

**Untersuchung der Expression von RIPK4 und p63
sowie deren prognostische Bedeutung
bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx**

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

Hannah Camilla Bertrams

Gießen, 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Kopf-Hals-Tumorforschung, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Mulert

Tag der Disputation: 29.August.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Karzinome des Oropharynx	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Anatomie und Klassifikation	1
1.1.3 Symptomatik und Diagnostik	2
1.1.4 Therapie und Prognose	3
1.2 Humane Papillomaviren	4
1.2.1 Grundlagen, Epidemiologie und Ätiologie	4
1.2.2 HPV-Infektion und Karzinogenese	5
1.3 RIPK4	6
1.3.1 Grundlagen	6
1.3.2 Bedeutung von RIPK4 in der Karzinogenese	7
1.4 p63	7
1.4.1 Grundlagen	7
1.4.2 Bedeutung von p63 in der Karzinogenese sowie Interaktionen mit HPV	9
1.5 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	10
1.5.1 Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch RIPK4, p63 und HPV	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material	15
2.1 Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Chemikalien	15
2.3 Lösungen und Puffer	16
2.4 Antikörper	16
2.5 Reagenziensätze (Kits)	16
2.6 Geräte	17
2.7 Software	17
3. Methoden	18
3.1 Auswahl des Patientenkollektivs	18
3.2 Einteilung der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika	19
3.3 Tumorproben und Gewebeschnitte	20
3.4 HE-Färbung	21
3.5 Immunhistochemische Färbung	21
3.5.1 RIPK4-Färbung	23
3.5.2 p63-Färbung	23
3.6 Mikroskopische Auswertung der Färbung	24

4. Ergebnisse.....	25
4.1 Vorstellung des OPSCC-Gesamtkollektivs hinsichtlich der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika	25
4.1.1 Deskriptive Auswertung des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status.....	25
4.1.2 Deskriptive Auswertung des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie aufgeteilt nach dem HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM.....	28
4.2 Vorstellung der OPSCC-Untersuchungskohorte hinsichtlich der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika	32
4.2.1 Deskriptive Auswertung der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status.....	32
4.2.2 Deskriptive Auswertung der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie aufgeteilt nach HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM	34
4.3 Überleben des OPSCC-Gesamtkollektivs und der OPSCC-Untersuchungskohorte.....	37
4.3.1 Überleben des OPSCC-Gesamtkollektivs	37
4.3.2 Univariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs.....	38
4.3.3 Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs	39
4.3.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte	40
4.3.5 Univariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte	42
4.3.6 Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte	43
4.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von RIPK4 in der OPSCC-Untersuchungskohorte.....	44
4.4.1 Deskriptive Auswertung der RIPK4-Expression.....	44
4.4.2 Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren bzw. Tumorkriterien und der metrisch eingeteilten RIPK4-Expression.....	45
4.4.3 Risikofaktoren und Tumorcharakteristika in Bezug zur dichotomisierten RIPK4-Expression.....	47
4.4.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte stratifiziert nach der RIPK4-Expression.....	50
4.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p63 der OPSCC-Untersuchungskohorte.....	51
4.5.1 Deskriptive Auswertung der p63-Expression	51
4.5.2 Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren bzw. Tumorkriterien und der metrisch eingeteilten p63-Expression.....	52
4.5.3 Risikofaktoren und Tumorcharakteristika in Bezug zur dichotomisierten p63-Expression	54
4.5.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte stratifiziert nach der p63-Expression	56
4.6 Zusammenhänge zwischen der Expression von p63- und RIPK4.....	57

4.6.1	Korrelation der p63- und RIPK4-Expression.....	57
4.6.2	Deskriptive Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	57
4.6.3	Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte	58
5.	Diskussion.....	60
5.1	Analyse des OPSCC-Gesamtkollektivs	60
5.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	60
5.1.2	Tumorcharakteristika.....	61
5.1.3	Uni- und multivariate Überlebensanalyse	62
5.2	Analyse der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit LR/FM	63
5.2.1	Patientencharakteristika bei HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM	63
5.2.2	Tumoreigenschaften bei HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM.....	63
5.2.3	Gesamtüberleben des OPSCC-Gesamtkollektiv differenziert nach dem HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM	64
5.3	Komposition und Gesamtüberleben der OPSCC-Untersuchungskohorte	65
5.4	Immunhistochemischer Nachweis von RIPK4	66
5.5	Immunhistochemischer Nachweis von p63.....	67
5.6	Zusammenhänge zwischen der Expression von RIPK4 und p63.....	69
5.7	Limitationen.....	70
5.8	Ausblick.....	72
6.	Zusammenfassung.....	73
7.	Abstract	74
8.	Abkürzungsverzeichnis	75
9.	Abbildungsverzeichnis	78
10.	Tabellenverzeichnis	81
11.	Literaturverzeichnis	84
12.	Anhang.....	A
12.1	Einteilung der TNM-Stadien und UICC8 Stadien	A
12.2	Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	B
12.3	Definition ECOG-Stadieneinteilung	D
12.4	Ergänzende Tabellen zur multivariaten Überlebensanalyse	D
12.5	Bescheid der Ethikkommission.....	H
13.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	M
14.	Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
15.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit vorrangig das generische Maskulinum verwendet. Mit den entsprechenden Bezeichnungen werden alle Geschlechter gleichermaßen angesprochen.

1. Einleitung

1.1 Karzinome des Oropharynx

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Für 2022 werden bei den Männern 9700 und bei den Frauen 4900 Neuerkrankungen eines Karzinoms in Mundhöhle oder Rachen prognostiziert (Erdmann et al. 2021). Plattenepithelkarzinome des Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) sind mit über 25% der Fälle die größte Untergruppe der Kopf-Hals-Tumore in Deutschland (Wienecke und Kraywinkel 2019). Eine Besonderheit der OPSCC ist die häufige Assoziation mit humanen Papillomaviren (HPV), was sowohl Konsequenzen für die Einteilung der Tumorstadien, als auch im Hinblick auf die Überlebensprognose mit sich bringt. In Deutschland sind unter den OPSCC etwa 30-50% HPV-assoziiert (Quabius et al. 2015; Würdemann et al. 2017). Die Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC verzeichnet in den letzten Jahrzehnten einen kontinuierlichen Anstieg der Inzidenz (Zumsteg et al. 2016; Würdemann et al. 2017). Gründe hierfür lassen sich bspw. in einem veränderten Sexualverhalten vermuten: Frühe erste sexuelle Kontakte, Promiskuität und oraler Geschlechtsverkehr gelten als Risikofaktoren für HPV-Infektionen im Bereich der Mundhöhle und des Rachens (Herrero et al. 2003; Hernandez et al. 2008). Diese wiederum können zur Entstehung eines Karzinoms beitragen. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC ist ein Rückgang der Inzidenzen zu beobachten, was möglicherweise durch einen Rückgang des Noxenabusus begründet werden kann (Ng et al. 2014). Die klassischen Risikofaktoren für die Entstehung eines OPSCC sind der regelmäßige Konsum von jeglicher Art Alkohol oder Tabak. Der Abusus beider Noxen verstärkt das Risiko für die Entstehung eines Malignoms. Als weiterer Risikofaktor wird ebenso eine schlechte Mundhygiene diskutiert. Aus anderen Kulturkreisen ist bspw. das Kauen von Betelnüssen als Kanzerogen bekannt, was in Deutschland jedoch vernachlässigbar ist. Bei Patienten die bereits in der Vorgeschichte eine Krebserkrankung im Kopf-Halsbereich hatten, ist das Risiko für das Auftreten von Zweitmalignomen im HNO-Spektrum ebenfalls erhöht.

1.1.2 Anatomie und Klassifikation

Im Folgenden wird die Anatomie des Oropharynx beschrieben, der auch als Mesopharynx bezeichnet wird: Der Zungengrund (hinter der *Papillae circumvallatae*) sowie die *Vallecula epiglottica* bilden die anatomische Abgrenzung nach ventral. Nach lateral wird der Oropharynx durch die Gaumentonsillen in der *Fossa tonsillaris* und den *Sulcus Glossotonsillaris* begrenzt. Nach kranial schließt der Oropharynx zur oralen Fläche des weichen Gaumens und der Uvula ab (vgl. Abbildung 1a). Als OPSCC, werden nach ICD

10 maligne Neubildungen in spezifischen anatomischen Regionen definiert, die detailliert in

Abbildung 1b) aufgezählt sind.

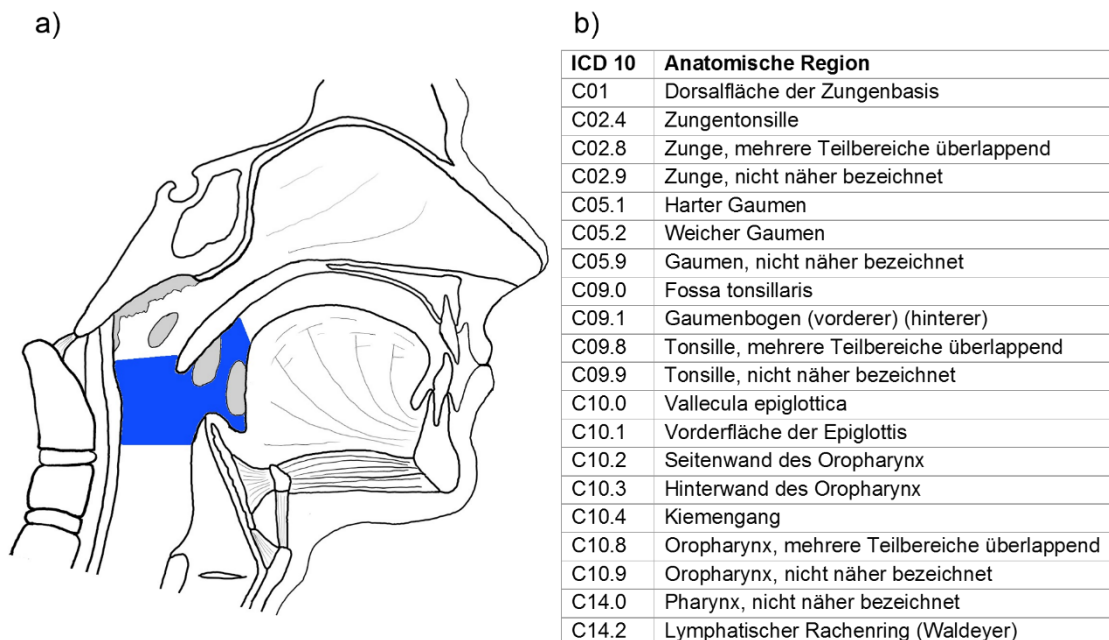


Abbildung 1: a) Anatomie des Oropharynx in stark vereinfachter Darstellung in der Sagittalebene und b) Auflistung der anatomischen Regionen, deren maligne Neubildungen nach ICD 10 als OPSCC definiert sind.

Abbildung 1a) Der Bereich des Oropharynx ist blau eingefärbt. Grau eingefärbt: *Tonsilla pharyngealis*, *Tonsilla tubaria*, *Tonsilla palatina* und *Tonsilla lingualis*.

Die Abbildung 1b) wurde erstellt auf Grundlage von Informationen des (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information).

Anhand der in Tabelle 30 (im Anhang) genannten Kriterien werden die OPSCC in ein Tumorstadium (TNM-Stadium) eingeteilt (Amin et al. 2017). Grundsätzlich beschreibt das T-Stadium die Ausdehnung des Tumors. Das N-Stadium gibt Informationen über maligne befallenen Lymphknoten und das M-Stadium beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen. Auf Basis der TNM-Stadien ist die Tumoreinteilung nach UICC (*union internationale contre le cancer*) definiert, die unter anderem als Grundlage für die Wahl des Therapieregimes dient. Seit der HPV-Status als prognosedefinierender Faktor bei den Patienten mit OPSCC anerkannt ist, wurde eine Überarbeitung der UICC7-Einteilung notwendig. In Folge dessen wurde die Stadieneinteilung angepasst und seit 2017 ist die neue Version der Tumoreinteilung nach UICC8 gültig (Anhang: Tabelle 31).

1.1.3 Symptomatik und Diagnostik

In den frühen Tumorstadien der OPSCC gibt es keine charakteristischen Symptome. Neben dem Auftreten von B-Symptomen, die allgemein hinweisend auf Malignome sind,

können unspezifische Beschwerden wie ein Globusgefühl, Schluckbeschwerden, Trismus oder kloßige Sprache Hinweise auf eine Neoplasie des Oropharynx geben (Lenarz und Boenninghaus 2012). Bei fortgeschrittenen OPSCC kann der *N. glossopharyngeus* infiltriert werden. Der IX Hirnnerv innerviert das Mittelohr sensibel, bei Reizung des Nervs kann es zu stechenden Schmerzempfindungen im Ohr kommen. Im Rahmen der frühen lymphogenen Metastasierung können bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC Schwellungen im Halsbereich auftreten. Durch eine frühe ärztliche Konsultation aufgrund dieses Warnsymptoms werden die HPV-assoziierten OPSCC häufig in niedrigen T-Stadien jedoch in fortgeschrittenen N-Stadien diagnostiziert.

Erste diagnostische Schritte bei Verdacht auf ein OPSCC sind neben einer ausführlichen Anamnese, die HNO-ärztliche Untersuchung. Weiterführende Informationen werden durch bildgebende Verfahren wie Sonographie, CT oder MRT erlangt. Anschließend wird im Rahmen einer Panendoskopie eine Gewebeprobe gewonnen, um den klinischen Verdacht histologisch und molekularbiologisch zu bestätigen. Das Staging kann bspw. durch ein Röntgenbild oder CT des Thorax sowie ein PET-CT vervollständigt werden. Auf Basis aller diagnostischen Erkenntnisse wird durch ein interdisziplinäres Tumorboard eine Therapieempfehlung gegeben.

1.1.4 Therapie und Prognose

Kurative Therapieansätze werden bei lokalbegrenzten bis lokalfortgeschrittenen Tumoren angewandt. Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium, also mit nachgewiesener Fernmetastasierung, erhalten meistens eine palliative Therapie. Als Therapieziel sollte neben der kurativen Tumorbehandlung ein bestmöglicher Erhalt der Lebensqualität durch Schonung der Atem- und Speisewege gewährt sein. Grundsätzlich kann entweder eine primäre Radio(chemo)therapie, meist auf Platin-Basis, oder ein chirurgisches Therapieverfahren angewandt werden. Hierfür wird eine sanierende Operation mit Entfernung der lokalen Lymphknoten sowie ggfs. weiterem Gewebe (*neck dissection*) durchgeführt. Des Weiteren wird bei Tumoren ab Stadium T3 eine adjuvante kombinierte Radiochemotherapie empfohlen. Ergänzende immuntherapeutische Therapieansätze werden aktuell im Rahmen von klinischen Studien evaluiert (Reiß 2021; Reuschenbach et al. 2016).

