stunden (T6) mit DFO behandelt wurden. (B) Relative CA9-Proteinlevel nach Behandlung mit DFO für 6 Stunden, normiert auf die β -Aktin Expression. Die T0 Werte wurden auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Daten aller vier Zelllinien als Mittelwert mit $\pm$ Standardabweichung bei jeweils n=3. p: p-Wert (t-Test).

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist, die Besonderheiten der HPV-assoziierten OPSCC anhand der Expression des endogenen Hypoxiemarkers CA9 näher zu untersuchen. Es sollen Unterschiede im Hinblick auf eine Hypoxie-Signalwegs-Aktivierung bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC dargestellt werden. Die experimentelle Arbeit und statistische Auswertung der Ergebnisse bestätigte die bereits präformierte Vermutung, dass HPV-assoziierte OPSCC eine eigene Tumorentität darstellen. Es zeigte sich ein - immunhistochemisch bestimmtes- höheres Hypoxielevel bei HPV-positiven OPSCC. Dieses Ergebnis lässt auf einen anderen Tumormetabolismus und die Aktivierung molekularer Signalwege bei HPV-assoziierten OPSCC schließen. Unter chemischer Induktion des Hypoxie Signalweges exprimierten HPV-positive Tumorzellen im Vergleich zu den HPV-negativen Tumorzellen mehr CA9.

5.1 Überlebensanalyse in Bezug auf den HPV-Status

Die Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Betrachtung des HPV-Status ergab ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Dies entspricht den allgemeinen Angaben in der Literatur, welche für HPV-assoziierte Tumore ein signifikant besseres Überleben statuieren (Wittekindt et al. 2012; Ang et al. 2010; Benson et al. 2014; Fakhry et al. 2008; Fakhry und D'Souza 2013; Swartz et al. 2016). Der HPV-Status wird als stärkster unabhängiger Prognosefaktor beim OPSCC beschrieben. Die bessere Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit HPV- assoziierten Tumoren begründet sich unter anderem an der besseren lokalen Tumorkontrolle durch erhöhte Strahlensensitivität (Arenz et al. 2014; Ziemann et al. 2015; Lindel et al. 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Patienten mit HPV- positiven OPSCC trotz einer Lymphknotenmetastasierung ein besseres Überleben aufweisen. Die 5-Jahres Überlebensrate für HPV-positive Fälle aus dem hier betrachteten Kollektiv deckt sich mit jener der Forschungsgruppe Lin et al. 2013. Sie liegt für Patienten mit HPV-positiven OPSCC bei 89%, deutlich besser als für Patienten mit HPV-negativen OPSCC (56%). Im Unterschied zu den in der Literatur verwendeten Kohorten wurde in dieser Arbeit ein selektiertes Kollektiv verwendet. Die Auswahl der Patienten orientierte sich an der Tumorgroße (T1-T3), dem HPV-Status und einer Lymphknotenmetastasierung. In Bezug auf die Überlebensraten ergeben sich durch die Selektion dieses Kollektives jedoch keine Unterschiede zur Literatur. Die Ergebnisse sind in diesem Punkt übertragbar und eine Vergleichbarkeit ist gegeben.

Die Tumorgröße ist mit einem schlechteren Gesamtüberleben für Patienten vergesellschaftet (Schneider et al. 2018; Amini et al. 2016; Wagner et al. 2017). In unserer Überlebensanalyse zeigen die Patienten mit kleiner Tumorgröße ebenso ein signifikant besseres Überleben. Für Patienten mit HPV-negativen OPSCC spiegelte sich dieses Ergebnis ebenfalls als signifikant wieder. Dies ist im Einklang mit der Untersuchung von Swartz et al. die ebenfalls bei HPV-negativen OPSCC für eine fortgeschrittene Tumorgröße einen Trend zu einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten sehen. Die HPV-positiven Fälle betreffend, ergab die Tumorgröße keinen Unterschied in Bezug auf das Überleben der Patienten. Wagner et al. zeigten in einer Untersuchung für HPV-positive OPSCC, dass die Tumorgröße nach dem HPV-Status die wichtigste Einflussgröße für die Überlebenschance ist. Jedoch wurden als Differenzierung für jene Analyse kleine Tumoren als Größe T1-3 und große Tumoren mit der Größe $T \geq 4$ verwendet. In unserer Studie ist diese Gruppe nicht enthalten. Hier zeigt sich die Infektion mit dem HP-Virus als prognostisch günstig.

5.2 Nekrose bei HPV-assoziierten OPSCC

Nekrosen sind Ausdruck eines pathologischen Zelluntergangs in Folge einer Zellschädigung. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt der Zelluntergang durch die Störung des Ablaufs von biochemischen Reaktionen. Es kommt zu zytotoxischen Prozessen und in der Folge bilden sich Nekrosen (Beasley et al. 2001). Dementsprechend finden sich Nekrosen häufiger in großen Tumoren, da dort die Sauerstoffversorgung durch schnelles Tumorwachstum nicht adäquat gewährleistet ist. Bei Hypoxie wird über die Stabilisierung des HIF-1 α Proteins der Hypoxie-Signalweg aktiviert und in der Konsequenz werden die Zielproteine durch die Zelle produziert. Hierzu zählt in Tumoren die CA9. Sie wird in ischämischen Arealen zur pH-Kontrolle exprimiert (Sedlakova et al. 2014). In unserer Studie wiesen Tumore mit Nekrose eine größere mit CA9-gefärbte Tumorfläche auf. Das Auftreten von Nekrose als Folge einer Sauerstoffarmut (Kapitel 1.3.2, Abbildung 2) könnte die vermehrte CA9-Expression in nekrotischen Tumoren erklären. Auch Beasley et al. fand in ihrer Untersuchung 2001 eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Nekrosen und der immunhistochemischen CA9-Expression bei Tumorproben von HNSCC. Zudem stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass die immunhistochemische CA9-Expression vor allem in perinekrotischen Arealen auftritt. Ou et al. fanden in ihrer Untersuchung 2018 hingegen keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Nekrose und der CA9-Expression. Im Unterschied zu unserem Studiendesign untersuchten Ou et al. HNSCC welche zuvor mittels Kombinationen aus Chemo- und Strahlentherapie sowie Antikörper- (Cetuximab) und Strahlentherapie behandelt wurden. Diese Vorbehandlung könnte Einfluss auf die

Expression von CA9 und das Auftreten von Nekrosen haben, und somit die Vergleichbarkeit zu unserem Ergebnis beeinflussen.

Bei den HPV-assoziierten Tumorproben unserer Studienkohorte fanden sich häufiger Nekrosen. Der Zusammenhang des Auftretens von Nekrosen und dem HPV-Status bei OPSCC wurde bisher noch nicht untersucht. HPV-positive Tumore werden als schlechter differenzierte Tumore im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren beschrieben (Dok und Nuyts 2016; Gillison et al. 2000; Fakhry und Gillison 2006). Durch undifferenziertes Tumorgewebe könnten die normalen Regulationskreisläufe für geordnetes und kontrolliertes Wachstum gestört sein, hierdurch könnte die Bildung der Blutgefäße innerhalb des Tumors beeinträchtigt werden. Somit entsteht ein Ungleichgewicht von Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf mit konsekutiver Ausbildung von Nekrosen. Durch die schlechte Differenzierung der HPV-positiven Tumore könnte hier ein Zusammenhang zu dem vermehrten Auftreten von Nekrosen erklärt werden. Ein anderer Grund für das Auftreten von Nekrosen in HPV-assoziierten OPSCC könnte durch das Immunsystem bedingt sein. Krupar et al. fanden 2014 in ihren Untersuchungen eine stärkere Immunreaktion gegen den HPV-positiven Tumor. Ergänzend zeigten Wagner et al. ebenfalls eine veränderte Immunantwort bei HPV-positiven OPSCC. Durch eine Reaktion gegen den HPV-positiven Tumor könnte dessen Wachstum beeinträchtigt werden. Ein vermehrter Zelluntergang innerhalb des Tumors mit der Ausbildung von Nekrosen, könnte so erklärt werden (Göttgens et al. 2018). Die vermehrten Nekrosen bei HPV-assoziierten OPSCC könnten ein Ausdruck schnellen Tumorwachstums sein. In der logischen Konsequenz müssten HPV-positive Tumore vorwiegend in einem höheren T-Stadium zu finden sein. Obwohl es vereinzelte Studien gibt, die HPV-assoziierte Tumore mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium in Verbindung bringen (Fakhry und Gillison 2006), wird dies allgemein nicht angenommen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung präsentieren sich HPV-positive OPSCC im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC meist in einem niedrigen T-Stadium mit höherem N-Stadium (Arenz et al. 2014; Wagner et al. 2017). Dies könnte bei HPV-assoziierten Tumoren auf die Stabilisation des HIF-Komplexes zurückgeführt werden. Nakamura et al. zeigten 2009 eine Aktivierung der Zielgene von HIF-1 α , darunter Gene für CA9 und VEGF, in HPV-positiven Zelllinien. Hierdurch könnte der HPV-positive Tumor eine erhöhte Stoffwechselrate mit einem erweiterten Angebot an Baustoffen erlangen. Resultieren könnte eine gesteigerte Tumorphiliferation mit höherer Metastasierungsrate.