Trotz deutlich besserer Überlebensprognose der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren, werden alle OPSCC-Patienten, unabhängig vom HPV-Status, weitgehend nach den gleichen Behandlungsregimen therapiert. Verschiedene Autoren haben eine Deeskalation der Therapie bei HPV-assoziierten Tumoren vorgeschlagen, was aktuell im Rahmen von Studien untersucht wird (Reuschenbach et al. 2016; Economopoulou et al. 2021).

Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass unter den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren eine Subgruppe identifiziert werden konnte, bei der durch das Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen (LR/FM) eine erhöhte Mortalität beobachtet wurde (Faraji et al. 2017; Reder et al. 2021). Folglich könnte diese Gruppe bei einer grundsätzlichen Reduktion der Therapieintensität HPV-assoziiierter OPSCC untertherapiert werden.

1.2 Humane Papillomaviren

1.2.1 Grundlagen, Epidemiologie und Ätiologie

HPV sind unbehüllte Viren mit einer ringförmigen, doppelsträngigen DNA. Mehr als 200 verschiedene Virustypen wurden bisher identifiziert, von denen etwa 30-40 (α -Gruppe) die basalen Keratinozyten der anogenitalen und oralen Mukosa infizieren (Brancaccio et al. 2018; Villiers et al. 2004). Diese wiederum werden in zwei Subgruppen eingeteilt: 1. die *low-risk*-Typen (LR-HPV bspw. HPV 6, 11) rufen benigne Erkrankungen wie etwa Kondylome hervor und 2. die *high-risk*-Typen (HR-HPV bspw. HPV 16,18), deren kanzerogenes Potential gesichert ist (zur Hausen 2002). Ungefähr 5% aller Krebserkrankungen weltweit sind HPV-assoziiert (Tota et al. 2011; Plummer et al. 2016). HPV ruft hauptsächlich Karzinome des Anogenitalbereich (Cervix, Penis, Vulva, Vagina, Anus) und im Kopf-Hals-Bereich (Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx) hervor (Buttmann-Schweiger et al. 2017; Castellsagué et al. 2016; zur Hausen 2009). In verschiedenen Studien wurde HPV 16 in über 80%, teilweise sogar über 90% aller HPV-assoziierten OPSCC nachgewiesen (Castellsagué et al. 2016; Herrero et al. 2003; Wagner et al. 2020).

HPV ist weltweit eine der häufigsten sexuell übertragbaren Infektionen. Als relevantester Infektionsweg ist die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch im Rahmen sexueller Kontakte (vaginal, anal, oral) beschrieben (Hernandez et al. 2008). Seltener kann es durch kontaminierte Oberflächen zu Schmierinfektionen kommen (Strauss et al. 2002). Auch Speichelaustausch bei Küssen kann zu einer Übertragung von HPV führen (Pickard et al. 2012). Ein weiterer HPV-Infektionsweg ist die vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind während der Geburt (Smith et al. 2010). Insgesamt ist die Anzahl an HPV-Infektionen im Kopf-Halsbereich deutlich geringer als im Anogenitalbereich (Beachler et al. 2013; Steinau et al. 2014). Spezielle Ursachen für die oralen HPV-Infektionen sind bspw. oraler Geschlechtsverkehr aber auch Speichelaustausch bei Küssen (Pickard et al. 2012).

Der Verlauf von HPV-Infektionen ist in den meisten Fällen asymptomatisch und wird durch die körpereigene Immunabwehr beseitigt. Bei einer persistierenden Infektion steigt

das Risiko für eine maligne Entartung. Jedoch entwickelt sich nur ein geringer Anteil der Infektionen zu einem Karzinom.

Es gibt verschiedene Maßnahmen, die Schutz vor einer HPV-Infektion bzw. einer darauffolgenden Tumorerkrankung bieten. Neben einer gezielten Information von Jugendlichen ist die Impfung eine effektive Möglichkeit zur Primärprävention. Aktuell sind in Deutschland zwei Impfstoffe gegen die relevantesten HR-HPV-Typen zugelassen. Die STIKO empfiehlt mittlerweile eine Grundimmunisierung aller Mädchen und Jungen im Alter von 9-14 Jahren durch zwei Impfdosen im Abstand von 5 Monaten (Ständige Impfkommission (STIKO) 2021). Für das Cervixkarzinom konnte eine Abnahme der Inzidenz in Folge einer HPV-Impfung bestätigt werden (zur Hausen 2002; Kjaer et al. 2021; Falcaro et al. 2021). Bei einer flächendeckenden Immunisierung wird langfristig auch eine starke Reduktion der Inzidenzraten des HPV-assoziierten OPSCC erwartet.

Darüber hinaus sind in der Gynäkologie Vorsorgeuntersuchungen im Rahmen der Sekundärprävention etabliert wie bspw. der PAP-Test und die HPV-Testung. Auch im HNO-Bereich wäre grundsätzlich ein vergleichbares Screening zur Identifizierung von HR-HPV möglich. Aktuell wird dies vorrangig im Rahmen von Studien durchgeführt (Kreimer et al. 2018). Bei den OPSCC gibt es im Vergleich zu den Cervixkarzinomen weniger Präkanzerosen, was eine Einschränkung solcher Vorsorgeuntersuchungen darstellt.

1.2.2 HPV-Infektion und Karzinogenese

Über kleinste Läsionen können die HP-Viren die replikationsfähigen Basalzellen des Epithels infizieren. Die Proteine, welche für die Virusreplikation notwendig sind, werden von HPV nicht selbst exprimiert. Daher sind die Viren von der Zellreplikation abhängig. Die sogenannten *early proteins* (E1-E8) regulieren die Replikation und Transkription der Virus-DNA. Diese werden in den proximalen Zellschichten des Epithels exprimiert. Die natürliche Funktion von E6 und E7 ist es die Apoptose zu unterbinden und den Zellzyklus zu fördern. Die *late proteins* L1 und L2 sind als Strukturproteine für den Aufbau des Viruskapsid verantwortlich und werden erst in den obersten Epithelschichten bzw. zu „späteren Zeitpunkten“ der Virusreplikation exprimiert (Sano und Oridate 2016). Dort lösen sich die differenzierten Zellen nach und nach aus dem Zellverband. Mit dem Zerfall dieser Zellen wird das Virus schließlich freigesetzt.

Eine über viele Jahre persistierende HPV-Infektion kann in eine kanzeröse Entartung übergehen. Das E2-Protein kontrolliert im normalen Replikationszyklus von HPV die Aktivität der Onkoproteine E6 und E7. In der Karzinogenese bewirkt E6 den Abbau von p53 und führt zu einem fehlgesteuerten und beschleunigten Zellzyklus (Werness et al. 1990).

E7 bindet und inaktiviert das Retinoblastom-Protein und treibt so den Zellzyklus an (Mün-ger et al. 2001). Ein Risikofaktor für die Karzinogenese ist die Integration der HR-HPV-DNA in das Wirtsgenom, was zu einer Bruchstelle im Gen von E2 führen kann. Hierdurch kann es zur verstärkten Expression der Onkoproteine E6 und E7 kommen und somit zur Induktion der Karzinogenese. Allerdings wurde in HPV-assoziierten OPSCC teilweise auch ein intaktes E2 Gen gefunden was gegen die Exklusivität dieses Mechanismus der HPV-induzierten Karzinogenese spricht (Morgan et al. 2017; Olthof et al. 2015). HPV-DNA kann somit in das Genom der Wirtszelle integriert werden oder sie liegt rein episo-mal vor. Zusätzlich können auch beide Formen gleichzeitig in der Wirtszelle auftreten (Morgan et al. 2017). Durch epigenetische Modifikationen wie die Methylierung des E2 Gens kann die Expression von E6 und E7 ebenfalls beeinflusst werden (Reuschenbach et al. 2015). Die Expression der viralen Onkogene führt zu chromosomaler Instabilität, was wiederum die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom und damit die Karzinogenese begünstigen kann (zur Hausen 2002). Eine Vielzahl weiterer Interaktio-nen der HPV- mit zellulären Proteinen ist bekannt, welche die Karzinogenese beeinflus-sen (Sano und Oridate 2016). Beispielsweise führen verschiedene Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems, was die körpereigene Bekämpfung der Infektion verhin-dert und die Entstehung eines Malignoms fördern kann (zusammengefasst in: Wagner et al. 2018).

1.3 RIPK4

1.3.1 Grundlagen

Das Protein RIPK4 (*receptor-interacting protein kinase 4*) hat eine N-terminale Kinase-Domäne, eine Serin/Threonin reiche Intermediärdomäne sowie eine C-terminale Region, die sich aus 11 Ankyrin-Wiederholungen zusammensetzt (Huang et al. 2018; Meylan et al. 2002). Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen mit 86kDa und 92 kDa, die sich durch eine Deletion in der Intermediärdomäne unterscheiden (Huang et al. 2018). Zudem kann RIPK4 in ein N-terminales 37kDa- und ein C-terminales 44 kDa-Fragment unterteilt werden (Meylan et al. 2002). RIPK4 nimmt als Serin/Threonin Kinase eine grundlegende Rolle bei der Differenzierung, Inflammation und Wundheilung von Epithelien ein (Adams et al. 2007; Rountree et al. 2010). Es sind mehrere Proteinkinasen bekannt, die Teil der sogenannten RIP-Familie sind. Darunter scheint RIPK4 den größ-ten Einfluss auf die Zellen des Epithels zu haben (Adams et al. 2007). Mutationen im Genom von RIPK4 lösen bei Menschen schwerwiegende syndromale Erkrankungsbilder aus. Beispielsweise treten bei dem Bartsocas-Papas Syndrom Anomalien in der Ent-wicklung der Haut, Schleimhaut und Genitalien, sowie kraniofaziale Fehlbildungen auf, die oft zu einem pränatalen Versterben führen (Kalay et al. 2012; Mitchell et al. 2012).

Auch das CHAND-Syndrom wird durch Mutationen im RIPK4-Gen hervorgerufen (Busa et al. 2017). CHAND steht als Akronym für das klinische Krankheitsbild: krauses Haar (*curly hair*), angeborene Verwachsung von Ober- und Unterlid des Auges (*ankyloblepharon*) und Fehlbildungen der Nägel (*nail dysplasia*). In Tierversuchen wurden die verschiedenen RIP-Proteine bei Mäusen deaktiviert. Bei den Tieren mit einem RIPK4-Defizit traten die schwerwiegendsten Auswirkungen auf. Bei diesen Tieren zeigten sich phänotypische Ähnlichkeiten zu den zuvor genannten humanen Erkrankungsbildern (Kalay et al. 2012).

1.3.2 Bedeutung von RIPK4 in der Karzinogenese

Die genauen Signalwege und Interaktionen von RIPK4 sind an vielen Stellen noch unbekannt. Bei einer Dysregulation der RIPK4-Expression kann die epidermale Differenzierung von der Norm abweichen und sogar zur Karzinogenese führen (Xu et al. 2020). Bei Mutationsanalysen von Kopf-Halstumoren wurden RIPK4-Missense-Mutationen nachgewiesen (Stransky et al. 2011). Ebenso wurde bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC eine signifikante Häufung von Mutationen im RIPK4-Gen gegenüber den HPV-negativen gefunden (Gillison et al. 2019). Auch unsere Arbeitsgruppe hat in einer Sequenz-Untersuchung Mutationen im RIPK4-Gen bei einem Fall eines HPV-assoziierten OPSCC nachgewiesen (bisher noch nicht veröffentlicht). Aktuell gibt es verschiedene Theorien über die Funktion von RIPK4 in der Karzinogenese. In den unterschiedlichen Tumorentitäten scheint RIPK4 verschiedene Funktionen einzunehmen (Xu et al. 2020). So konnte nachgewiesen werden, dass RIPK4 einerseits als Tumorsuppressor, andererseits auch als Onkogen wirken kann (Wang et al. 2014; Heim et al. 2015; Liu et al. 2015; Yi et al. 2020). Auch der Einfluss von RIPK4 auf Signalwege wie bspw. dem Proteinkinase C-Signalweg, NF- κ B-Signalweg oder dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg hat eine Bedeutung in der Karzinogenese (Kwa et al. 2014; Xu et al. 2020). Auf die Zusammenhänge von RIPK4 mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird in Kapitel 1.5.1 genauer eingegangen.

1.4 p63

1.4.1 Grundlagen

Der Transkriptionsfaktor p63 bildet mit p53 und p73 eine Proteinfamilie mit hoher struktureller Ähnlichkeit. Das p63-Gen besitzt 2 Promotoren und 16 Exons. Ein Promotor bewirkt die Transkription der sogenannten TAp63-Isoformen mit Beginn in Exon 1. Der zweite Promotor initiiert die Transkription der Δ Np63-Isoformen mit Beginn am dritten Exon (Mangiulli et al. 2009). Die TA-Isoformen haben eine N-terminale Transaktivie-

rungs-Domäne (TAD), die den Δ Np63-Isoformen fehlt (Yang et al. 1998). Durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts können 12 verschiedene Isoformen entstehen (Uniprot). Alle Isoformen haben eine gemeinsame DNA-Bindungsdomäne und Oligomerisationsdomäne in der Mitte. Die α - und β -Isoformen haben eine zusätzliche Transaktivierungs-Domäne (TAD2). Die p63 α -Isoform besitzt zudem eine *sterile alpha motif* (SAM) und die C-terminale *trans-inhibitory domain* (TID), die an Interaktionen von Proteinen beteiligt sind (Mangiulli et al. 2009; Yang et al. 1998).

Grundsätzlich wirken die TAp63-Isoformen eher als Aktivatoren und Δ Np63-Isoformen eher als Inhibitoren (Yang et al. 1998). Bspw. können die TA-Isoformen Gene aktivieren, die unter anderem den Zellzyklus blockieren und die Apoptose induzieren. Auf der anderen Seite bewirken die Δ Np63-Isoformen eine Inhibition der Transkription dieser Gene und führen zu einer verstärkten Zellproliferation (Chen et al. 2018). Des Weiteren können die Δ Np63 α -Isoformen eine Aktivierung der RIPK4-Transkription bewirken (Mitchell et al. 2012).