Am Beispiel des kolorektalen Karzinoms wurde Nekrose bereits als schlechter prognostischer Faktor identifiziert (Väyrynen et al. 2016). Ou et al. zeigten wiederum

keine Korrelation für Nekrose als Prognosefaktor in HNSCC-Tumorproben. Dies wird auf eine kleine Tumorprobe und nicht die Untersuchung des gesamten Tumors zurückgeführt. In unserer Studie zeigte sich für Patienten mit nekrotischen Tumoren ebenfalls kein Unterschied bei der Überlebensanalyse.

Zusammenfassend könnte das Immunsystem, der Grad der Differenzierung oder die metabolische Aktivierung bei HPV-assoziierten OPSCC für das vermehrte Vorhandensein von Nekrosen verantwortlich sein.

5.3 Höheres Hypoxielevel bei HPV-positiven OPSCC

In dieser Studie zeigte sich bei HPV-positiven Tumorproben viel mit CA9-gefärbte Tumorphläche in Kombination mit Nekrosen. Die immunhistochemische CA9-Färbung gilt als Nachweis hypoxisch/ischämisch/nekrotischer Areale im Tumor. Ergänzend wurden die Nekrosen als Hinweis auf eine Hypoxie bestimmt (Beasley et al. 2001). Der Nachweis dieser beiden Hypoxiemarker in HPV-assoziierten OPSCC zeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein hypoxischer Tumor abgebildet wird. Es lässt sich für HPV-assoziierte OPSCC unseres Studienkollektives auf ein immunhistochemisch bestimmtes, hohes Hypoxielevel schließen. Dem gegenüber stehen die Forschungsergebnisse von Hanns et al. welche HPV-positive Tumoren mit weniger Hypoxie in Verbindung bringen. Nach aktueller Forschung sind HNSCC generell als hypoxische Tumoren zu werten. Es finden sich wenig Studiengruppen die spezifisch den HPV-positiven Tumor als hypoxisch beschreiben. Trinkhaus et al. konnten 2014 mittels ¹⁸F-misonidazole PET ein vergleichbares Level an Hypoxie in HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren nachweisen. Die Verteilung und Menge an Hypoxie wird auch von anderen Forschungsgruppen als gleichförmig beschrieben (Toustrup et al. 2011). Zieht man diese Erkenntnisse in Betracht, sollte man diskutieren, wieso sich in unserer Studie die HPV-positiven OPSCC mit „mehr“ Hypoxie assoziiert zeigen. Man sollte erwägen, dass das in dieser Studie abgebildete hohe Hypoxielevel für die HPV-positiven OPSCC kein Ausdruck einer Hypoxie ist. Vielmehr könnte der HPV-assoziierte Tumor aufgrund molekularer Veränderungen, ohne einen tatsächlichen Mangel an Sauerstoff, vermehrt Hypoxiemarker (wie CA9) exprimieren. Dies würde, laut unserer Arbeitshypothese, über die Stabilisation von HIF-1 α trotz der Anwesenheit von Sauerstoff in HPV-positiven OPSCC geschehen, mit der konsekutiven Expression der Zielproteine (CA9).

Ein weiterer Hinweis auf eine unterschiedliche Tumorbilogie der HPV-assoziierten OPSCC ist das deutlich bessere Ansprechen auf Strahlentherapie. Vor allem fortgeschrittene Stadien der HNSCC werden mit einer Tumorphypoxie assoziiert

(Nordsmark et al. 2005). Tumorphypoxie ist im Allgemeinen mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet (Bandurska-Luque et al. 2018; Nordsmark et al. 2005; Roh et al. 2009; Brizel et al. 1997). Durch Hypoxie wird die Effizienz einer Strahlentherapie in der Regel deutlich reduziert. Es werden weniger Radikale gebildet, so dass eine höhere Strahlendosis für vergleichbare Resultate nötig ist. Nichts desto trotz zeigen HPV-assoziierte OPSCC ein besseres Ansprechen auf Strahlentherapie. Göttgens et al. führen das bessere Ansprechen der HPV-positiven Zellen auf Strahlentherapie auf das vermehrte Antreffen von Immunzellen bei HPV-positiven Tumoren zurück. Mayer et al. fanden eine gewisse Fähigkeit der Tumorentität, bestimmte Regulatorproteine nach der Bestrahlung zu reaktivieren und somit ein besseres Therapieansprechen an den Tag zu legen. Arenz et al. führten das bessere Ansprechen auf eine veränderte Zellzyklusregulation mit beeinträchtigten DNA-Reparaturmechanismen zurück. Zusammenfassend begründet sich die bessere Prognose der Patienten mit HPV-positiven Tumoren mitunter an dem besseren Ansprechen auf Strahlentherapie, die konkreten Gründe hierfür sind jedoch nicht abschließend untersucht.

5.4 Validität der CA9 als endogener Hypoxiemarker

Die Verwendung des CA9-Proteins als endogener Hypoxiemarker ist ein stark diskutiertes Thema. Le et al. fanden 2007 keine Korrelation der CA9-Expression mit dem Sauerstoffgehalt in Tumorproben von HNSCC. Troost et al. untersuchten den Zusammenhang der CA9 zu Hypoxie in drei HNSCC Zelllinien. In ihrer Schlussfolgerung sehen sie die Verwendung der CA9 als Hypoxiemarker als fragwürdig an. Bei der Untersuchung von Tumorproben von Zervixkarzinomen kamen Mayer et al. 2005 und Ellingsen et al. 2015 zu dem Schluss, die CA9 sei kein valider endogener Hypoxiemarker. Shin et al. kamen im Gegensatz dazu zu dem Schluss, die CA9 sei ein valider Hypoxiemarker. Die Frage bleibt weiter bestehen, ob die Verwendung des CA9-Proteins als Hypoxiemarker gerechtfertigt ist oder nicht. Für unsere Experimente wurde die CA9 als Zielprotein des HIF-Komplexes herangezogen unter der Annahme, dass sie vor allem in hypoxischen Tumorbezirken, durch die Aktivierung und Stabilisation von HIF-1 α exprimiert wird. In unserer Studie zeigten sich die Tumorproben mit Nekrose, mit einem höheren IRS, sprich einer starken und intensiven CA9-Färbung assoziiert. Dies stützt unsere Annahme, dass die CA9 in hypoxischen Tumorbezirken in starkem Maße exprimiert wird. Natürlich wird in dieser Studie vom Grad der Hypoxie nur indirekt ausgegangen, da dieser nicht direkt gemessen wurde. Jedoch sehen wir auf Grundlage dieser Arbeit, in Zusammenschau der verschiedenen Marker, zumindest für die HPV-negativen OPSCC, die CA9 als validen Hypoxiemarker an.

5.5 CA9, ein Metabolismus-assoziiierter Marker bei HPV-positiven Tumoren

Bei HPV-assoziierten Tumoren schließen wir durch die vermehrte Expression des Hypoxiemarkers CA9 und dem Auftreten von Nekrose auf ein hohes Hypoxielevel. Um zu untersuchen, ob das hohe Hypoxielevel eine tatsächliche Hypoxie widerspiegelt, wurde ein Vergleich der Marker an unterschiedlich großen Primärtumoren durchgeführt. Je größer ein Tumor wird, desto hypoxischer ist er (Vanchanagiri et al. 2018). Das heißt man würde bei kleinen Tumoren weniger mit CA9-gefärbte Tumorfläche und weniger Nekrose erwarten als bei großen Tumoren. In der Tat konnte dies in dieser Studie für die HPV-negativen Fälle nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich streng genommen kein signifikantes Ergebnis, was auf die kleine Fallzahl zurückgeführt werden könnte. Passend zu unserem Ergebnis konnten Baesley et al. im Jahr 2001 in einer von HPV-unabhängigen Studie ebenfalls mehr CA9-Expression in höheren Tumorstadien nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden Pinheiro et al. 2015 die CA9-Expression mit einer kleinen Tumorgroße assoziiert. Dieser Unterschied könnte daher rühren, dass sie Tumorproben von Adenokarzinomen der Zervix untersuchten, welche wiederum andere molekulargenetische Merkmale als Plattenepithelkarzinome aufweisen. Interessanterweise präsentierten in unserer Studie die HPV-positiven Tumoren keinen Unterschied in der Verteilung der CA9-Färbung in Abhängigkeit zur Tumorgroße. Das deutet wiederum auf einen unterschiedlichen Tumormetabolismus bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC hin, welcher bereits in der Literatur beschrieben ist (Krupar et al. 2014). Knuth et al. konnten 2017 die vermehrte Expression des HIF-1 α Proteins bei HPV-positiven HNSCC zeigen. In der Folge der HIF-1 α Stabilisierung resultiert eine vermehrte Expression des Hypoxiemarkers CA9. Dies könnte bei HPV-positiven Tumoren zu der beschriebenen gleichförmigen Expression der CA9 in allen Tumorgroßen führen.

Zur genaueren Analyse der CA9-Expression, wurden spezifische Expressionsmuster, wie ein CA9-Hypoxiemuster und eine uniforme CA9-Verteilung beurteilt. Dies wurde in dieser Form bis jetzt noch nicht durchgeführt. Es finden sich jedoch zahlreiche Studien, in denen die CA9-Expression anhand der Prozentzahl positiv gefärbten Zellen ausgewertet wird (Choi et al. 2008; Eckert et al. 2010; Kim et al. 2007b; Kondo et al. 2011; Roh et al. 2009). Eine positive CA9-Färbung wurde bereits als streng perinekrotisch beschrieben (Baesley et al. 2001). Interessanterweise trat das Hypoxiemuster in unseren Untersuchungen HPV-unabhängig auf. Das bedeutet, dass das Muster sowohl in HPV-positiven als auch HPV-negativen Tumorproben auftritt und keiner dieser beiden Kategorien exklusiv zugeteilt werden kann. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Trinkhaus et al. die widererwarten bei p16-positiven und p16-negativen OPSCC eine gleichmäßige Verteilung von Hypoxie beschreiben.

Toustrup et al. klassifizierten Tumorproben von HNSCC in „wenig“ und „stark“ hypoxische Tumore. Hierbei zeigten sich die HPV-positiven und HPV-negativen Tumore gleichmäßig aufgeteilt in beiden Gruppen. Ausgehend von unserer Arbeitshypothese hätten wir eine Korrelation des CA9-Hypoxiemusters mit den HPV-negativen Tumorproben erwartet. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, so dass sich auf eine metabolische Veränderung des HPV-assoziierten Tumors schließen lässt.

Auch die CA9-Färbeintensität wurde bestimmt, um über die Expressionsstärke ggf. Aufschluss über die Regulation des HP-Virus zu erlangen. Sie wurde zwar in manchen Arbeiten beschrieben (Kim et al. 2007b) und in anderen in einem IRS verrechnet weiterverwendet (Eckert et al. 2010), jedoch wurde die CA9-Färbeintensität als alleinstehendes Merkmal wenig mit dem HPV-Status eines Tumors verglichen. In unserer Studie zeigte sich ein Zusammenhang von HPV-assoziierten Tumoren zu einer hohen CA9-Färbeintensität. Es wird angenommen, dass die CA9-Intensität ein Ausdruck der Induktion von CA9 durch das HP-Virus ist, weil sich bei HPV-positiven im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC durchweg und unabhängig von der Tumorgroße eine stärkere CA9-Färbeintensität findet.

Es zeigte sich trotz verschiedener Tumorgroßen eine gleichförmige Verteilung der CA9-Färbung bei HPV-assoziierten OPSCC. Das CA9-Hypoxiemuster ließ sich nicht, wie erwartet den HPV-negativen OPSCC zuordnen, sondern trat ebenso bei den HPV-positiven Tumorproben auf. Außerdem zeigen HPV-positive OPSCC eine starke CA9-Färbeintensität. Dies sind Beispiele, warum man in Betracht ziehen sollte, dass die CA9-Expression in dieser Studie bei HPV-assoziierten Tumorproben unabhängig vom Grad der Hypoxie auftritt. Eine Vermutung ist, dass die Hypoxiemarker im Sinne einer HPV-induzierten Signalwegsaktivierung, durch einen veränderten Regulationskreislauf exprimiert werden. Die CA9-Expression könnte in unserer Studie vielmehr durch HPV-gesteuert sein, die CA9 würde in diesen Fällen sozusagen einen Metabolismus-assoziierten Marker repräsentieren. Für die HPV-negativen OPSCC gehen wir aufgrund den Ergebnissen dieser Studie von einer Hypoxie abhängigen Expression der CA9 aus.

Nimmt man an, die CA9-Expression sei in HPV-positiven OPSCC ein Metabolismus-assoziiierter Marker, sollte dieser Tumor das uniforme CA9-Muster aufweisen. Wir konnten für das uniforme Muster keine Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen HPV-positiven und -negativen OPSCC finden. Rademarkers et al. teilten 2013 ihre CA9-Färbung in eine perinekrotische und eine diffuse Färbung ein. Das diffuse Muster assoziierten sie mit einer besseren Prognose. Entsprechend legten sie dem CA9-diffus verteilten Tumor eine andere biologische

Grundlage zugrunde. In unserer Studie wurde streng nur die membranständige Färbung der CA9-Proteinexpression gewertet. Vielleicht müsste man in zukünftigen Experimenten die Kriterien zum Einschluss in das uniforme Muster ändern, um dieses Muster mit dem HPV-positiven Tumor in Verbindung bringen zu können. Es bedarf noch weiterer Experimenten, vor allem mit höherer Fallzahl, um die molekularen Grundlagen im Hinblick auf eine mögliche HPV-induzierte Hypoxie gänzlich zu verstehen.

5.6 Das CA9-Hypoxiemuster als negativer prognostischer Marker

Anhand der Überlebensanalyse in Bezug zum CA9-Hypoxiemuster zeigt sich für die Patienten mit HPV-negativen im Vergleich zu HPV-positiven OPSCC ein schlechteres Überleben. Für Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren zeigte sich, ob Hypoxiemuster oder nicht, kein Unterschied im Gesamtüberleben. Dies lässt erneut für HPV-positive Tumore eine andere Biologie vermuten. Bei dieser Analyse sollte man die generell bessere Prognose für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC aufführen. Wenige Patienten mit HPV-positiven OPSCC versterben, so dass die statistische Aussagekraft für diese Gruppe gering ist. Das Hypoxiemuster lässt sich somit lediglich für HPV-negative Tumore als schlechter prognostischer Marker beschreiben.

Zudem zeigte sich das CA9-Hypoxiemuster mit höherem UICC-Stadium assoziiert. Die Einteilung in UICC-Stadien beruht auf der Einteilung nach dem TNM-System. Das UICC-Stadium IV ist aufgrund der Auswahlkriterien für dieses Kollektiv in unserer Studie nicht enthalten. Dennoch zeigt in unserer Studie das CA9-Hypoxiemuster eine weiter fortgeschrittene Erkrankung an, da es sich mit dem höheren UICC-Stadium III in Verbindung bringen lässt. Je weiter fortgeschritten eine Erkrankung ist, desto schlechter ist in der Regel auch die Prognose. Das bedeutet, dass das CA9-Hypoxiemuster mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden kann. Die CA9-Färbung wurde bereits in mehreren Studien mit einer schlechten Prognose assoziiert (Rademakers et al. 2013; Pérez-Sayáns et al. 2013). Unsere Aussage stützt den negativ prognostischen Wert der CA9-Färbung. Mittels eines größeren Kollektivs, mit darin enthaltenen UICC-IV Stadien, könnte diese Aussage validiert werden.