In den meisten Geweben mit epithelialem Ursprung werden die Δ Np63-Isoformen exprimiert, wie bspw. der Haut, oraler Schleimhaut, Brustdrüse aber auch in Plattenepithelkarzinomen (Sethi et al. 2015). Die Δ Np63-Isoformen werden in den Zellkernen mehrschichtiger Epithelien exprimiert, wo sie die Differenzierung inhibieren und so die Proliferation der basalen Stammzellen bewirken (Nekulova et al. 2011). Mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten wird Δ Np63 weniger exprimiert (Reis-Filho et al. 2002). Die TAp63-Isoformen werden kaum in gesunden Geweben exprimiert, dafür bspw. vermehrt in Zellen von B-Zelllymphomen (Sethi et al. 2015).

Die Abbildung 2 zeigt exemplarisch die p63-Expression in Plattenepithel auf einem Präparat aus der OPSCC-Kohorte, welche in dieser Arbeit untersucht wurde. Der genutzte Antikörper von Santa Cruz bindet in der Immunhistochemie an alle p63-Isoformen (vgl. Kapitel 3.5.2). Die Zellen des *Stratum basale* weisen eine starke Expression der p63-Isoformen auf. Mit fortschreiten der Differenzierung der Keratinozyten in den weiter distalen Zellschichten zeigt sich eine abnehmende und zunehmend diffusere Expression.

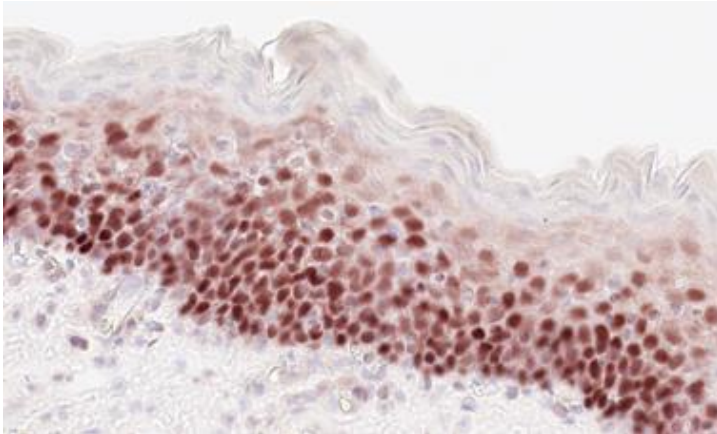


Abbildung 2: Immunhistochemische Expression von p63 (Santa Cruz) in mehrschichtigem Plattenepithel des Oropharynx.

Das p63-Gen übernimmt eine wesentliche Rolle bei der epithelialen Entwicklung, der Ausbildung der Extremitäten, kraniofaszialen Strukturen, sowie vieler weiterer Gewebe wie bspw. Zähne, Haare, Brustdrüsen, Prostata, Schweißdrüsen und Tränendrüsen (Tsujita-Kyutoku et al. 2003; Moll et al. 2001). Beim Menschen bewirkt ein Defekt in p63 (meistens *missense*-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne) das EEC-Syndrom (*ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip/palate syndrome*). Zum Krankheitsbild gehören die Ektrodaktylie (Fehlbildungen des Hand- und Fußskeletts), die ektodermale Dysplasie (Fehlbildungen von Strukturen, die sich aus dem Ektoderm entwickeln bspw. Haaren, Nägeln, Zähnen und Haut) sowie die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (Celli et al. 1999).

1.4.2 Bedeutung von p63 in der Karzinogenese sowie Interaktionen mit HPV

Das p63-Protein übernimmt diverse Funktionen in der Karzinogenese. So kann p63 aufgrund seiner vielfältigen Isoformen sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen fungieren. Die Isoform TAp63 wirkt vorwiegend als Tumorsuppressor durch die Hemmung der Zellproliferation, Förderung der Apoptose und die Blockade des Zellzyklus (Chen et al. 2018; Yang et al. 1998). Außerdem können die TAp63-Isoformen über verschiedenen Mechanismen die Ausbildung von Metastasen inhibieren (Su et al. 2010). Dahingegen agieren die Δ Np63-Isoformen wahrscheinlich eher als Onkogen und fördern die Karzinogenese. Die Δ Np63-Isoformen können sowohl die Transkription von Genen als auch die Proteine TAp63, TAp73, und p53 inhibieren (Chen et al. 2018; Yang et al. 1998). Die Inhibition von p53 wirkt begünstigend auf die Karzinogenese.

Trotz der wichtigen Rolle die p63 in Karzinomen einnimmt, ist das Gen im Vergleich zu p53 relativ selten mutiert (Chen et al. 2018; Mangiulli et al. 2009). In Kopf-Halstumoren wurden in nur 7% der untersuchten Proben p63-Mutationen, jedoch in 62% eine Mutation im p53-Gen nachgewiesen (Stransky et al. 2011). Neben einem Funktionsverlust von p63 werden in Plattenepithelkarzinomen häufig Amplifikationen des Gens gefunden (Mangiulli et al. 2009; Chen et al. 2018; Kaufmann et al. 2001). Das Vorkommen dieser

Amplifikationen von p63 wurde in verschiedenen Studien auch bei HNSCC bestätigt (Yamaguchi et al. 2000; Perdomo et al. 2018). Ebenso wurden Amplifikationen und eine Überexpression von Δ Np63-Isoformen bspw. in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (*non-small cell lung cancer*; NSCLC) nachgewiesen (Massion et al. 2003). In beiden Tumorentitäten war dies mit einer guten Überlebensprognose assoziiert. Auch in Plattenepithelkarzinomen der Brust und des Ösophagus wurde eine vermehrte Expression von Δ Np63-Isoformen nachgewiesen (Matos et al. 2005; Hu et al. 2002). Ein Funktionsverlust von p63 wurde besonders bei Karzinomen der Harnblase beschrieben und mit einer schlechten Überlebensprognose in Verbindung gebracht (Koga et al. 2003; Urist et al. 2002). Verschiedene Autoren haben nachgewiesen, dass p63 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs nach immunhistochemischer Anfärbung mehrheitlich exprimiert wird. Dabei ist die Δ Np63 α -Isoform oft vorherrschend (Snizek et al. 2004; Hibi et al. 2000; Nylander et al. 2000; Thurfjell et al. 2004). Des Weiteren zeigen Daten, dass HNSCC-Patienten mit starker Expression von Δ Np63 α in den Tumorproben, ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Cisplatin hatten, was auf eine prognostisch Relevanz von p63 hindeutet (Zangen et al. 2005).

Einige Studien haben nachgewiesen, dass HPV die Expression zellulärer microRNAs steigern kann (Wang et al. 2008; Reshmi und Pillai 2008). Diese microRNAs sind kurze nicht codierende RNAs, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. HR-HPV kann während der Differenzierung von Keratinozyten die Expression von miR-203 herabregulieren, was mit einer erhöhten Expression von Δ Np63 einher geht (Melar-New und Laimins 2010). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Expression der E6 und E7 Gene von HPV zu einer gesteigerten Expression von p63 führt (Srivastava et al. 2017). Als gesichert gilt, dass die Onkoproteine E6 und E7 die Expression von p63 regulieren können und so die Entstehung von Tumoren beeinflussen können.

1.5 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der aktivierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg übernimmt bei verschiedenen Tumorentitäten unter anderem auch bei den OPSCC wichtige Funktionen in der Karzinogenese (Rampias et al. 2010; Clevers und Nusse 2012; Lin et al. 2013; Rodríguez-Sastre et al. 2005; Krausova und Korinek 2014). Im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert β -Catenin als Transkriptions-Cofaktor die Aktivierung von Genen der Zellproliferation und Differenzierung (Abbildung 27b). Ohne Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wird freies, zytoplasmatisches β -Catenin im Proteasom abgebaut und kann seine Funktion im Nukleus als Transkriptionscofaktor nicht einnehmen (Anhang: Abbildung 27a).

Bei Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wird β -Catenin stabilisiert und wirkt im Nukleus als Transkriptionscofaktor (Kim et al. 2013; Clevers und Nusse 2012). So wird die Transkription von Genen aktiviert, die unter anderem zu einem fehl-regulierten Zellzyklus und einer beschleunigten Zellproliferation führen (Gao et al. 2014; Huang et al. 2013; Kaelin 1999; Jung et al. 2001). Wie bereits zuvor erwähnt, ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg unter anderem in vielen Malignomen aktiv und bewirkt eine Dysregulation von molekularen Prozessen, welche Einflüsse auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen haben (Muñoz-Bello et al. 2018).

Des Weiteren kann eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs begünstigend auf die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) wirken (Howard et al. 2011). Die EMT ist ein Prozess bei dem epitheliale Zellen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen gewinnen und epitheliale Eigenschaften verlieren. Beispiele hierfür sind eine erhöhte Fähigkeit zur Zellmigration, Invasion und Resistenz gegenüber der Apoptose. In der Karzinogenese führt die EMT unter anderem zu einer erhöhten Tumorprogression und Metastasierung (Kiemer et al. 2001).

In unserem Kollektiv wurde die Subgruppe mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem Auftreten von Lokalrezidiven bzw. Fernmetastasen (LR/FM) identifiziert. Diese Fälle zeichnen sich durch aggressive Eigenschaften der Tumoren aus, die mit einer schlechten Überlebensprognose einhergehen. Speziell bei HPV-assoziierten Malignomen wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch durch den besonderen viralen Einfluss hochreguliert (Bonilla-Delgado et al. 2012). Diese Aktivierung (vgl. hierzu Kapitel 1.5.1) könnte bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC in der Ausbildung eines LR/FM resultieren. Beispielsweise könnte die gesteigerte Zellinvasion und Metastasierungstendenz (vgl. EMT) zum Auftreten von Lokalrezidiven bzw. Fernmetastasen führen.

1.5.1 Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch RIPK4, p63 und HPV

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, spielt RIPK4 in verschiedenen Signalwegen eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird die Funktion von RIPK4 speziell im Wnt/ β -Catenin-Signalweg erläutert (vgl. Anhang: Abbildung 28). In verschiedenen Zelllinien wurde nachgewiesen, dass durch eine Ausschaltung von RIPK4 die Wnt-abhängige Anreicherung von β -Catenin im Nukleus und auch die Transkription Wnt-abhängiger Gene reduziert wird. Ebenso wurde herausgefunden, dass RIPK4 Dvl phosphoryliert, was die Anlagerung des *destruction*-Komplex begünstigt und so zu einer Stabilisierung von β -Catenin führt (Huang et al. 2013). Folglich werden auch die Wnt-abhängigen Gene verstärkt transkribiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass RIPK4 durch die

Phosphorylierung von Dvl zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt und so die Karzinogenese begünstigt (Huang et al. 2013).

Die Transkription von RIPK4 kann durch die Δ Np63 α -Isoformen begünstigt werden (Mitchell et al. 2012). Dadurch wirken diese einerseits indirekt auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein, andererseits übernehmen sie auch eine direkte modulierende Funktion. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass die Δ Np63-Isotypen die Wirkung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs verstärken können (Patturajan et al. 2002). Jedoch wurde in einer anderen Veröffentlichung postuliert, dass sich diese Aussage primär auf die überexprimiert vorliegenden Δ Np63 α -Isoformen bezieht (Drewelus et al. 2010). Ebenso wurde gezeigt, dass p63 den Wnt/ β -Catenin-Signalweg je nach Expressionslevel sowohl verstärken als auch inhibieren kann. Bei einer endogenen, physiologischen Expression von p63 wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg herabreguliert und die Transkription von Genen ist vermindert. Dies könnte durch eine Anreicherung von Faktoren vermittelt werden, welche die Transkription inhibieren (Anhang: Abbildung 29 a). Wenn p63 dagegen überexprimiert vorliegt, kann der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch eine Hemmung der Transkriptionsinhibitoren verstärkt werden (Anhang: Abbildung 29 b).

Im Verlauf des Tumorwachstums variiert das Expressionslevel von p63. In frühen Tumorstadien bewirkt eine p63-Expression die Erneuerung und Proliferation von Tumorzellen (Wnt/ β -Catenin-Signalwegs aktiv). In den späteren Tumorstadien wird p63 häufig herabreguliert, da die Tumorzellen einen undifferenzierten und invasiveren Phänotyp einnehmen. Dennoch kann der Verlust von p63 zu einer Aktivierung der Wnt-abhängigen Transkription führen, wodurch ein invasives Wachstum sowie die Metastasierung begünstigt werden kann (Drewelus et al. 2010). Dies wurde auch durch eine weitere Studie bestätigt. In dieser konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von p63 in epithelialen Zellen zu einer Steigerung der Expression von Genen führen kann, die eine Invasion und Metastasierung begünstigen (Barbieri et al. 2006).

Eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde bei vielen unterschiedlichen Tumorentitäten allgemein, aber speziell auch bei HPV-assoziierten Tumoren nachgewiesen (Bonilla-Delgado et al. 2012). In einer Veröffentlichung konnte bestätigt werden, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in HPV-assoziierten OPSCC-Zelllinien aktiviert ist (Rampias et al. 2010). Hierbei hatten die viralen Onkogene E6 und E7 einen direkten Einfluss auf die Anreicherung von β -Catenin im Nukleus und damit auf die Gen-Transkription. Auch in einer anderen Untersuchung HPV-assoziiierter OPSCC-Zelllinien wurde eine erhöhte Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma und im Nukleus im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC-Zelllinien gezeigt (Weinberger et al. 2009). Daraus wurde geschlossen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Karzinogenese der

HPV-assoziierten OPSCC eine Rolle spielen könnte. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass bei HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC β -Catenin in der Membran reduziert und im Nukleus vermehrt exprimiert wurde (Hu et al. 2015). Zusätzlich wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass eine Verminderung von β -Catenin in der Membran mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Aktivierung des Signalwegs, durch verschiedene Faktoren (bspw. RIPK4, p63 oder HPV), zur Zellproliferation und Invasion führen kann. Auch die Begünstigung der EMT kann eine Folge dieser Aktivierung sein. Durch diese Erkenntnisse ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und der Entwicklung von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen im Verlauf einer Tumorerkrankung denkbar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde in dem Gesamtkollektiv der Gießener OPSCC-Patienten eine Subgruppe der HPV-assoziierten OPSCC-Patienten identifiziert, welche einen besonders schlechten Krankheitsverlauf aufwies. Trotz kurativem Therapieansatz traten bei diesen Patienten Lokalrezidive oder Fernmetastasen auf, was mit einer dramatisch verkürzten 5-Jahresüberlebensrate einhergeht. Auf Basis dieser Subgruppe wurde durch gezielte Auswahl eine Untersuchungskohorte gebildet. Diese besteht aus insgesamt 56 Patienten in 4 Untergruppen, die sich aus jeweils 14 Fällen mit HPV-assoziierten bzw. HPV-negativen OPSCC mit oder ohne LR/FM zusammensetzt.