5.7 Erhöhte CA9-Expression bei HPV-positiven Zelllinien

Zusammenfassend zeigte sich in unserer Studie eine unterschiedliche Reaktion von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien auf eine Sauerstoffarmut. HPV-positive Zelllinien zeigen unter hypoxischen Verhältnissen eine höhere CA9-Expression als HPV-negative Zelllinien. Dies lässt auf einen veränderten und unterschiedlichen Tumormetabolismus, ausgelöst durch das HP-Virus schließen.

Die Vermutung, dass das HP-Virus über seine Onkogene E6 und E7 den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1 α) stabilisiert, ist in der Literatur bereits aufgezeigt (Nakamura et al. 2009; Rodolico et al. 2011, Knuth et al. 2017). Auch die in unserer Studie erlangten Ergebnisse sprechen indirekt für eine mögliche Stabilisierung von HIF-1 α durch das HP-Virus. Somit könnte sich die vermehrte CA9-Expression erklären, da CA9 als Zielprotein von HIF-1 α nach dessen Stabilisierung exprimiert wird (Sedlakova et al. 2014). Anhand unserer Ergebnisse des Zelllinienversuchs bestätigt sich diese Theorie. Unter hypoxischen Bedingungen zeigten alle Zelllinien einen Anstieg in der CA9-Proteinexpression, was auf einen funktionierenden Hypoxie-Signalweg schließen lässt. Jedoch zeigten die HPV-positiven Zelllinien einen stärkeren CA9-Anstieg als die HPV-negativen Zelllinien, was die Stabilisierung von HIF-1 α und die vermehrte Transkription der entsprechenden Zielgene (speziell CA9) bei HPV-assoziierten Zelllinien nahelegt. Unterstützend fand Knuth et al. in ihrer Arbeit erhöhte HIF-1 α Werte sogar unter normoxischen Bedingungen bei HPV-positiven Tumoren. Dies zeigt die besondere Bedeutung des HPV-positiven Tumorregulationskreislafs. Die CA9-Überexpression des HPV-positiven Tumors könnte durch eine bessere pH-Wert Regulation einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen darstellen. Ebenso könnte ein Zusammenhang zwischen der frühen Metastasierung der HPV-positiven Tumore und der hohen CA9-Expression bestehen. Eine hohe Menge an CA9 im Tumor könnte, durch eine optimale pH-Regulation, die Zellmigration und Invasion, welche zur späteren Metastasierung führt vereinfachen (Pastorek et al. 2015).

Die CA9 könnte ein zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkt in HPV-positiven OPSCC sein. Die Entwicklung von molekularen Inhibitoren und monoklonaler Antikörpertherapien bezüglich der CA9 ist derzeit Gegenstand klinischer Studien (Neri und Supuran 2011). Die tumorspezifische Expression der CA9 ist der entscheidende Vorteil einer CA9-gerichteten Therapie. Drenckhan et al. zeigten an Karzinomzellen des Ösophagus die effiziente Blockade der CA9 durch spezifische CA9-Blocker. Hierdurch konnte das Tumorwachstum eingedämmt werden. In Kombination mit einer Chemo- oder Strahlentherapie könnten potentielle gezielte CA9-Inhibitoren eine effizientere Therapie darstellen (McDonald et al. 2012).

5.8 Alternative CA9-Expressionswege

Knuth et al. konnten 2017 einen erhöhten HIF-1 α Proteinspiegel bei HPV-assoziierten Zelllinien unter normoxischen Bedingungen zeigen. In der Folge könnte in HPV-assoziierten Tumoren eine erhöhte, von Hypoxie unabhängige CA9-Expression, zur Regulation des Säure-Basen-Haushaltes erklärt werden. Dem gegenübergesetzt

zeigte sich bei der Untersuchung der Proteinexpression der CA9 in HNSCC Zelllinien in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede im Grundlevel (HPV-positive Zelllinien zu HPV-negativen Zelllinien im t-Test $p=0,687$). Somit kann man auf keine HPV-bedingte Induktion der CA9 unter Normoxie in diesem Zellkulturmodell schließen.

Es gilt zu beachten, dass in unserer Studie von der Expression von HIF-1 α im Tumorprobenmaterial nur theoretisch und indirekt ausgegangen werden kann. Man sollte ebenfalls einen alternativen CA9-Expressions- und Regulationskreislauf in Erwägung ziehen.

Diesbezüglich ist die Expression der CA9 durch eine hohe Zelldichte im Tumor beschrieben (Mayer et al. 2005). Hierzu finden sich mehrere Studien, bei welchen eine erhöhte CA9-Expression sogar unter normoxischen Bedingungen beobachtet wird. Die Expression ist hier bedingt durch eine, die Zelle umgebende Sauerstoffarmut, welche bei hoher Zelldichte auftritt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der CA9-Expression über den phosphatidylinositol-3-kinase Regulationskreislauf (Kaluz et al. 2002; Kopacek et al. 2005). Somit könnte ein HPV-positiver Tumor auch unabhängig einer Hypoxie und unabhängig des HIF-Komplexes, das Regulatorprotein CA9 exprimieren. Panisova et al. konnten unabhängig einer Hypoxie die Stabilisation von HIF-1 α durch Laktat zeigen und somit in stoffwechselaktiven Tumoren die Stimulation der CA9-Expression. Andere Autoren beschreiben den *oral cavity cancer*, als hyperglykolytischen Tumortyp, mit konsekutiver vermehrter Expression der hyperglykolytischen Proteine und CA9 im Tumorgewebe (Simões-Sousa et al. 2016).

Dies sind nur einige Beispiele alternativer CA9-Expressionswege. In der Literatur ist jedoch der Weg über die Stabilisierung von HIF-1 α am häufigsten und als Hauptregulationsweg der CA9-Expression beschrieben. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie nehmen wir an, dass die CA9 über die Stabilisierung von HIF-1 α exprimiert wird. Der HP-Virus spielt hier eine entscheidende Rolle. Seine Onkoproteine könnten die Expression der CA9 beeinflussen, so dass der HPV-positive Tumor mehr CA9, als Zielprotein von HIF-1 α exprimieren könnte. Dies könnte einen Ansatzpunkt für ein mögliches HPV-spezifisches Therapiekonzept darstellen.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gehören zu den sechst häufigsten malignen Erkrankungen und die Inzidenz oropharyngealer Plattenepithelkarzinome (OPSCC) ist ansteigend. Alkohol- sowie Nikotinkonsum oder eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) werden mit der Erkrankung assoziiert. HPV-assoziierte Tumore treten vor allem im Oropharynx auf und grenzen sich als eigene Tumorentität ab. Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren haben eine deutlich bessere Prognose.

Durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 wird bei HPV-assoziierten OPSCC der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1 α stabilisiert und die Transkription entsprechender Zielgene eingeleitet. Die tumorspezifische Carboanhydrase 9 (CA9) ist für die Regulation des pH-Wertes zuständig. Sie wird als endogener Hypoxiemarker beschrieben, da sie als Konsequenz der HIF-1 α Aktivierung bei sinkenden Sauerstoffkonzentrationen exprimiert wird. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits die Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs in HPV-assoziierten HNSCC gezeigt werden (Knuth et al. 2017).

In dieser Arbeit wurden Unterschiede von HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC am Beispiel des endogenen Hypoxiemarkers CA9 untersucht, insbesondere im Hinblick auf eine Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs. Die Expression der CA9 wurde immunhistochemisch an 74 Tumorproben von HPV-positiven und -negativen OPSCC untersucht. **HPV-positive OPSCC zeigten eine intensivere CA9-Färbung, die unabhängig von der Tumorgröße auftrat. Zudem zeigte sich eine Assoziation des HPV-positiven Tumors mit Nekrose. Das lichtmikroskopisch bestimmte CA9 „uniforme“ Färbemuster konnte, entgegen der Annahme, nicht dem HPV-positiven Tumor zugeordnet werden. Schlussfolgernd sollte die CA9 in HPV-positiven OPSCC als HPV- und Metabolismus-assoziiierter Marker, von einem Hypoxiemarker abgegrenzt werden. Die Verwendung als Hypoxiemarker in HPV-negativen OPSCC kann diskutiert werden.** Das CA9-Hypoxiemuster zeigte sich als Parameter für ein schlechteres Überleben der Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Nach chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs mittels DFO zeigte sich bei HPV-positiven Zelllinien eine stärkere CA9-Expression als bei HPV-negativen Zelllinien. Es besteht für HPV-positive Tumore die Annahme einer veränderten molekularen Regulation, im Sinne einer vermehrten Aktivierung der Hypoxiekaskade.

Mit dieser Arbeit konnte die prognostische Relevanz der CA9 als endogener Hypoxiemarker, durch die Korrelation mit klinischen Faktoren, näher untersucht werden. In HPV-positiven OPSCC konnte eine veränderte Expression der CA9 gezeigt werden, was als potentieller therapeutischer Ansatzpunkt dieser spezifischen Tumorentität dienen könnte.

7 Abstract

Squamous cell carcinoma of the head and neck is one of the six most frequent malignancies. Alcohol and nicotine abuse or the infection with HPV is associated with this disease. HPV-associated tumors are mainly located in the oropharynx and form a separate tumor entity. Incidence of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) is increasing. The prognosis for patients with HPV-associated OPSCC is significantly better compared to HPV-negative tumors. In HPV-associated OPSCC the viral oncoproteins E6 and E7 stabilize the hypoxia-induced factor HIF-1 α and initiate transcription of the target genes. Tumor specific carbonic anhydrase 9 (CA9), is responsible for the regulation of the pH value and is described as an endogenous hypoxia marker. Its expression is regulated via HIF-1 α in areas with decreasing oxygen concentrations.

Previous work of this research group has shown activation of the hypoxia pathway in HPV-positive HNSCC (Knuth et al. 2017). This work examines the differences of HPV-associated and HPV-negative OPSCC based on the expression of the endogenous hypoxia marker CA9, particularly with regard to a hypoxia pathway activation.

Expression of CA9 was evaluated on 74 immunohistochemically stained tumor samples from HPV-positive and HPV-negative OPSCC. In conclusion, HPV-positive tumors showed a higher CA9 staining intensity, that occurred independently of tumor size. Additionally an association of the HPV-positive OPSCC with necrosis was shown. Contrary to our expectation the microscopically determined “uniforme” staining pattern did not match with the HPV-positive tumor. Summarizing, in HPV-positive OPSCC the CA9 enzyme presents more as a metabolism-associated marker than as a marker for hypoxia. Using CA9 in HPV-negative OPSCC as a marker of hypoxia can be discussed. CA9 hypoxia pattern showed as a predictor for poorer survival in HPV-negative OPSCC. After chemical activation of the hypoxia pathway via DFO HPV-positive cell lines showed stronger CA9 expression than HPV-negative cell lines. For HPV-positive OPSCC, there is an assumed change in molecular regulation, especially regarding the activation of the hypoxia pathway.

This study was able to illuminate the prognostic relevance of CA9 as an endogenous hypoxia marker. We showed a changed CA9 expression in HPV-positive OPSCC which could be a potential target for tumor specific therapy of that tumor entity.

8 Abkürzungsverzeichnis

CA9	Carboanhydrase 9
CUP	cancer of unknown origin
DFO	Deferoxamine
EGFR	Epithelial Growth Factor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
FFPE	Formalin-fixiert in Paraffin-eingebettet
GLUT-1	Glukosetransporter 1
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
HR-Typen	High risk Typen
HRP	horseradish peroxidase
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IRS	Immunoreactive Score
kDA	Kilo Dalton
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LR-Typen	Low risk Typen
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
OPSCC	Oropharyngeale Plattenepithelkarzinome
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pRb	Retinoblastom-Protein
PHD	Prolyl-Hydroxylase
VEGF	Vascular epithelial Growth factor
VHL	Von-Hippel-Lindau Protein

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: HIF-1 α Signalweg bei Normoxie und Hypoxie und unter dem Einfluss von HPV.
- Abb. 2: Zusammenhang von Hypoxie und der Ausbildung von Nekrosen und der CA9-Expression.
- Abb. 3: Reversible durch CA9 katalysierte Reaktion.
- Abb. 4: Aufteilung des Patientenkollektives.
- Abb. 5: Gesamtüberleben des Patientenkollektives von 74 Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit des HPV-Status.
- Abb. 6: Überleben der Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit des N-Status nach Kaplan-Meier.
- Abb. 7: Überleben der Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit der Tumorgroße und des HPV-Status nach Kaplan-Meier.
- Abb. 8: Darstellung der immunhistochemischen Färbung der CA9-Expression.
- Abb. 9: Darstellung der CA9-Färbeintensitäten.
- Abb.10: Häufigkeitsverteilung von starker und schwacher Färbeintensität der CA9- Färbung bei HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC (n=74).
- Abb. 11: IRS bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.
- Abb.12: Häufigkeitsverteilung des niedrigen und hohen IRS und dem Auftreten von Nekrosen (n=74).
- Abb. 13: Häufigkeitsverteilung der CA9-Positivität (gefärbte Tumorfläche) in Bezug zur Tumorgroße für HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC.
- Abb. 14: Darstellung der immunhistochemischen Färbemuster.
- Abb. 15: Häufigkeitsverteilung des Auftretens eines CA9-Hypoxiemusters bei Tumoren mit und ohne Nekrose und bei HPV- und HPV+ OPSCC (n=74).
- Abb. 16: Überlebensprofile für das CA9-Hypoxiemuster bei HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC.
- Abb. 17: Zusammenhang zwischen HPV-Status, Nekrose und CA9-Färbung in der IHC-Färbung (n=74).
- Abb. 18: Kombinierte Auswertung der CA9-Expression und dem Auftreten von Nekrosen bei HPV+ und HPV- OPSCC (n=74).
- Abb. 19: Verteilung des CA9-Hypoxiemusters und der Hypoxiemarker (Nekrose und CA9-Positivität).
- Abb. 20: Überlebensprofil stratifiziert nach dem Vorhandensein von Nekrose im Tumor.
- Abb. 21: Grundlevel der CA9-Proteinexpression.

- Abb. 22: CA9-Proteinexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten von HPV- positiven und HPV-negativen HNSCC- Zelllinien unter Inkubation mit DFO.
- Abb. 23: Stärkere CA-Expression nach Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs durch DFO bei HPV-positiven HNSCC Zelllinien.

10 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: 7.Version der TNM-Klassifikation für p16-positive Oropharynxkarzinome nach Wittekind (2010)
- Tabelle 2: UICC-Stadien der Oropharynxkarzinome 7. Auflage (2010)
- Tabelle 3: UICC-Klassifikation der p16-positiven Oropharynxkarzinome, 8. Version (2017) nach www.uicc.org
- Tabelle 4: Aufbau der CA9
- Tabelle 5: Klinische und pathologische Patientenmerkmale sowie Risikofaktoren anhand des HPV-Status
- Tabelle 6: Material – Zelllinien
- Tabelle 7: Material – Chemikalien/ Reagenzien/ Kit, Antikörper, Geräte
- Tabelle 8: Material – Lösungen/ Puffer, Software
- Tabelle 9: 2-, 5 und 10-Jahres Überlebensraten für klinisch-pathologische Faktoren und Tumorcharakteristika
- Tabelle 10: *Immunoreactive Score (IRS)*, (A) Zusammensetzung des IRS (B) Verteilung der Punktwerte
- Tabelle 11: Häufigkeitsverteilungen für das Hypoxiemuster

11 Literaturverzeichnis

Airley (2001): Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (Vol.7), S. 928–934.

Amini, Arya; Jasem, Jagar; Jones, Bernard L.; Robin, Tyler P.; McDermott, Jessica D.; Bhatia, Shilpa et al. (2016): Predictors of overall survival in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using the National Cancer Data Base. In: *Oral oncology* 56, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2016.02.011.

Ang, K. Kian; Harris, Jonathan; Wheeler, Richard; Weber, Randal; Rosenthal, David I.; Nguyen-Tân, Phuc Felix et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. In: *The New England journal of medicine* 363 (1), S. 24–35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.

Arenz, Andrea; Ziemann, Frank; Mayer, Christina; Wittig, Andrea; Dreffke, Kirstin; Preising, Stefanie et al. (2014): Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 190 (9), S. 839–846. DOI: 10.1007/s00066-014-0605-5.