Ein Ziel der Arbeit war es diese spezielle Patientengruppe besser zu definieren. Einerseits wurden klinische Daten analysiert, um Patienteneigenschaften, Risikofaktoren und Tumorcharakteristika zu ergründen. Andererseits wurden Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt, um mögliche Ursachen des schlechten Krankheitsverlaufs besser zu verstehen. Die Proteine RIPK4 und p63 können modulierend auf die Karzinogenese einwirken bspw. durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Hierdurch kann ein Fortschreiten des Tumors verstärkt werden, was folglich zu einem verkürzten Gesamtüberleben führen kann. Durch die immunhistochemische Anfärbung dieser Proteine im Tumorgewebe sollen Auffälligkeiten der Expression detailliert beschrieben und in Bezug zu den klinischen Daten gesetzt werden. Potenzielle Einflussfaktoren auf die Expression von RIPK4 und p63 wurden durch die gezielte Auswahl der Patientenfälle weitgehend ausgeschaltet. Dadurch können mögliche Interaktionen zwischen der Expression und der Überlebensprognose beschrieben werden.

Folgende Forschungsfragen finden in der vorliegenden Promotionsarbeit eine Beantwortung:

- Welche Eigenschaften sind bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit der Entwicklung eines schlechten Verlaufs assoziiert?
- Welche Faktoren korrelieren mit einer Expression von RIPK4 und p63 auf den Tumorschnitten der OPSCC-Untersuchungskohorte?
- Welche Zusammenhänge oder Unterschiede bestehen hinsichtlich der Expression von RIPK4 und p63 bei den untersuchten Patienten?

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Adhäsions-Objektträger Super Frost plus	R. Langenbrinck GmbH Labor- und Medizintechnik (R. Langenbrinck), 03-0060
Deckgläser, 18x18 mm	R. Langenbrinck, 01-1818/1
Deckgläser, 24x40 mm	R. Langenbrinck, 01-2440/1
Deckgläser, 21x26 mm	R. Langenbrinck, 01-2126/1
1,5 ml tube 1,5 ml Safe Lock tube 2 ml Safe Lock tube 1,5 ml protein low bind tube 1,5 ml DNA low bind tube	Eppendorf
Färbekammern	Carl Roth, HL98.1
Färbekasten Hellendahl	Carl Roth, H550.1
Färbekasten Schiefferdecker	Carl Roth, H551.1
Folienabschnitte zum Abdecken der Schnitte über Nacht (Vernichtungsbeutel 600*780mm)	Sarstedt
PAP-Pen for immunostaining	SigmaAldrich, Z672548-1EA
Microtom Klinge R35	Pfm medical, 207500005
Einmal-Pipetten 5ml 10ml 25ml 50ml	Greiner Bio-One, 606180 607180 760180 768160
Pipettenspitzen 10µl 200 µl 1000 µl	Nerbe plus Sarstedt Nerbe plus
Polypropylen Röhren CELLSTAR® 15ml 50ml	Greiner Bio-One, 188271 210270
slide staining jars easy dip	Simport, M900-12
slide staining rack easy dip	Simport, M905-12 DGY

2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Xylol	Carl Roth, CN80.1
Ethanol	Otto Fischar
Target Retrieval Solution (TRS) 10x, pH6	DAKO Agilent, S1699
Tris Base	Appllichem, A2264
Tween 20	Appllichem, A4974

Wasserstoffperoxid 30%	Appllichem, A1134, 0250
NaCl	Appllichem, A2942
HPLC-H ₂ O	Sigma Aldrich, 34877-2,5l
BSA, powder, ≥98%, essentially fatty acid free, essentially globulin free, für Immun-histochemie	Sigma-Aldrich, A7030-10G
HCl 37%	AppliChem
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, T865.1
ROTI®Histokitt II Einschlussmittel	Roth, T160.2
Eosin G Lösung 1%	Carl Roth, 3137.1

2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Menge	Bezeichnung
2% BSA in TBS	1 g ad 50 ml	Albumin Fraction V TBS 1x
TRS (pH 6) 1x	1 Teil 9 Teile	TRS (pH 6, 10x) ddH ₂ O
10x TBS-Puffer	12,1 g 40 g in 400 ml lösen pH 7,4 ad 500ml	Tris-Base NaCl VE H ₂ O mit HCl (10%) titrieren VE H ₂ O
TBST-Puffer	50 ml 500 µl ad 500 ml	TBS (10x) Tween VE H ₂ O
TRS/TBST (pH 6) 1:1	1 Teil 4 Teile 5 Teile	TRS (pH 6, 10x) ddH ₂ O TBST

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
p63	Santa Cruz, 0.N.498 sc-71827
RIPK4	Abgent, AP7808b

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Anti-mouse	Cell Signaling, 7076
Anti-rabbit	Cell Signaling, 7074

2.5 Reagenziensätze (Kits)

Tabelle 6: Kits

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
VECTOR® NovaRED® Peroxidase (HRP) Substrate Kit	VECTOR Laboratories, SK-4800
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Mouse IgG)	VECTOR Laboratories, PK-4002
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Rabbit IgG)	VECTOR Laboratories, PK-4001

2.6 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM2500
Mikroskopkamera	Leica, DFC425C
Magnetrührer	IKA, 0003339000
Inversmikroskop	Leica, DMI3000B
Mikrowelle	Sharp
Paraffin Streckbad	GFL®,1052
pH-Meter	HANNA® instruments, HI2211-02
Accu-jet Pro	Brand
Reiskocher	Tefal Steam Cuisine
Schlittenmikrotom	Leica Biosystems, SM2010 R
Wippschüttler PMR 30	GRANT INSTRUMENTS, 44-0341
Vortex-Schüttler lab dancer	VWR Collection, 444-0004
Trockenschrank	Binder, ED56
Waage	KERN®, PCB 2500-2
Mikrozentrifuge Heraeus Pico / Fresco Minizentrifuge	Thermo Fisher Scientific Kobe, Sprout/9945800
Pipetten Piptman L 0,2-2 µl 1-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Gilson, FA10001M FA10002M FA10003M FA10004M FA10005M FA10006M
Axio Scan.Z1	Zeiss

2.7 Software

Tabelle 8: Software

Bezeichnung	Hersteller
SPSS statistics, Version 27	IBM
Excel, Word, Power Point	Microsoft 356
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH
ZEN 2.6 blue edition	Zeiss

3. Methoden

3.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Im folgenden Abschnitt wird in einem ersten Schritt die Zusammenstellung des OPSCC-Gesamtkollektivs und anschließend der OPSCC-Untersuchungskohorte dargestellt (vgl. Abbildung 3). In das Gesamtkollektiv wurden Patienten mit malignen Tumorerkrankungen im Bereich des Oropharynx (Abbildung 1) eingeschlossen, welche in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des UKGM am Standort Gießen behandelt wurden. Im Zeitraum von Anfang 2000 bis einschließlich 2017 wurden insgesamt 825 solcher Patienten in Gießen dokumentiert.

Zur Differenzierung des HPV-Status wurde sowohl eine PCR-Untersuchung zur Bestimmung der HR-HPV-DNA im Tumorgewebe durchgeführt als auch eine immunhistochemische Färbung zu Bestimmung der Expression von p16^{INK4a} (Wagner et al. 2020; Prigge et al. 2017; Smeets et al. 2007). In das OPSCC-Gesamtkollektiv wurden 532 Patienten mit HPV-negativen und 200 Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC eingeschlossen. Bei 93 Patienten fehlt die histologische und molekularbiologische Differenzierung des HPV-Status, sodass diese Fälle nicht in das OPSCC-Gesamtkollektiv eingeschlossen wurden.

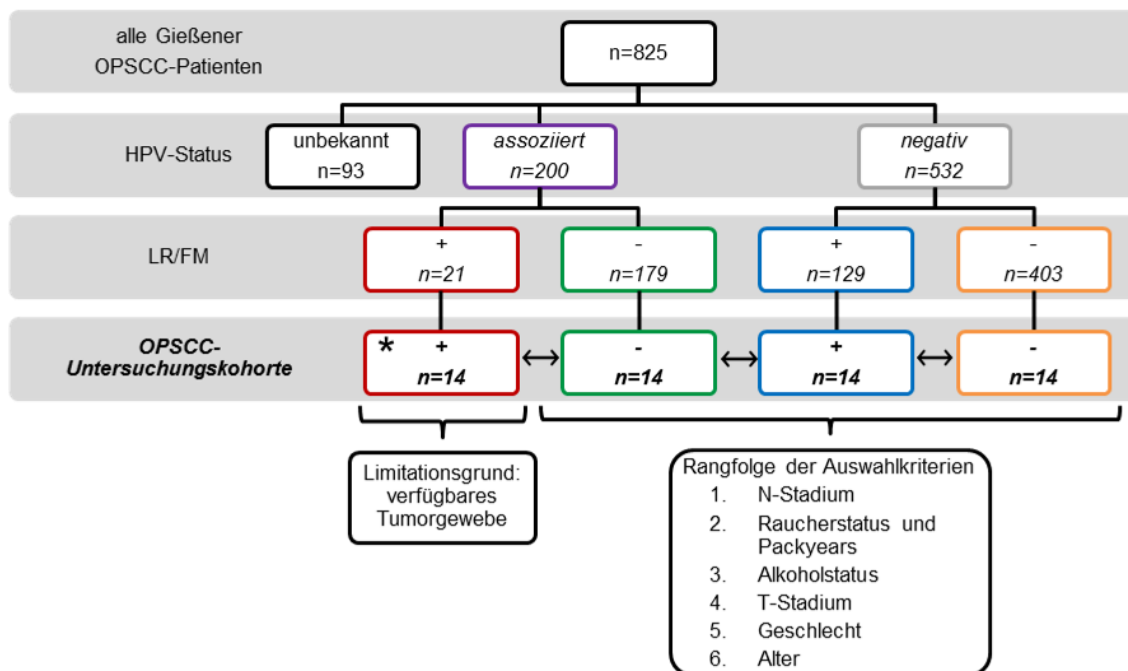


Abbildung 3: Überblick zur Zusammensetzung des Patientenkollektivs und Auswahl der OPSCC-Untersuchungskohorte

„+“ steht für das Auftreten eines LR/FM; „-“ steht für kein LR/FM; kursiv geschrieben entspricht dem OPSCC-Gesamtkollektiv n=732; kursiv und fett geschrieben entspricht der OPSCC-Untersuchungskohorte n=56; * entspricht der limitierenden Gruppe.

Für den experimentellen Teil der Arbeit wurde die OPSCC-Untersuchungskohorte gebildet. Die Grundlage zur Bildung dieser Kohorte, war eine Subgruppe unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC, die vom erwarteten Krankheitsverlauf HPV-assoziiierter Tumorpatienten abweicht. Diese Patientengruppe zeichnet sich durch das Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastasierung im Krankheitsverlauf sowie eine niedrige 5-Jahresüberlebensrate aus.

Es wurden nur Patienten eingeschlossen die initial ein kuratives Therapieregime erhalten hatten. Zur kurativen Behandlung wurde entweder eine definitive Radio(chemo)therapie oder eine Operation mit ggfs. adjuvanter Radio(chemo)therapie durchgeführt. Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte standen 21 Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem LR/FM zur Verfügung (in Abbildung 3 rot umrandet). Jedoch war lediglich bei 14 Patienten ausreichend Untersuchungsmaterial für die angestrebten Versuche vorhanden (in Abbildung 3 rot umrandet mit * markiert entspricht der limitierenden Gruppe).

Diese limitierende Gruppe bildet die Basis zur Erstellung der OPSCC-Untersuchungskohorte. Aus dem OPSCC-Gesamtkollektiv wurden Patienten gesucht, die der limitierenden Gruppe in wichtigen Kriterien gleichen. In der folgenden Auflistung sind die Auswahlkriterien in absteigender Reihenfolge genannt: N-Status, Raucherstatus und *packyears* (vgl. hierzu Kapitel 3.2), Alkoholstatus, T-Stadium, Geschlecht und Alter.

Durch die gezielte Auswahl wurden möglichst viele Störfaktoren ausgeschaltet, wodurch eine Evaluation der RIPK4- und p63-Expression weitgehend unabhängig von potenziellen Einflussfaktoren durchgeführt werden kann. Ebenso kann ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Überlebensprognose hergestellt werden. Da die OPSCC-Untersuchungskohorte nach einem definierten Schema ausgewählt wurde, liegt keine Zufallsstichprobe vor.

3.2 Einteilung der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika

Ein Großteil der klinischen Daten wurde anhand von Dokumentationen aus der digitalen Patientenakte erhoben. Zu den erfassten Patientendaten zählt neben dem Geschlecht, das Alter bei Diagnosestellung und der Allgemeinzustand nach ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group* vgl. hierzu Anhang: Tabelle 32). In der vorliegenden Arbeit wurden die Schweregrade 0-1 als „gesund“ und 2-4 als „krank“ definiert. Bei der Erfassung weiterer Risikofaktoren wurde ein Schwerpunkt auf die Quantifizierung des Abusus von Alkohol und Nikotin bzw. anderen Tabakwaren gelegt. Der Alkoholkonsum wurde anhand der Einteilung in Standardgläser erfasst (1 Standardglas entspricht ca. 10g Alkohol). In die Kategorie regelmäßiger Alkoholkonsum wurden Patienten eingeordnet, die

angegeben haben mehr als 2 Standardgläser Alkohol pro Tag zu trinken. Weniger oder gleich 2 Standardgläser Alkohol pro Tag wurde als kein/geringer Alkoholkonsum gewertet. Patienten, die in der Vergangenheit einen regelmäßigen Alkoholkonsum hatten wurden nicht separat eingeteilt.