Aumüller, Gerhard (2010): Anatomie. 208 Tabellen ; [mit DVD zum Präp.-Kurs]. 2.überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Bacon, Andrea L.; Harris, Adrian L. (2004): Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. In: *Annals of medicine* 36 (7), S. 530–539. DOI: 10.1080/07853890410018231.

Bandurska-Luque, Anna; Löck, Steffen; Haase, Robert; Richter, Christian; Zöphel, Klaus; Abolmaali, Nasreddin et al. (2019): FMISO-PET-based lymph node hypoxia adds to the prognostic value of tumor only hypoxia in HNSCC patients. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 130, S. 97–103. DOI: 10.1016/j.radonc.2018.09.008.

Bardos, Julia I.; Ashcroft, Margaret (2005): Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. In: *Biochimica et biophysica acta* 1755 (2), S. 107–120. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.05.001.

Beasley, Nigel J.P.; Wykoff, Charles C.; Watson, Peter H.; et al. (2001): Carbonic Anhydrase IX, an Endogenous Hypoxia Marker, Expression in Head and Neck

11. Literaturverzeichnis

Squamous Cell Carcinoma and its Relationship to Hypoxia, Necrosis, and Microvessel Density. In: *Cancer research* (Vol. 61, No. 13), p. 5262-5267.

Benej, Martin; Pastorekova, Silvia; Pastorek, Jaromir (2014): Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. In: *Sub-cellular biochemistry* 75, S. 199–219. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_11.

Benson, Eleni; Li, Ryan; Eisele, David; Fakhry, Carole (2014): The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. In: *Oral oncology* 50 (6), S. 565–574. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.008.

Bodily, Jason; Laimins, Laimonis A. (2011): Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. In: *Trends in microbiology* 19 (1), S. 33–39. DOI: 10.1016/j.tim.2010.10.002.

Boyer, S. N.; Wazer, D. E.; Band, V. (1996): E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Cancer research* 56 (20), S. 4620–4624.

Brenner, J. Chad; Graham, Martin P.; Kumar, Bhavna; Saunders, Lindsay M.; Kupfer, Robbi; Lyons, Robert H. et al. (2010): Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Head & neck* 32 (4), S. 417–426. DOI: 10.1002/hed.21198.

Brizel, D. M.; Sibley, G. S.; Prosnitz, L. R.; Scher, R. L.; Dewhirst, M. W. (1997): Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 38 (2), S. 285–289.

Chen, W.; Li, F.; Mead, L.; White, H.; Walker, J.; Ingram, D. A.; Roman, A. (2007): Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior. In: *Virology* 367 (1), S. 168–174. DOI: 10.1016/j.virol.2007.05.030.

Choi, Sung-Weon; Kim, Joo-Young; Park, Joo-Yong; Cha, In-Ho; Kim, Jin; Lee, Sun (2008): Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognosis in surgically treated oral squamous cell carcinoma. In: *Human pathology* 39 (9), S. 1317–1322. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.10.026.

Dok, Rüveyda; Nuyts, Sandra (2016): HPV Positive Head and Neck Cancers. Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. In: *Cancers* 8 (4). DOI: 10.3390/cancers8040041.

Drenckhan, Astrid; Freytag, Morton; Supuran, Claudiu T.; Sauter, Guido; Izbicki, Jakob R.; Gros, Stephanie J. (2018): CAIX furthers tumour progression in the hypoxic tumour

microenvironment of esophageal carcinoma and is a possible therapeutic target. In: *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 33 (1), S. 1024–1033. DOI: 10.1080/14756366.2018.1475369.

Eckert, A. W.; Lautner, M. H. W.; Schütze, A.; Bolte, K.; Bache, M.; Kappler, M. et al. (2010): Co-expression of Hif1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 39 (4), S. 313–317. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2009.00829.x.

Ellingsen, Christine; Andersen, Lise Mari K.; Galappathi, Kanthi; Rofstad, Einar K. (2015): Hypoxia biomarkers in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. In: *BMC cancer* 15, S. 805. DOI: 10.1186/s12885-015-1828-2.

Fakhry, Carole; D'Souza, Gypsyamber (2013): Discussing the diagnosis of HPV-OSCC. Common questions and answers. In: *Oral oncology* 49 (9), S. 863–871. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.06.002.

Fakhry, Carole; Westra, William H.; Li, Sigui; Cmelak, Anthony; Ridge, John A.; Pinto, Harlan et al. (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. In: *Journal of the National Cancer Institute* 100 (4), S. 261–269. DOI: 10.1093/jnci/djn011.

Feller, Liviu; Lemmer, Johan (2012): Oral Squamous Cell Carcinoma. Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. In: *JCT* 03 (04), S. 263–268. DOI: 10.4236/jct.2012.34037.

Fong, G-H; Takeda, K. (2008): Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. In: *Cell death and differentiation* 15 (4), S. 635–641. DOI: 10.1038/cdd.2008.10.

Gillison, M. L. (2000): Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9), S. 709–720. DOI: 10.1093/jnci/92.9.709.

Gillison, M. L.; Koch, W. M.; Capone, R. B.; Spafford, M.; Westra, W. H.; Wu, L. et al. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9), S. 709–720.

Göttgens, Eva-Leonne; Ostheimer, Christian; Span, Paul N.; Bussink, Jan; Hammond, Ester M. (2018): HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer. In: *The British journal of radiology*, S. 20180047. DOI: 10.1259/bjr.20180047.

11. Literaturverzeichnis

Graham, S. V. (2010): Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. In: *Future microbiology* 5 (10), S. 1493–1506. DOI: 10.2217/fmb.10.107.

Gross G, Hillemanns P, Iftner T, et al. (2006): Wer sollte wann, wo und wie geimpft werden? In: *Dt. Ärzteblatt* 2006 103 (50).

Hanns, Elodie; Job, Sylvie; Coliat, Pierre; Wasylyk, Christine; Ramolu, Ludivine; Pencreach, Erwan et al. (2015): Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature. In: *Oral oncology* 51 (9), S. 848–856. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.003.

Iwasaki, Akiko (2010): Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (10), S. 699–711. DOI: 10.1038/nri2836.

Jovanovic, A.; Schulten, E. A.; Kostense, P. J.; Snow, G. B.; van der Waal, I. (1993): Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 22 (10), S. 459–462.

Jung, Young-Suk; Najy, Abdo J.; Huang, Wei; Sethi, Seema; Snyder, Michael; Sakr, Wael et al. (2017): HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer. In: *Oncotarget* 8 (31), S. 51530–51541. DOI: 10.18632/oncotarget.17887.

Kaluz, Stefan; Kaluzová, Milota; Chrastina, Adrian; Olive, Peggy L.; Pastoreková, Silvia; Pastorek, Jaromír et al. (2002): Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: a role for phosphatidylinositol 3'-kinase. In: *Cancer research* 62 (15), S. 4469–4477.

Kim, Seok Jin; Shin, Hye Jin; Jung, Kwang-Yoon; Baek, Seung-Kuk; Shin, Bong Kyung; Choi, Jungwoo et al. (2007): Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. In: *Japanese journal of clinical oncology* 37 (11), S. 812–819. DOI: 10.1093/jjco/hym121.

Kiuru, A.; Servomaa, K.; Grénman, R.; Pulkkinen, J.; Rytömaa, T. (1997): p53 mutations in human head and neck cancer cell lines. In: *Acta oto-laryngologica. Supplementum* 529, S. 237–240.

Klussmann, J. P.; Dinh, S.; Guntinas-Lichius, O.; Wittekindt, C.; Weissenborn, S.; Wieland, U. et al. (2004): HPV-assoziierte Tonsillenkzinome. Ein Update. In: *HNO* 52 (3), S. 208–218. DOI: 10.1007/s00106-004-1069-1.

Klussmann, Jens P.; Mooren, Jeroen J.; Lehnen, Martin; Claessen, Sandra M. H.; Stenner, Markus; Huebbers, Christian U. et al. (2009): Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (5), S. 1779–1786. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1463.

Knuth, Jennifer; Sharma, Shachi J.; Würdemann, Nora; Holler, Claudia; Garvalov, Boyan K.; Acker, Till et al. (2017): Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Oncotarget* 8 (52), S. 89681–89691. DOI: 10.18632/oncotarget.20813.

Kondo, Yuhei; Yoshikawa, Kazuhiro; Omura, Yukinobu; Shinohara, Atsushi; Kazaoka, Yoshiaki; Sano, Junji et al. (2011): Clinicopathological significance of carbonic anhydrase 9, glucose transporter-1, Ki-67 and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. In: *Oncology reports* 25 (5), S. 1227–1233. DOI: 10.3892/or.2011.1216.

Kopacek, Juraj; Barathova, Monika; Dequiedt, Franck; Sepelakova, Janka; Kettmann, Richard; Pastorek, Jaromir; Pastorekova, Silvia (2005): MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX. In: *Biochimica et biophysica acta* 1729 (1), S. 41–49. DOI: 10.1016/j.bbaexp.2005.03.003.

Krupar, Rosemarie; Robold, Katharina; Gaag, Doris; Spanier, Gerrit; Kreutz, Marina; Renner, Kathrin et al. (2014): Immunologic and metabolic characteristics of HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas are strikingly different. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 465 (3), S. 299–312. DOI: 10.1007/s00428-014-1630-6.

Le, Quynh-Thu; Kong, Christina; Lavori, Phillip W.; O'byrne, Ken; Erler, Janine T.; Huang, Xin et al. (2007): Expression and prognostic significance of a panel of tissue hypoxia markers in head-and-neck squamous cell carcinomas. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 69 (1), S. 167–175. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.01.071.

Lin, Brian M.; Wang, Hao; D'Souza, Gypsyamber; Zhang, Zhe; Fakhry, Carole; Joseph, Andrew W. et al. (2013): Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: *Cancer* 119 (19), S. 3462–3471. DOI: 10.1002/cncr.28250.

11. Literaturverzeichnis

Lindel, K.; Beer, K. T.; Laissue, J.; Greiner, R. H.; Aebersold, D. M. (2001): Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. In: *Cancer* 92 (4), S. 805–813.

Markopoulos, Anastasios K. (2012): Current aspects on oral squamous cell carcinoma. In: *The open dentistry journal* 6, S. 126–130. DOI: 10.2174/1874210601206010126.

Mayer, Arnulf; Hockel, Michael; Vaupel, Peter (2006): Endogenous hypoxia markers in locally advanced cancers of the uterine cervix: reality or wishful thinking? In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 182 (9), S. 501–510. DOI: 10.1007/s00066-006-1525-9.

Mayer, Arnulf; Höckel, Michael; Vaupel, Peter (2005): Carbonic anhydrase IX expression and tumor oxygenation status do not correlate at the microregional level in locally advanced cancers of the uterine cervix. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (20), S. 7220–7225. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0869.

Mayer, Christina; Wagner, Steffen; Wittekindt, Claus; Arenz, Andrea; Roth, Maike; Ziemann, Frank; Klußmann, Jens Peter (Hg.) (2013): Strahlensensitivität und veränderte Protein-Expression bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumorzelllinien. German Medical Science GMS Publishing House. Unter Mitarbeit von Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie.

McDonald, Paul C.; Winum, Jean-Yves; Supuran, Claudiu T.; Dedhar, Shoukat (2012): Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. In: *Oncotarget* 3 (1), S. 84–97. DOI: 10.18632/oncotarget.422.

Muñoz, Nubia; Castellsagué, Xavier; González, Amy Berrington de; Gissmann, Lutz (2006): Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. In: *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/1–10. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.115.

Muñoz Nubia; Bosch F. Xavier; de Sanjosé Silvia; Herrero Rolando; Castellsagué Xavier; Shah Keerti V. et al. (2003): Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer.

Nakamura, Mitsuhiro; Bodily, Jason M.; Beglin, Melanie; Kyo, Satoru; Inoue, Masaki; Laimins, Laimonis A. (2009): Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. In: *Virology* 387 (2), S. 442–448. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.036.

- Neri, Dario; Supuran, Claudiu T. (2011): Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. In: *Nature reviews. Drug discovery* 10 (10), S. 767–777. DOI: 10.1038/nrd3554.
- Nordsmark, M.; Overgaard, J. (2000): A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 57 (1), S. 39–43.
- Nordsmark, Marianne; Bentzen, Søren M.; Rudat, Volker; Brizel, David; Lartigau, Eric; Stadler, Peter et al. (2005): Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 77 (1), S. 18–24. DOI: 10.1016/j.radonc.2005.06.038.
- Oliver, A. J.; Helfrick, J. F.; Gard, D. (1996): Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. In: *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 54 (8), 949-54; discussion 955.
- Olthof, Nadine C.; Speel, Ernst-Jan M.; Kolligs, Jutta; Haesevoets, Annick; Henfling, Mieke; Ramaekers, Frans C. S. et al. (2014): Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. In: *PloS one* 9 (2), e88718. DOI: 10.1371/journal.pone.0088718.
- Opavsky, R., et al. (1996): Human MN/CA9 Gene, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Family: Structure and Exon to Protein Domain Relationships.
- Otto, Angela M. (2016): Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. In: *Cancer & metabolism* 4, S. 5. DOI: 10.1186/s40170-016-0145-9.
- Ou, Dan; Garberis, Ingrid; Adam, Julien; Blanchard, Pierre; Nguyen, France; Levy, Antonin et al. (2018): Prognostic value of tissue necrosis, hypoxia-related markers and correlation with HPV status in head and neck cancer patients treated with bio- or chemo-radiotherapy. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 126 (1), S. 116–124. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.10.007.

Palka, K. T.; Slebos, R. J.; Chung, C. H. (2008): Update on molecular diagnostic tests in head and neck cancer. In: *Seminars in oncology* 35 (3), S. 198–210. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.03.002.

Panisova, Elena; Kery, Martin; Sedlakova, Olga; Brisson, Lucie; Debreova, Michaela; Sboarina, Martina et al. (2017): Lactate stimulates CA IX expression in normoxic cancer cells. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77819–77835. DOI: 10.18632/oncotarget.20836.

Pastorek, Jaromir; Pastorekova, Silvia (2015): Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. In: *Seminars in cancer biology* 31, S. 52–64. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.08.002.

Pastorekova, Silvia; Parkkila, Seppo; Pastorek, Jaromir; Supuran, Claudiu T. (2004): Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. In: *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 19 (3), S. 199–229. DOI: 10.1080/14756360410001689540.

Pérez-Sayáns, Mario; Supuran, Claudiu T.; Pastorekova, Silvia; Suarez-Penaranda, Jose Manuel; Pilar, Gayoso-Diz; Barros-Angueira, Francisco et al. (2013): The role of carbonic anhydrase IX in hypoxia control in OSCC. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 42 (1), S. 1–8. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2012.01144.x.

Pérez-Sayáns, Mario; Suárez-Peñaranda, José Manuel; Pilar, Gayoso-Diz; Barros-Angueira, Francisco; Gándara-Rey, José Manuel; García-García, Abel (2011): Hypoxia-inducible factors in OSCC. In: *Cancer letters* 313 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.08.017.

Pinheiro, Céline; Garcia, Eduardo A.; Morais-Santos, Filipa; Moreira, Marise A. R.; Almeida, Fábio M.; Jubé, Luiz F. et al. (2015): Reprogramming energy metabolism and inducing angiogenesis. Co-expression of monocarboxylate transporters with VEGF family members in cervical adenocarcinomas. In: *BMC cancer* 15, S. 835. DOI: 10.1186/s12885-015-1842-4.

Prigge, Elena-Sophie; Toth, Csaba; Dyckhoff, Gerhard; Wagner, Steffen; Müller, Franziska; Wittekindt, Claus et al. (2015): p16(INK4a) /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. In: *International journal of cancer* 136 (7), S. 1589–1599. DOI: 10.1002/ijc.29130.

Rademakers, Saskia E.; Hoogsteen, Ilse J.; Rijken, Paul F.; Oosterwijk, Egbert; Terhaard, Chris H.; Doornaert, Patricia A. et al. (2013): Pattern of CAIX expression is

prognostic for outcome and predicts response to ARCON in patients with laryngeal cancer treated in a phase III randomized trial. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108 (3), S. 517–522. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.04.022.

Rodolico, Vito; Arancio, Walter; Amato, Marco C.; Aragona, Francesco; Cappello, Francesco; Di Fede, Olga et al. (2011): Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein. In: *Infectious agents and cancer* 6 (1), S. 18. DOI: 10.1186/1750-9378-6-18.