Der Raucher-Status wurde anhand der täglich gerauchten Zigaretten festgelegt. Der Konsum anderer Tabakwaren wurde dem Zigarettenrauchen gleichgestellt. Als Nicht-Raucher zählen alle Patienten, die nie geraucht haben, bzw. den Nikotinabusus mindestens 16 Jahre vor der OPSCC-Diagnosestellung sistiert haben. Das Risikoprofil der ehemaligen Raucher gleicht sich über die abstinenten Jahre hinweg dem der Nichtraucher an. So entspricht bspw. das kardiovaskuläre Risiko eines 15 Jahre abstinenten Rauchers in etwa dem eines Nichtrauchers, ähnliches gilt auch im Hinblick auf das Krebsrisiko (Schaller et al. 2020; American Cancer Society). Die Menge gerauchter Zigaretten wurde anhand der *packyears* (py) quantifiziert. Eine gerauchte Packung Zigaretten pro Tag während des Zeitraums eines Jahres entspricht dabei einem *packyear*.

Die Tumorcharakteristika wurden anhand der TNM-Klassifikation sowie nach UICC eingeteilt (vgl. Anhang: Tabelle 30 und Tabelle 31). In der 2017 erneuerten Version (UICC8) wurde der Aspekt des HPV-Status der Tumoren in die Einteilung des Stadiums mit einbezogen. Um eine bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich des UICC-Stadiums zu gewährleisten, wurden soweit möglich alle Fälle, ungeachtet des Datums der Erstdiagnose, rückwirkend sowohl nach der UICC7- als auch nach der UICC8-Version einem Tumorstadium zugeordnet. Folglich sind alle Fälle nach beiden UICC-Versionen eingeteilt.

3.3 Tumorproben und Gewebeschnitte

Für diese Arbeit standen Proben der in Paraffin eingebetteten OPSCC-Tumorpräparate (FFPE-Blöcke) zur Verfügung. Alle Patienten des OPSCC-Gesamtkollektivs hatten einer Verwendung ihrer Daten und Tumorpräparate zu Forschungszwecken zugestimmt.

Mit dem Schlittenmikrotom wurden von den FFPE-Blöcken Schnitte von 3,5 µm Dicke angefertigt. Nachdem sich die Schnitte im Paraffin Streckbad bei 37°C gleichmäßig entfaltet haben, wurden sie auf Objektträger aufgezogen über Nacht bei 37°C in einen Trockenschrank gelegt.

3.4 HE-Färbung

Zur Identifizierung des Tumoranteils wurden einzelne Schnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Hämalaun lässt die Zellkerne in blau-violetter Farbe erscheinen. Eosin färbt das Zytoplasma rot (Welsch 2009). Hierfür wurde das folgende Protokoll angewendet:

- Entparaffinieren
2x 10 min Xylol
- Rehydrieren
2x 5 min 100% Ethanol
2x 5 min 96% Ethanol
1x 5 min 70% Ethanol
- kurz (durch zweimaliges Eintauchen) in Küvette mit VE-H₂O waschen
- 2 min in Hämalaun-Lösung einstellen
- 15 min unter vorsichtig fließendem Leitungswasser bläuen
- 5 min in Eosin-Lösung einstellen
- kurz in Küvette mit VE-H₂O waschen (wie oben)
- Dehydrieren:
kurz in 70% Ethanol
2x 1 min 96% Ethanol
2x 3 min 100% Ethanol
1x 2 min Xylol
1x 5 min Xylol
- Eindecken mit ROTI Histokitt II und Deckgläsern

3.5 Immunhistochemische Färbung

Die ausgewählte Untersuchungskohorte bestehend aus 56 Patienten wurde immunhistochemisch gefärbt. Es wurde die Methode der indirekten Immunhistochemie genutzt, bei der ein Primärantikörper an ein spezifisches Epitop bindet. An den Primärantikörper kann ein Sekundärantikörper binden, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Hier wurde die *Avidin-Biotin-Complex-Methode* (ABC) zur Darstellung von Antigenen genutzt. An den Primärantikörper bindet ein spezieller mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper. Avidin hat eine hohe Affinität zu Biotin, an das Peroxidasen gebunden sind. Durch die Peroxidasen kann in einer Reaktion ein Farbstoff aktiviert werden (Vectorlabs). Bei unseren Versuchen wurde das Nova Red Peroxidase Substrat genutzt. Die Anfärbung des Epitops erfolgt nur, wenn der Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet.

Pro Färbedurchgang wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt, um die Vergleichbarkeit zwischen den gefärbten Schnitten zu gewährleisten. Während

des gesamten Färbeprozess muss darauf geachtet werden, dass die Gewebeschnitte nicht trocken werden. Zur immunhistochemischen Färbung wurde folgendes Protokoll angewandt:

Tag 1:

- Entparaffinieren
2x 10 min Xylol
- Rehydrieren
2x 5 min 100% Ethanol
2x 5 min 96% Ethanol
1x 5 min 70% Ethanol
- kurz (durch zweimaliges Eintauchen) in Küvette mit VE-H₂O waschen
- Epitop-Demaskierung mit TRS DAKO pH 6
45 min im Dampfgarer erhitzen
- 30 min bei Raumtemperatur abkühlen
- 5 min in 1:1 Mischung aus TRS DAKO pH 6 und TBST
- Waschen mit VE-H₂O (wie oben)
- Hydrophobe Barriere auftragen mit dem PAP-Pen
- Inaktivieren der endogenen Peroxidasen
20 min Inkubation in 3% H₂O₂ in HPLC-H₂O
- Waschen mit VE- H₂O (wie oben)
- Waschen mit TBST-Puffer
- 40 min Blocken mit 2% BSA für Immunhistochemie in TBST
- Waschen mit TBST-Puffer
- Primärantikörper über Nacht bei 4°C (vgl. hierzu Kapitel 3.5.1 und Kapitel 3.5.2)

Tag 2:

- Primärantikörper abpipettieren
- Waschen mit TBST-Puffer
- Sekundärantikörper Biotin gekoppelt: 1h bei Raumtemperatur (vgl. hierzu Kapitel 3.5.1 und Kapitel 3.5.2)
- Waschen mit TBST-Puffer
- Bildung eines Komplex durch Bindung von Avidin an Biotin, das an den Sekundärantikörper gekoppelt ist:
40 Min ABC-Mix
- Waschen mit TBST-Puffer

- Detektion und Freisetzung eines roten Farbstoffs durch Peroxidasereaktion
25 min mit Nova Red Peroxidase Substrat
- Waschen mit VE- H₂O (wie oben)
- 1,20 min in Häkalaun
- 10 min bläuen in Leitungswasser
- Dehydrieren
 - kurz in 70% Ethanol
 - 2x 1 min 96% Ethanol
 - 2x 3 min 100% Ethanol
 - 1x 2 min Xylol
 - 1x 5 min Xylol
- Eindecken mit ROTI Histokitt II Einschlussmittel und Deckgläsern

3.5.1 RIPK4-Färbung

Für die immunhistochemische Färbung mit RIPK4 wurden die Arbeitsschritte durchgeführt, wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Der Antikörper RIPK4 (AP7808b) von Abgent wurde für die Färbung genutzt. Dieser bindet an das C-terminale Ende des Proteins gegen die Aminosäuren 802-832. So werden beide Isoformen von RIPK4 angefärbt.

Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung 1:1000 aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen wird der Biotin gekoppelte Anti-Hase Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:160 angewandt. Nach einer Inkubation von 1h bei Raumtemperatur folgt die Detektion durch die ABC-Methode und Nova Red Peroxiase Substrat.

3.5.2 p63-Färbung

Für die Färbung mit dem p63-Antikörper werden die oben genannten Arbeitsschritte durchgeführt. Der monoklonale p63-Antikörper von Santa Cruz (0.N.498) wurde für die Färbung ausgewählt. Dieser bindet die N-terminalen Aminosäuren 1-205 der ΔNp63-Isoform. Da die Aminosäuresequenz des Antikörpers in weiten Teilen mit den p63-Isoformen übereinstimmt, kann davon ausgegangen werden, dass alle p63-Isoformen dargestellt werden (vgl. Abbildung 2).

Nach dem Blocken und Waschen der Schnitte, wird anschließend der p63-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Daran anschließend wird der Primärantikörper abpipettiert und es folgt das Waschen mit TBST. Da der p63-Primärantikörper in der Maus als Wirt-

stier hergestellt wurde, wird ein Biotin gekoppelter Anti-Maus Sekundärantikörper angewandt. Dieser wird 1:180 verdünnt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt die Färbereaktion mittels Nova Red Peroxidase Substrat.

3.6 Mikroskopische Auswertung der Färbung

Nach Fertigstellung der immunhistochemischen Färbung wurden die gefärbten Schnitte mit ZEISS Axio Scan.Z1 gescannt. Alle Bilddateien wurden unter Anwendung der ZEN Imaging Software ZEN 2.6 blue edition von zwei unabhängigen Auswertern bewertet. Zuerst wurden die Schnitte auf das Vorhandensein von gesundem Epithelgewebe untersucht. Wobei es sich um eine dichotome Auswahl handelte und zwischen den Optionen „Epithel vorhanden“ oder „kein Epithel vorhanden“ gewählt werden konnte. Die Expression im gesunden Plattenepithel wurde als „interne Kontrolle“ betrachtet, da RIPK4 und p63 sowohl malignes Gewebe als auch zu einem gewissen Grad das nichtmaligne Gewebe anfärben (Liu et al. 2015; Nekulova et al. 2011). Um die Qualität innerhalb der gesamten Färbungskohorte zu gewährleisten, wurde jeder Schnitt mit der entsprechenden Positivkontrolle verglichen, die bei jedem Färbedurchgang mitgeführt wurde.

Das Hauptaugenmerk lag auf der Beurteilung der Expression im Tumorgewebe. Bei jedem Schnitt wurde die Intensität der Expression als prozentualer Anteil hinsichtlich der drei Kategorien „stark, mittel, schwache, und keine“ Färbung festgehalten. Aus der Prozentzahl des nicht angefärbten Tumorteils und den drei Färbekategorien ergab sich eine Gesamtsumme von 100%.

Aus diesen erhobenen prozentualen Werten für die Kategorien ungefärbt, schwach, mittel und stark gefärbt wurden anhand der folgenden Formel eine nominalskalierte Variable berechnet. Diese gibt auf einer Skala von 0-3 die Intensität der Expression der Schnitte an.

$$\frac{(\text{Anteil ungefärbt} * 0) + (\text{Anteil schwach} * 1) + (\text{Anteil mittel} * 2) + (\text{Anteil stark} * 3)}{3}$$

Anhand dieser Nominalskala wurde eine Differenzierung in „schwach bzw. stark gefärbt“ mit dem Median als *cut-off* Wert gewählt.

4. Ergebnisse

4.1 Vorstellung des OPSCC-Gesamtkollektivs hinsichtlich der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika

4.1.1 Deskriptive Auswertung des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status

Im Zeitraum von 2000 bis einschließlich 2017 wurden 825 Patienten mit OPSCC in der HNO-Klinik in Gießen registriert. Bei 732 Patienten wurde der HPV-Status des Tumors bestimmt (vgl. Abschnitt 3.1). Diese sind in der Arbeit als OPSCC-Gesamtkollektiv definiert. Die Daten zur Auswertung des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie mit Differenzierung nach dem HPV-Status sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Unter den getesteten Patienten wurde bei 532 (72,7%) ein HPV-negatives und bei 200 (27,3%) ein HPV-assoziiertes OPSCC diagnostiziert. Im OPSCC-Gesamtkollektiv befinden sich 162 (22,1%) Frauen und 570 (77,9%) Männer. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die Patienten zwischen 36,1 und 97,9 Jahre alt. Das mediane Alter lag bei 60,6 Jahren. Patienten mit HPV-negativen Tumoren waren bei Diagnosestellung signifikant jünger als die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren (Median 60,0 vs. 62,6 Jahren, $p=0,006$). 575 (80,9%) Patienten haben bejaht zu rauchen. 136 (19,1%) Patienten haben sich als Nichtraucher bezeichnet. Die kumulierte Menge an gerauchten Zigaretten variiert unter den Rauchern zwischen 2 und 132 py. Der Median liegt bei 38 py. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC liegt der Median der konsumierten *packyears* bei 40 und bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC bei 26 (Abbildung 4a).

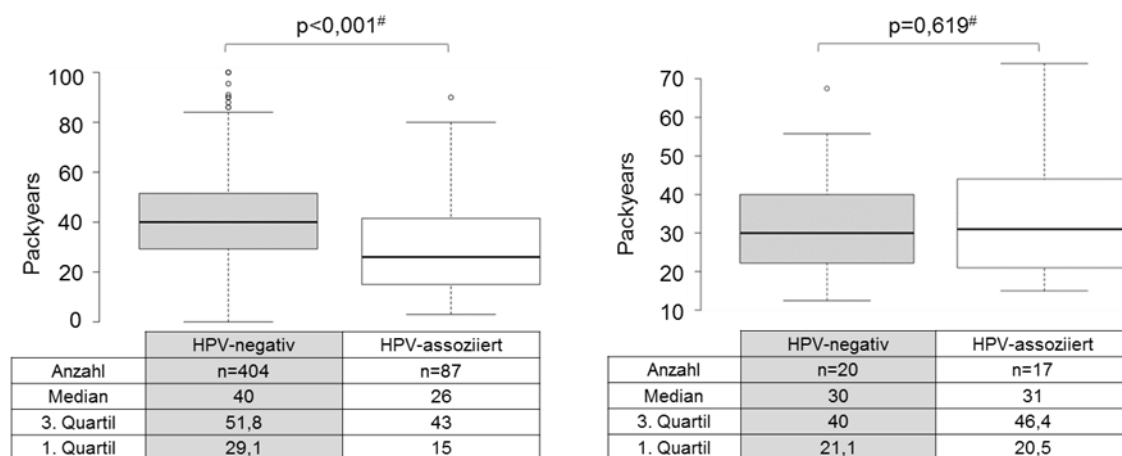


Abbildung 4: Konsumierte Packyears der Raucher a) des OPSCC-Gesamtkollektivs (n=491) und b) der OPSCC-Untersuchungskohorte (n=37) differenziert nach dem HPV-Status der OPSCC. # Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.

Insgesamt haben 345 (52,4%) Patienten angegeben >2 Standardgläser und 313 (47,6%) ≤2 Standardgläser Alkohol pro Tag zu konsumieren. Die Patientengruppe mit HPV-assoziierten OPSCC hat im Vergleich zu den Patienten mit HPV-negativen Tumoren ein signifikant geringeres Konsumverhalten im Hinblick auf Zigaretten und Alkohol (jeweils $p < 0,001$). 518 (71,3%) Patienten hatten ein ECOG-Stadium von 0-1 und damit wenige Einschränkungen in ihrer Lebensqualität und körperlichen Aktivität. Die verbleibenden 208 (28,7%) Patienten hatten ein ECOG-Stadium von 2-4. 69,9% (370/529) der Patienten mit HPV-negativen OPSCC und 75,1% (148/197) der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC hatten ein ECOG-Stadium von 0-1.

Tabelle 9: Risikofaktoren des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC.

		gesamt		HPV-negativ		HPV-assoziiert		p-Wert
		n=732	%	n=532	%	n=200	%	
Geschlecht	männlich	570	77,9	420	78,9	150	75,0	0,252*
	weiblich	162	22,1	112	21,1	50	25,0	
Alter bei Diagnose	Median	60,6		60		62,6		0,006#
	3. Quartil	67,9		66,8		72,2		
	1. Quartil	53,8		53,9		54,6		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	345	52,4	318	66,1	27	15,3	<0,001*
	≤2	313	47,6	163	33,9	150	84,7	
	unbekannt	74		51		23		
Rauchen	ja	575	80,9	471	90,6	104	54,5	<0,001*
	nein	136	19,1	49	9,4	87	45,5	
	unbekannt	21		12		9		
Packyears ¹	Median	38		40		26		<0,001#
	3. Quartil	50		51,8		43		
	1. Quartil	25		29,1		15		
	unbekannt	84		67		17		
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	518	71,3	370	69,9	148	75,1	0,170*
	krank (2-4)	208	28,7	159	30,1	49	24,9	
	0	45	6,2	28	5,3	17	8,6	0,054#
	1	473	65,2	342	64,7	131	66,5	
	2	175	24,1	131	24,8	44	22,3	
	3	28	3,9	23	4,3	5	2,5	
	4	5	0,7	5	0,9	0	0,0	
unbekannt	6		3		3			

* Chi, Asympt., 2-seitig; # Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=575); fett geschrieben: signifikante p-Werte

Die Daten zu den Tumorcharakteristika insgesamt, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status, werden in Tabelle 10 ausführlich gezeigt. Bei 373 (51,4%) Patienten wurde ein niedriges T-Stadium diagnostiziert und bei 353 (48,6%) Patienten ein hohes T-Stadium. Bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC hatte eine Mehrheit von 63,0% (126/198) ein niedriges T-Stadium wohingegen dies bei Patienten mit HPV-negativen Tumoren annähernd bei der Hälfte der Fall war (47,0%; $p < 0,001$). Bei der Auswertung des N-Stadiums wurden insgesamt bei 530 (73,5%) Patienten befallene Lymphknoten festgestellt. Bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC (86,9%) wurde signifikant häufiger ein maligner Befund in den Lymphknoten festgestellt, als bei den Patienten mit HPV-negativen Tumoren (68,4 %; $p < 0,001$). In dem OPSCC-Gesamtkollektiv hatten 258

(35,7%) Patienten ein niedriges und 464 (64,3%) ein fortgeschrittenes UICC7-Stadium (>III). Bei der Einteilung nach UICC8 hatten mehr Patienten (346/667; 51,9%) ein Tumorstadium von I-III. Nach UICC7 hatten 36,2% der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ein Stadium von I-III. Dahingegen hatten die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit einer signifikanten Mehrheit von 88,8% (166/187) ein niedriges UICC8-Stadium ($p < 0,001$). Die Aufteilung der Tumorstadien nach UICC7 bzw. UICC8 bei den Patienten mit HPV-negativen Tumoren blieb weitgehend unverändert (37,5% vs. 36,6%).

Tabelle 10: Tumorcharakteristika der Patienten allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC.

		gesamt		HPV-negativ		HPV-assoziiert		p-Wert
		n=732	%	n=532	%	n=200	%	
T-Stadium	0-2	373	51,4	247	47,0	126	63,0	<0,001*
	3-4	353	48,6	279	53,0	74	37,0	
	0	1	0,1	0	0,0	1	0,5	<0,001#
	1	163	22,5	115	21,9	48	24,0	
	2	209	28,8	132	25,1	77	38,5	
	3	151	20,8	116	22,1	35	17,5	
	4	41	5,6	29	5,5	12	6,0	
	4a	74	10,2	57	10,8	17	8,5	
	4b	87	12,0	77	14,6	10	5,0	
unbekannt	6		6		0			
N-Stadium	N0	191	26,5	165	31,6	26	13,1	<0,001*
	N+	530	73,5	357	68,4	173	86,9	
	N0	191	26,5	165	31,6	26	13,1	0,610#
	N1	119	16,5	62	11,9	57	28,6	
	N2-N2a	69	9,6	40	7,7	29	14,6	
	N2b	219	30,4	154	29,5	65	32,7	
	N2c	92	12,8	75	14,4	17	8,5	
	N3	31	4,3	26	5,0	5	2,5	
unbekannt	11		10		1			
M-Stadium	M0	655	92,1	476	91,9	179	92,7	0,707*
	M+	56	7,9	42	8,1	14	7,3	
	unbekannt	21		14		7		
Lokalisation	Tonsille	303	41,6	184	34,8	119	59,5	<0,001*
	nicht Tonsille	426	58,4	345	65,2	81	40,5	
	unbekannt	3		3		0		
UICC7 Stadium	I-III	258	35,7	186	35,6	72	36,2	0,877*
	>III	464	64,3	337	64,4	127	63,8	
	I	65	9,0	60	11,5	5	2,5	0,896#
	II	65	9,0	54	10,3	11	5,5	
	III	128	17,7	72	13,8	56	28,1	
	IV-IVa	313	43,4	214	40,9	99	49,7	
	IVb	93	12,9	81	15,5	12	6,0	
	IVc	58	8,0	42	8,0	16	8,0	
unbekannt	10		9		1			
UICC8 Stadium	I-III	346	51,9	180	37,5	166	88,8	<0,001*
	>III	321	48,1	300	62,5	21	11,2	
	I	146	21,9	63	13,1	83	44,4	<0,001#
	II	100	15,0	50	10,4	50	26,7	
	III	100	15,0	67	14,0	33	17,6	
	IV-IVa	212	31,8	192	40,0	20	10,7	
	IVb	79	11,8	79	16,5	0	0,0	
	IVc	30	4,5	29	6,0	1	0,5	
unbekannt	65		52		13			

* Chi, Asympt., 2-seitig; # Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.1.2 Deskriptive Auswertung des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie aufgeteilt nach dem HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM

Zur Auswertung der Patienten des OPSCC-Gesamtkollektivs wurde zunächst eine Aufteilung nach dem HPV-Status vorgenommen (Kapitel 4.1.1). Im Folgenden wurden die Patienten weiterhin hinsichtlich des Auftretens eines LR/FM untersucht. Die Auswertung im nachfolgenden Kapitel erfolgt auf Basis der folgenden vier Gruppen (Abbildung 3):

- Patienten mit HPV-negativen Tumoren
 - „LR/FM-“: ohne Lokalrezidiv oder Fernmetastasen n=403
 - „LR/FM+“: mit Lokalrezidiv oder Fernmetastasen n=129
- Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren
 - „LR/FM-“: ohne Lokalrezidiv oder Fernmetastasen n=179
 - „LR/FM+“: mit Lokalrezidiv oder Fernmetastasen n=21

Die Daten zur Verteilung der allgemeinen Risikofaktoren innerhalb dieser vier Gruppen finden sich in Tabelle 11. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit einem LR/FM befinden sich, anders als bei den drei anderen Gruppen, über 10% mehr männliche Patienten (87,6%). Zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Geschlechterverteilung ($p=0,020$). Beim Blick auf das Alter bei Diagnosestellung zeigt sich ebenso ein signifikanter Unterschied ($p<0,001$). Das mediane Alter bei Diagnosestellung war bei den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit einem LR/FM mit 70,6 Jahren am höchsten. Bei allen anderen Gruppen lag das Alter bei Diagnosestellung, mit einem Median von ca. 60 Jahren, deutlich niedriger. Hinsichtlich des Alkoholkonsums besteht zwischen den vier Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p<0,001$). Abbildung 5 zeigt, dass die Menge an konsumiertem Alkohol in engem Bezug zum HPV-Status steht und weniger vom Auftreten eines LR/FM abhängt. Bei den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren hatte eine Mehrheit (über 80%) und bei denen mit HPV-negativen OPSCC eine Minderheit (etwa 30%) einen geringen Alkoholkonsum angegeben. Bei Stratifizierung dieser Gruppen nach dem Auftreten eines LR/FM zeigen sich lediglich sehr geringe Unterschiede.

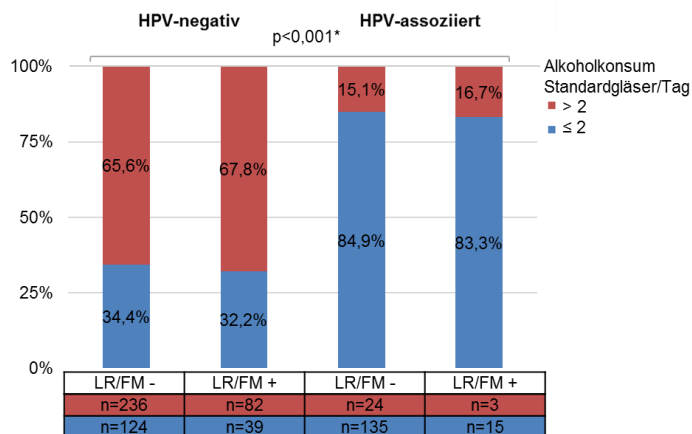


Abbildung 5: Verteilung des Alkoholkonsums im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. * Der p-Wert wurde mittels Chi Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.

Jeweils annähernd 55% der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC, ohne bzw. mit LR/FM zählten zu den Rauchern. Im Vergleich dazu waren jeweils 90,6% der Patienten mit HPV-negativen Tumoren Raucher. Innerhalb der vier Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Nikotinkonsums ($p < 0,001$). Abbildung 6 zeigt, dass zwischen dem Raucherstatus und der Stratifizierung nach dem HPV-Status ein stärkerer Zusammenhang besteht als nach dem Auftreten eines LR/FM.

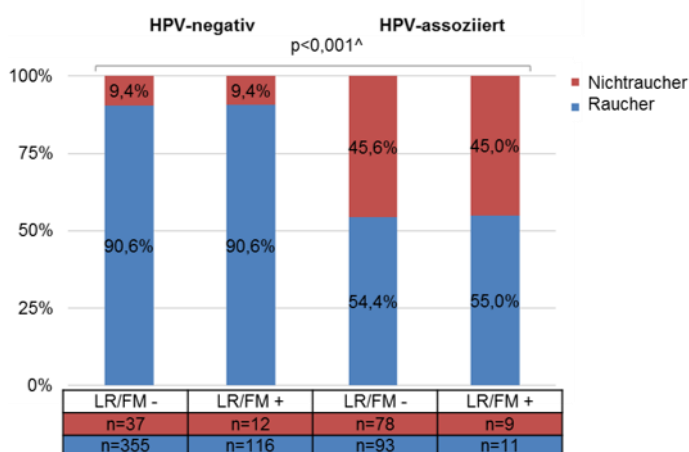


Abbildung 6: Verteilung des Raucherstatus im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton-Test (2-seitig) berechnet.

Bei der Quantifizierung des Rauchens zeigte sich, dass die Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren ohne LR/FM kumuliert am wenigsten geraucht hat (Median 26 py). Im Vergleich dazu liegt die Anzahl gerauchter py der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM (Median 35,5 py) näher an der Anzahl der Patienten mit HPV-negativen OPSCC unabhängig vom Auftreten eines LR/FM (Median jeweils 40 py). Hinsichtlich dieser Verteilung besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$).

Unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem LR/FM hatte eine Mehrheit von 60% (12/20) eine starke Einschränkung des Allgemeinzustands (2-4 nach ECOG). In den anderen drei Gruppen war jeweils eine Minderheit von etwa 20-30% in der ECOG

Kategorie von 2-4. Bei der Aufteilung der vier Gruppen nach dem ECOG-Stadium zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$; Abbildung 7).

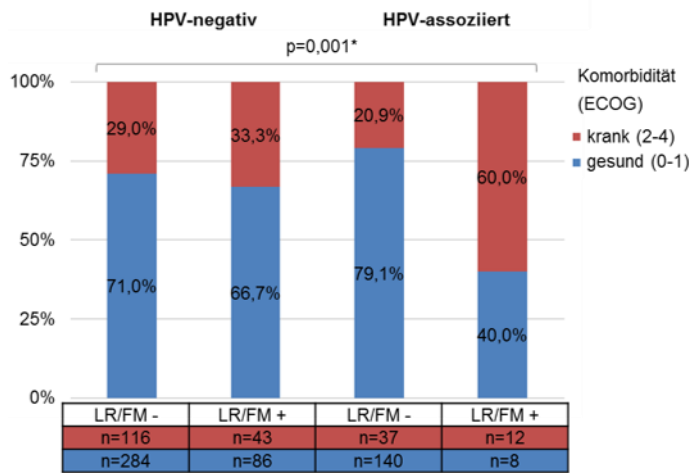


Abbildung 7: Verteilung des ECOG-Stadiums im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. * Der p-Wert wurde mittels Chi Test Asympt., 2-seitig) berechnet.