Roh, Jong-Lyel; Cho, Kyung-Ja; Kwon, Gui Young; Ryu, Chang Hwan; Chang, Hyo Won; Choi, Seung-Ho et al. (2009): The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. In: *Oral oncology* 45 (1), S. 63–68. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.03.017.

Schmitt, Markus; Bravo, I. G.; Snijders, Peter J. F.; Gissmann, Lutz; Pawlita, Michael; Waterboer, Tim (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. In: *Journal of clinical microbiology* 44 (2), S. 504–512. DOI: 10.1128/JCM.44.2.504-512.2006.

Schneider, Sven; Kadletz, Lorenz; Wiebringhaus, Robert; Kenner, Lukas; Selzer, Edgar; Füreder, Thorsten et al. (2018): PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome. In: *Histopathology*. DOI: 10.1111/his.13646.

Sedaghat, Ahmad R.; Zhang, Zhe; Begum, Shahnaz; Palermo, Robert; Best, Simon; Ulmer, Karen M. et al. (2009): Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. In: *The Laryngoscope* 119 (8), S. 1542–1549. DOI: 10.1002/lary.20533.

Sedlakova, Olga; Svastova, Eliska; Takacova, Martina; Kopacek, Juraj; Pastorek, Jaromir; Pastorekova, Silvia (2014): Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. In: *Frontiers in physiology* 4, S. 400. DOI: 10.3389/fphys.2013.00400.

Shin, Kyung Hwan; Diaz-Gonzalez, Juan A.; Russell, James; Chen, Qing; Burgman, Paul; Li, Xiao-Feng; Ling, C. Clifton (2007): Detecting changes in tumor hypoxia with carbonic anhydrase IX and pimonidazole. In: *Cancer biology & therapy* 6 (1), S. 70–75.

Simões-Sousa, Susana; Granja, Sara; Pinheiro, Céline; Fernandes, Daniela; Longatto-Filho, Adhemar; Laus, Ana Carolina et al. (2016): Prognostic significance of

monocarboxylate transporter expression in oral cavity tumors. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (14), S. 1865–1873. DOI: 10.1080/15384101.2016.1188239.

Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J (1994): Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. In: *Cancer research* 1994 (54 (3)), S. 1294–1300.

Steenbergen, R. D.; Hermesen, M. A.; Walboomers, J. M.; Joenje, H.; Arwert, F.; Meijer, C. J.; Snijders, P. J. (1995): Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. In: *Cancer research* 55 (22), S. 5465–5471

Swartz, Justin Egidius; Pothen, Ajit Joe; van Kempen, Pauline Maria Wilhelmina; Stegeman, Inge; Formsma, Fleurieke Karlijn; van Cann, Ellen Maria et al. (2016): Poor prognosis in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas that overexpress hypoxia inducible factor-1alpha. In: *Head & neck*. DOI: 10.1002/hed.24445.

Tang, Xudong; Zhang, Qunzhou; Nishitani, Junko; Brown, Jimmy; Shi, Shihong; Le, Anh D. (2007): Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (9), S. 2568–2576. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2704.

Toustrup, Kasper; Sørensen, Brita Singers; Lassen, Pernille; Wiuf, Carsten; Alsner, Jan; Overgaard, Jens (2012): Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 102 (1), S. 122–129. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.09.010.

Trinkaus, Mateya E.; Hicks, Rodney J.; Young, Richard J.; Peters, Lester J.; Solomon, Ben; Bressel, Mathias et al. (2014): Correlation of p16 status, hypoxic imaging using 18F-misonidazole positron emission tomography and outcome in patients with loco-regionally advanced head and neck cancer. In: *Journal of medical imaging and radiation oncology* 58 (1), S. 89–97. DOI: 10.1111/1754-9485.12155.

Troost, Esther G. C.; Bussink, Johan; Kaanders, Johannes H. A. M.; van Eerd, Julliette; Peters, Johannes P. W.; Rijken, Paulus F. J. W. et al. (2005): Comparison of different methods of CAIX quantification in relation to hypoxia in three human head and neck tumor lines. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for*

Therapeutic Radiology and Oncology 76 (2), S. 194–199. DOI: 10.1016/j.radonc.2005.06.031.

Vanchanagiri, Kranthi; Emmerich, Daniel; Bruschke, Monique; Bache, Matthias; Seifert, Franziska; Csuk, René et al. (2018): Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors. In: *Chemico-biological interactions* 284, S. 12–23. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.02.014.

Väyrynen, Sara A.; Väyrynen, Juha P.; Klintrup, Kai; Mäkelä, Jyrki; Karttunen, Tuomo J.; Tuomisto, Anne; Mäkinen, Markus J. (2016): Clinical impact and network of determinants of tumour necrosis in colorectal cancer. In: *Br J Cancer* 114 (12), S. 1334–1342. DOI: 10.1038/bjc.2016.128.

Wagner, S.; Böckmann, H.; Gattenlöhner, S.; Klusmann, J. P.; Wittekindt, C. (2018): Das angeborene Immunsystem beim Oropharynxkarzinom : Immunmodulation durch HPV. In: *HNO* 66 (4), S. 301–307. DOI: 10.1007/s00106-018-0480-y.

Wagner, S.; Mayer, C.; Wittekindt, C.; Klusmann, J. P. (2012): Humane Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 63 (1), S. 24–29. DOI: 10.1007/s00105-011-2196-8.

Wagner, Steffen; Wittekindt, Claus; Sharma, Shachi Jenny; Wuerdemann, Nora; Jüttner, Theresa; Reuschenbach, Miriam et al. (2017): Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. In: *Br J Cancer* 116 (12), S. 1604–1611. DOI: 10.1038/bjc.2017.132.

Wentzensen, N.; Vinokurova, S.; Knebel, Doeberitz M. von (2004): Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. In: *Cancer research* 64 (11), S. 3878–3884. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0009.

Wittekind, Christian (2010): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Somerset: Wiley-Blackwell.

Wittekindt, C.; Wagner, S.; Klusmann, J. P. (2011): Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen. Molekulare und translationale Grundlagen. In: *HNO* 59 (9), S. 885–892. DOI: 10.1007/s00106-011-2357-1.

Wittekindt, Claus; Wagner, Steffen; Mayer, Christina Sabine; Klusmann, Jens Peter (2012): Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. In: *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery* 11, Doc09. DOI: 10.3205/cto000091.

11. Literaturverzeichnis

Würdemann, Nora; Wagner, Steffen; Sharma, Shachi Jenny; Prigge, Elena-Sophie; Reuschenbach, Miriam; Gattenlöhner, Stefan et al. (2017): Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. In: *Frontiers in oncology* 7, S. 129. DOI: 10.3389/fonc.2017.00129.

Ziemann, Frank; Arenz, Andrea; Preising, Stefanie; Wittekindt, Claus; Klusmann, Jens P.; Engenhardt-Cabillic, Rita; Wittig, Andrea (2015): Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation $\pm$ Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. In: *American journal of cancer research* 5 (3), S. 1017–1031.

12 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Claus Wittekindt, Kommissarischer Direktor der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Gießen sowie bei Prof. Dr. Jens Klußmann ehemaliger Chefarzt der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Gießen, nun Leiter der HNO-Klinik der Uniklinik Köln, für die Überlassung des Themas und Unterstützung der Promotion bedanken.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Steffen Wagner für die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, für die Betreuung und stetige Hilfestellung sowie das ausdauernde Korrekturlesen.

Danken möchte ich dem Team der HNO- Tumorforschung, hier zu nennen vor allem Maike Roth und Jennifer Knuth für die Aufnahme in ihre Forschungsgruppe, Einweisung in die Kunst des wissenschaftlichen Arbeitens, Hilfsbereitschaft und stetige Unterstützung.

Von Herzen danken möchte ich meinen Eltern, für die Ermöglichung und Finanzierung des Studiums sowie die aktive und passive Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem meinem Freund Thomas Austermann für geduldige Zuwendung, Aufmunterung und Unterstützung. Außerdem möchte ich meinen Geschwistern für die technische Unterstützung und Hilfeleistung sowie das Korrekturlesen herzlich danken. Und bedanken möchte ich mich bei meiner Mitstreiterin Sonja, für die schönen und erfolgreichen Stunden im Labor und darüber hinaus aufmunternde und fortwährend anhaltende Unterstützung.