Tabelle 11: Risikofaktoren der Patienten allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten eines LR/FM.

		gesamt		HPV-negativ				HPV-assoziiert				p-Wert
				LR/FM -		LR/FM +		LR/FM -		LR/FM +		
		n=732	%	n=403	%	n=129	%	n=179	%	n=21	%	
Geschlecht	männlich	570	77,9	307	76,2	113	87,6	135	75,4	15	71,4	0,020 [^]
	weiblich	162	22,1	96	23,8	16	12,4	44	24,6	6	28,6	
Alter bei Diagnose	Median	60,6		60,6		58,9		61,8		70,6		<0,001 ^v
	3. Quartil	67,9		67,1		65,8		53,8		79,5		
	1. Quartil	53,8		54,5		52		71,1		58,2		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	345	65,6	236	65,6	82	67,8	24	15,1	3	16,7	<0,001 [*]
	≤2	313	34,4	124	34,4	39	32,2	135	84,9	15	83,3	
Rauchen	unbekannt	74		43		8		20		3		<0,001 [^]
	ja	575	80,9	355	90,6	116	90,6	93	54,4	11	55,0	
	nein	136	19,1	37	9,4	12	9,4	78	45,6	9	45,0	
Packyears ¹	unbekannt	21		11		1		8		1		<0,001 [°]
	Median	38		40		40		26		35,5		
	3. Quartil	50		50		57,1		41,5		57,8		
	1. Quartil	25		27,8		30		12,9		23,8		
Komorbidität (ECOG) ²	unbekannt	84		52		15		16		1		0,001 [*]
	gesund (0-1)	518	71,3	284	71,0	86	66,7	140	79,1	8	40,0	
	krank (2-4)	208	28,7	116	29,0	43	33,3	37	20,9	12	60,0	

[^] Fisher-Freeman-Halton 2-seitig; ^v einfaktorielle Varianzanalyse; ^{*} Chi, Asympt., 2-seitig; [°] Kruskal-Wallis, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=575); ² aufgrund der Übersichtlichkeit wurde nur die dichotomisierte Ausprägung untersucht; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Im folgenden Abschnitt wird die Ausprägung von tumorassoziierten Eigenschaften des OPSCC-Gesamtkollektivs betrachtet. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 12 zu finden. Die Untersuchung zur Einteilung der Tumorstadien ergab, dass die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM mit einer Mehrheit von 65,9% (118/179) ein niedriges T-Stadium von 0-2 hatten. Bei den anderen Gruppen war dies signifikant seltener der Fall ($p<0,001$). Hier lagen mehrheitlich (jeweils über 50%) hohe T-Stadien von 3-4 vor. Auch die Untersuchung des N-Stadiums zeigt einen signifikanten Unterschied ($p<0,001$). Unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC, unabhängig vom Auftreten eines LR/FM, hatte eine Mehrheit von über 85% der Fälle einen positiven Lymphknotenstatus. Dahingegen hatten die Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit und ohne

LR/FM nur in etwa 70% der Fälle befallenen Lymphknoten. Bei einer deutlichen Mehrheit der Patienten wurden keine Fernmetastasen (92,1%) nachgewiesen. In den Gruppen der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren ohne LR/FM sowie mit HPV-negativen OPSCC mit bzw. ohne LR/FM wurde bei einer deutlichen Mehrheit ein M0-Stadium festgestellt. 50% der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und einem LR/FM entwickelten Fernmetastasen. Der Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ist signifikant ($p < 0,001$). Bei der Einteilung nach UICC7 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,162$). Die Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit und ohne LR/FM hatten jeweils in einer Minderheit der Fälle ein niedriges UICC8 Stadium von I-III. Ebenso hatten die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM nur in weniger als 40% der Fälle ein niedriges UICC8-Stadium von I-III. Dahingegen wurden die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM signifikant häufiger, in 95,2% (158/166) der Fälle, in ein UICC8-Stadium von I-III eingeteilt ($p < 0,001$). Die bekanntermaßen signifikante Häufung von HPV-assoziierten Tumoren in der Tonsille wurde auch in unseren Patientengruppen, unabhängig vom Auftreten eines LR/FM bestätigt ($p < 0,001$).

Tabelle 12: Tumorcharakteristika der Patienten allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten eines LR/FM.

		gesamt		HPV-negativ				HPV-assoziiert				p-Wert
				LR/FM -		LR/FM +		LR/FM -		LR/FM +		
		n=732	%	n=403	%	n=129	%	n=179	%	n=21	%	
T-Stadium ²	0-2	373	51,4	183	46,1	64	49,6	118	65,9	8	38,1	<0,001*
	3-4	353	48,6	214	53,9	65	50,4	61	34,1	13	61,9	
	unbekannt	6		6		0		0		0		
N-Stadium ²	N0	191	26,5	131	33,2	34	26,8	23	12,9	3	14,3	<0,001*
	N+	530	73,5	264	66,8	93	73,2	155	87,1	18	85,7	
	unbekannt	11		8		2		1		0		
M-Stadium ²	M0	655	92,1	371	94,9	105	82,7	169	97,7	10	50,0	<0,001 [^]
	M+	56	7,9	20	5,1	22	17,3	4	2,3	10	50,0	
	unbekannt	21		12		2		6		1		
Lokalisation ²	Tonsille	303	41,6	147	36,8	37	28,7	105	58,7	14	66,7	<0,001*
	nicht Tonsille	426	58,4	253	63,3	92	71,3	74	41,3	7	33,3	
	unbekannt	3		3		0		0		0		
UICC7 Stadium ²	I-III	258	35,7	147	37,3	39	30,2	68	38,2	4	19,0	0,162*
	>III	464	64,3	247	62,7	90	69,8	110	61,8	17	81,0	
	unbekannt	10		9		0		1		0		
UICC8 Stadium ²	I-III	346	51,9	144	39,7	36	30,8	158	95,2	8	38,1	<0,001*
	>III	321	48,1	219	60,3	81	69,2	8	4,8	13	61,9	
	unbekannt	65		40		12		13		0		

* Chi, Asympt., 2-seitig; [^] Fisher-Freeman-Halton 2-seitig; ² aufgrund der Übersichtlichkeit wurde nur die dichotomisierte Ausprägung untersucht; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.2 Vorstellung der OPSCC-Untersuchungskohorte hinsichtlich der Risikofaktoren und Tumorcharakteristika

4.2.1 Deskriptive Auswertung der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status

Die Daten in Tabelle 13 und Abbildung 4b) zeigen, dass es sich bei der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgrund der gezielten Patientenauswahl um eine relativ gleichförmige Gruppe handelt. Bei dem OPSCC-Gesamtkollektiv besteht für alle Variablen, die zur Auswahl der OPSCC-Untersuchungskohorte angewandt wurden, ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC (Tabelle 10). Im Vergleich dazu finden sich bei der OPSCC-Untersuchungskohorte hinsichtlich der Auswahlvariablen keine signifikanten Unterschiede mehr, mit Ausnahme des Alkoholkonsums ($p=0,011$), der an dritter Rangfolge der Auswahlkriterien der OPSCC-Untersuchungskohorte stand. Bei dieser Variable war die homogene Verteilung der Patienten auf die Gruppen nicht möglich.

Tabelle 13: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC, in der Rangfolge der Auswahlkriterien.

		Rang	gesamt		HPV-negativ		HPV-assoziiert		p-Wert
			n=56	%	n=28	%	n=28	%	
N-Stadium	N0	1	5	8,9	3	10,7	2	7,1	1,000 ⁺
	N+		51	91,1	25	89,3	26	92,9	
	N0		5	8,9	3	10,7	2	7,1	0,727 [#]
	N1		9	16,1	5	17,9	4	14,3	
	N2-N2a		6	10,7	2	7,1	4	14,3	
	N2b		27	48,2	14	50,0	13	46,4	
N2c	9	16,1	4	14,3	5	17,9			
Rauchen	ja	2	37	66,1	20	71,4	17	60,7	0,397 [*]
	nein		19	33,9	8	28,6	11	39,3	
Packyears ¹	Median	2a	30		30		31		0,619 [#]
	3. Quartil		40		40		46,4		
	1. Quartil		20,5		21,1		20,5		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	3	14	25,5	11	40,7	3	10,7	0,011 [*]
	<2		41	74,5	16	59,3	25	89,3	
	unbekannt		1		1				
T-Stadium ²	0-2	4	29	51,8	16	57,1	13	46,4	0,422 [*]
	3-4		27	48,2	12	42,9	15	53,6	
	0		1	1,8	0	0,0	1	3,6	0,579 [#]
	1		8	14,3	4	14,3	4	14,3	
	2		20	35,7	12	42,9	8	28,6	
	3		15	26,8	7	25,0	8	28,6	
4	12	21,4	5	17,9	7	25,0			
Geschlecht	männlich	5	45	80,4	25	89,3	20	71,4	0,093 [*]
	weiblich		11	19,6	3	10,7	8	28,6	
Alter bei Diagnose	Median	6	64,3		66,7		61,7		0,961 [#]
	3. Quartil		70,6		69,9		71,9		
	1. Quartil		53,1		52,4		53,9		

⁺ Fisher Exakt 2-seitig; [#] Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; ^{*} Chi, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=37); ² aufgrund von geringer Fallzahl werden T4a-b zu T4 zusammengefasst; da keine Patienten in die Kategorie N3 fallen wurde diese Zeile weggelassen; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren, die nicht zur Auswahl der Untersuchungskohorte herangezogen wurden, sind in Tabelle 14 dargestellt. Die HPV-assoziierten Tumoren waren signifikant häufiger in der Tonsille lokalisiert als die HPV-negativen (71% vs. 29%; $p=0,001$). Jeweils 21,4% (6/28) der Patienten hatten ein niedriges UICC7-Stadium (I-III). Bei der Einteilung nach UICC7 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,515$). Bei der Einteilung nach UICC8 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen ($p<0,001$). Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC hatten mehrheitlich, zu fast 70%, ein niedriges UICC8-Stadium (I-III). Die Einteilung der Patienten mit HPV-negativen OPSCC hat sich im Vergleich zu UICC7 nicht verändert. Hinsichtlich des ECOG-Stadiums und dem M-Status zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.

Tabelle 14: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC.

		gesamt		HPV-negativ		HPV-assoziiert		p-Wert
		n=56	%	n=28	%	n=28	%	
Lokalisation	Tonsille	28	50,0	8	29,0	20	71,0	0,001*
	nicht Tonsille	28	50,0	20	71,0	8	29,0	
UICC7 Stadium	I-III	12	21,4	6	21,4	6	21,4	0,515*
	>III	44	78,6	22	78,6	22	78,6	
	I	1	1,8	1	3,6	0	0,0	0,655#
	II	2	3,6	2	7,1	0	0,0	
	III	9	16,1	3	10,7	6	21,4	
	IV-IVa	27	48,2	14	50,0	13	46,4	
	IVb	5	8,9	3	10,7	2	7,1	
IVc	12	21,4	5	17,9	7	25,0		
UICC8 Stadium	I-III	25	44,6	6	21,4	19	67,9	<0,001*
	>III	31	55,4	22	78,6	9	32,1	
	I	7	12,5	1	3,6	6	21,4	<0,001#
	II	10	17,9	2	7,1	8	28,6	
	III	8	14,3	3	10,7	5	17,9	
	IV-IVa	25	44,6	17	60,7	8	28,6	
	IVb	3	5,4	3	10,7	0	0,0	
IVc	3	5,4	2	7,1	1	3,6		
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	41	73,2	22	78,6	19	67,9	0,365*
	krank (2-4)	15	26,8	6	21,4	9	32,1	
	0	5	8,9	2	7,2	3	10,7	0,609#
	1	36	64,3	20	71,4	16	57,1	
	2	13	23,2	5	17,8	8	28,6	
	3	2	3,6	1	3,6	1	3,6	
4	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
M-Stadium ¹	M0	44	78,6	23	82,1	21	75,0	0,515*
	M+	12	21,4	5	17,9	7	25,0	

* Chi, Asympt., 2-seitig; # Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; fett geschrieben: signifikante p-Werte;
¹ M+ im Verlauf.

4.2.2 Deskriptive Auswertung der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie aufgeteilt nach HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM

Da die Fälle der Untersuchungskohorte gezielt ausgewählt wurden, wird eine homogene Verteilung der Variablen in den Gruppen ohne signifikante Unterschiede erwartet. Im Folgenden wird dieser Frage nachgegangen. Abbildung 8 veranschaulicht, dass innerhalb aller vier Untergruppen jeweils eine ähnliche Anzahl an Patienten ausgewählt wurde, die den Nikotinkonsum bejaht bzw. verneint haben.

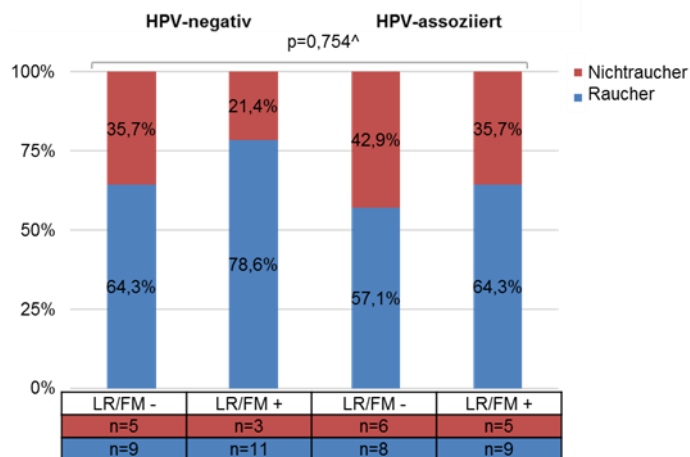


Abbildung 8: Verteilung des Raucherstatus in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.

An dritter Rangfolge zur Auswahl der Patienten wurde auf den Alkoholkonsum geachtet. Hinsichtlich dieser Variable besteht die größte Abweichung innerhalb der ausgewählten Patienten. Aus der Gruppe mit HPV-assoziierten Patienten ohne LR/FM wurden viele Fälle mit ≤ 2 Standardgläsern Alkoholkonsum pro Tag gefunden. Jedoch gab es unter den Patienten mit HPV-negativen Tumoren nicht genügend Patienten, die im Hinblick auf den Alkoholkonsum zur limitierenden Gruppe passten (Abbildung 9). Zwischen den vier Gruppen besteht dennoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,055$).

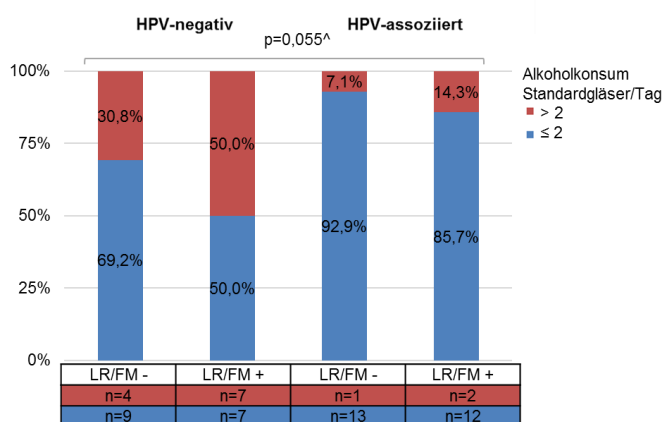


Abbildung 9: Verteilung des Alkoholkonsums in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die OPSCC-Untersuchungskohorte bei der Einteilung nach HPV-Status und Auftreten eines LR/FM in Bezug auf die Variablen, die zur Auswahl der Patienten herangezogen wurden relativ homogen verteilt ist. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 15).

Tabelle 15: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status und dem Auftreten von LR/FM, in der Rangfolge der Auswahlkriterien.

		Rang	gesamt		HPV-negativ				HPV-assoziiert				p-Wert
					LR/FM -		LR/FM +		LR/FM -		LR/FM +		
			56	%	14	%	14	%	14	%	14	%	
N-Stadium ²	N0	1	5	8,9	1	7,1	2	14,3	1	7,1	1	7,1	1,000 [^]
	N+		51	91,1	13	92,9	12	85,7	13	92,9	13	92,9	
Rauchen	ja	2	37	66,1	9	64,3	11	78,6	8	57,1	9	64,3	0,754 [^]
	nein		19	33,9	5	35,7	3	21,4	6	42,9	5	35,7	
Packyears ¹	Median	2a	30		30		30		26,9		31		0,887 [°]
	3. Quartil		40		42,5		40		16,5		50		
	1. Quartil		20,5		19,8		20		47,6		22,5		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	3	14	25,5	4	30,8	7	50,0	1	7,1	2	14,3	0,055 [^]
	≤2		41	74,5	9	69,2	7	50,0	13	92,9	12	85,7	
	unbekannt		1		1								
T-Stadium ²	0-2	4	29	51,8	8	57,1	8	57,1	9	64,3	4	28,6	0,239 [*]
	3-4		27	48,2	6	42,9	6	42,9	5	35,7	10	71,4	
Geschlecht	männlich	5	45	80,4	12	85,7	13	92,9	10	71,4	10	71,4	0,449 [^]
	weiblich		11	19,6	2	14,3	1	7,1	4	28,6	4	28,6	
Alter bei Diagnose	Median	6	64,3		67,1		64,3		58		65,9		0,787 [°]
	3. Quartil		70,6		69,6		70,3		67,2		79,7		
	1. Quartil		53,1		48,9		52,7		49,1		57,6		

[^] Fisher-Freeman-Halton 2-seitig; [°] Kruskal-Wallis, Asympt., 2-seitig; ^{*} Chi, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=37); ² aufgrund der Übersichtlichkeit wurde nur die dichotomisierte Ausprägung untersucht

Die Daten der OPSCC-Untersuchungskohorte differenziert nach HPV-Status und LR/FM sowie nach weiteren Risikofaktoren und Tumorcharakteristika, die nicht zur Auswahl der Kohorte beigetragen haben sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Tumore der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit und ohne LR/FM waren signifikant häufiger in der Tonsille lokalisiert, als bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC (p=0,004). Bei der Einteilung der Patienten nach UICC7-Stadien besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei der Einteilung nach UICC8 (p<0,001). Die Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit und ohne LR/FM hatten jeweils zu annähernd 80% ein hohes Tumorstadium nach UICC8 >III. Ebenso hatten die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem LR/FM mehrheitlich (64,3%) ein hohes UICC8-Stadium. Jedoch waren die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM vollständig in einem niedrigen UICC8-Stadium von I-III.

Hinsichtlich der Einteilung nach ECOG besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p=0,446). Unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem LR/FM waren fast 60% in einem ECOG-Stadium von 0-1. Bei den drei anderen Gruppen war das jeweils zu über 70% der Fall (Abbildung 10).

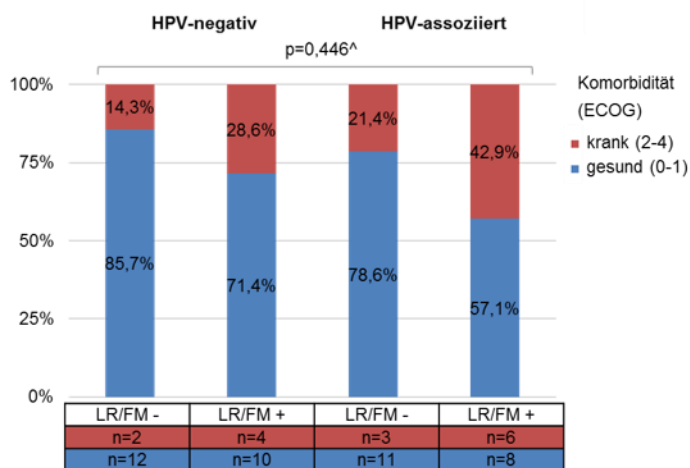


Abbildung 10: Verteilung des ECOG-Stadiums in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.

Die Patienten ohne LR/FM entwickelten jeweils keine Fernmetastasen. Unter den Patienten mit HPV-negativen OPSCC und LR/FM wurden 5 (35,6%) Fälle mit positivem M-Status identifiziert. 7 (50%) Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM wiesen Fernmetastasen auf. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$).

Tabelle 16: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten von LR/FM.

		gesamt		HPV-negativ				HPV-assoziiert				p-Wert
		n=56	%	LR/FM -		LR/FM +		LR/FM -		LR/FM +		
				n=14	%	14	%	14	%	14	%	
Lokalisation ²	Tonsille	28	50,0	6	42,9	2	14,3	11	78,6	9	64,3	0,004*
	nicht Tonsille	28	50,0	8	57,1	12	85,7	3	21,4	5	35,7	
UICC7 Stadium ²	I-III	12	21,4	3	21,4	3	21,4	3	21,4	3	21,4	1,000^
	>III	44	78,6	11	78,6	11	78,6	11	78,6	11	78,6	
UICC8 Stadium ²	I-III	25	44,6	3	21,4	3	21,4	14	100	5	35,7	<0,001^
	>III	31	55,4	11	78,6	11	78,6	0	0	9	64,3	
Komorbidität (ECOG) ²	gesund (0-1)	41	73,2	12	85,7	10	71,4	11	78,6	8	57,1	0,446^
	krank (2-4)	15	26,8	2	14,3	4	28,6	3	21,4	6	42,9	
M-Stadium ¹	M0	44	78,6	14	100	9	64,3	14	100	7	50	0,001*
	M+	12	21,4	0	0	5	35,7	0	0	7	50	

* Chi, Asympt., 2-seitig; ^ Fisher-Freeman-Halton; ¹ M+ im Verlauf, ² aufgrund der Übersichtlichkeit wurde nur die dichotomisierte Ausprägung untersucht; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.3 Überleben des OPSCC-Gesamtkollektivs und der OPSCC-Untersuchungskohorte

Um in den folgenden Kapiteln eine farblich einheitliche Kodierung der untersuchten Patientenkollektive einzuhalten, orientieren sich die dargestellten Abbildungen an der Farbkodierung von Abbildung 3:

- HPV-assoziiert
- HPV-negativ
- HPV-assoziiert, mit LR/FM
- HPV-negativ, ohne LR/FM
- HPV-assoziiert, ohne LR/FM
- HPV-negativ, mit LR/FM

4.3.1 Überleben des OPSCC-Gesamtkollektivs

Die 5-Jahresüberlebensrate des OPSCC-Gesamtkollektivs lag bei 48,1%. Die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren hatten im Vergleich zu denen mit HPV-negativen eine signifikant höhere 5-Jahresüberlebensrate von 74,5% gegenüber 39,2% ($p < 0,001$; Abbildung 11).

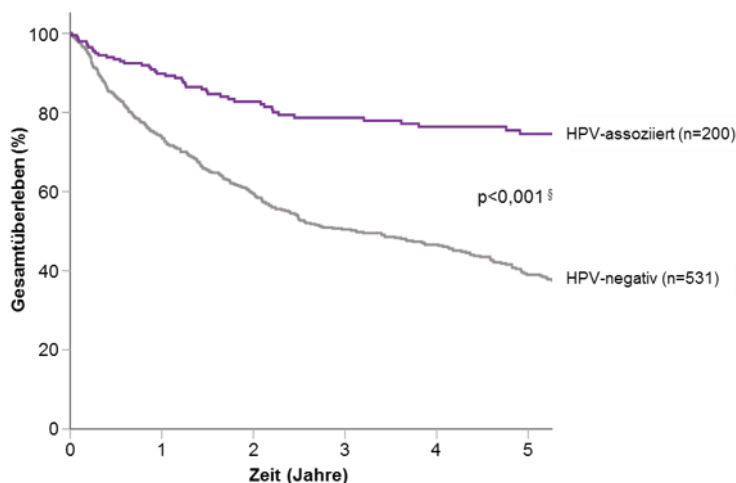
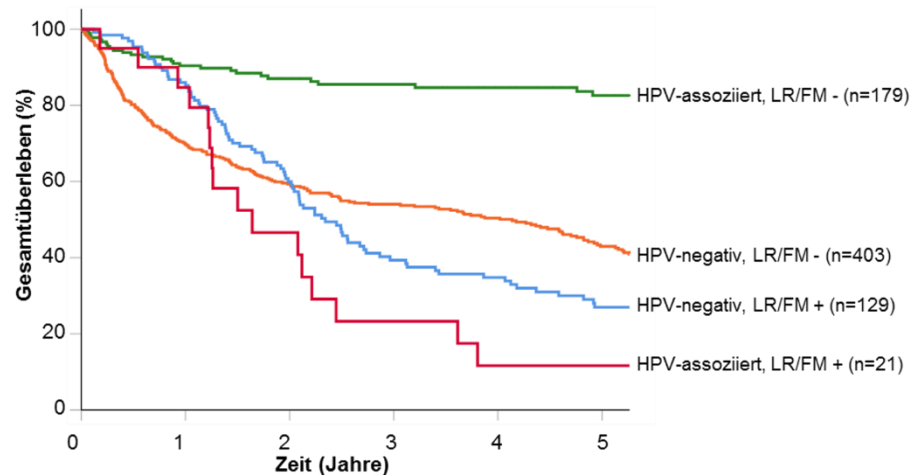


Abbildung 11: Überleben nach Kaplan-Meier aller Gießener Patienten mit OPSCC aufgeteilt nach dem HPV-Status im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

In einem weiteren Schritt wurde das OPSCC-Gesamtkollektiv neben dem HPV-Status zusätzlich nach dem Auftreten eines LR/FM unterteilt (Abbildung 12). Das höchste 5-Jahresgesamtüberleben von 83,1% hatte die Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren ohne LR/FM. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich im Vergleich zu der Gruppe mit dem zweithöchsten Gesamtüberleben von 43,0%. Diese bilden die Patienten mit HPV negativen Tumoren ohne LR/FM ($p < 0,001$). Die Patientengruppe mit HPV ne-

gativem Tumor mit einem LR/FM hatte eine 5-Jahresüberlebensrate von 27,9%. Im Vergleich zu den Patienten mit HPV-negativen Tumoren ohne LR/FM ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,017$). Das insgesamt geringste Überleben mit 11,7% hatte die Patientengruppe mit HPV-assoziierten Tumoren mit einem LR/FM.



p-Werte §	HPV-negativ LR/FM -	HPV-negativ LR/FM +	HPV-assoziiert LR/FM -	HPV-assoziiert LR/FM +
HPV-negativ LR/FM -		0,017	<0,001	0,031
HPV-negativ LR/FM +	0,017		<0,001	0,090
HPV-assoziiert LR/FM -	<0,001	<0,001		<0,001
HPV-assoziiert LR/FM +	0,031	0,090	<0,001	

Abbildung 12: Überleben nach Kaplan-Meier aller Gießener Patienten mit OPSCC aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Die p-Werte wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte.

4.3.2 Univariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs

Die Ergebnisse der univariaten Überlebensanalyse sind in Tabelle 17 zu finden. Das mediane Überleben der Patienten im OPSCC-Gesamtkollektiv lag bei 4,8 Jahren und die 5-Jahresüberlebensrate betrug 48,1%. Die Patienten mit HPV-assoziierten Malignomen hatten ein signifikant besseres Überleben gegenüber den Patienten mit HPV-negativen Tumoren ($p<0,001$). Die 5-Jahresüberlebensrate betrug in Bezug zum HPV-Status 74,5% gegenüber 39,2% (Abbildung 11). Das mediane Überleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC konnte nicht bestimmt werden, da am Ende des Beobachtungszeitraums noch über 50% der Patienten überlebt hatten. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC lag das mediane Überleben bei 3,1 Jahren. Ebenso hatten die Patienten ohne LR/FM ein signifikant besseres Überleben als die mit LR/FM ($p=0,003$). Die Patienten mit einem LR/FM überlebten im Median 2,7 Jahre. Die Patienten ohne LR/FM wiesen ein fast doppelt so hohes medianes Gesamtüberleben von ca. 5,3 Jahren

auf. Alle untersuchten Risikofaktoren und Tumorcharakteristika, außer das Geschlecht, zeigten signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen hinsichtlich des Überlebens. Das höchste mediane Überleben von 11,3 Jahren hatten die Patienten mit einem niedrigen UICC8-Stadium (I-III). Die 5-Jahresüberlebensrate dieser Patienten lag bei 68,8%. Das geringste Überleben wurde bei den Patienten im metastasierten Tumorstadium festgestellt. Sie lebten im Median 1,1 Jahre und nur 8,0% erreichten ein Überleben von 5 Jahren.

Tabelle 17: Univariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs.

		n	univariate Überlebensanalyse				univariate Cox-Regression			
			Median Überleben [Jahre]	S.d.	5-JÜR	p-Wert *	HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
gesamt		732	4,822	0,360	48,1%					
Geschlecht	weiblich	162	5,323	0,872	54,2%	0,169	1			0,170
	männlich	570	4,408	0,444	46,3%		1,189	0,929	1,521	
Lokalisation	nicht-Tonsille	426	4,181	0,585	43,8%	0,003	1			0,004
	Tonsille	303	5,877	0,864	53,9%		0,738	0,602	0,905	
Rauchen	Nein	136	10,975	-	58,6%	0,003	1			0,003
	Ja	575	4,408	0,443	46,0%		1,580	1,166	2,082	
N-Stadium	N0	191	6,186	0,952	55,8%	0,002	1			0,002
	N+	530	4,318	0,639	46,2%		1,439	1,138	1,819	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	313	7,926	1,535	58,1%	<0,001	1			<0,001
	>2	345	3,663	0,581	40,7%		1,789	1,441	2,223	
Alter	< Median	360	6,186	0,876	55,2%	<0,001	1			<0,001
	≥ Median	372	3,611	0,563	39,3%		1,555	1,274	1,898	
HPV-Status	negativ	532	3,129	0,431	39,2%	<0,001	1			<0,001
	assoziiert	200	-	-	74,5%		0,344	0,258	0,457	
T-Stadium	1-2	373	8,945	1,336	66,4%	<0,001	1			<0,001
	3-4	353	1,668	0,167	28,6%		3,278	2,661	4,037	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	518	6,101	0,581	56,7%	<0,001	1			<0,001
	krank (≥ 2)	208	1,422	0,230	25,5%		2,532	2,064	3,106	
UICC 8 Stadium	I-III	346	11,321	1,613	68,8%	<0,001	1			<0,001
	>III	321	1,929	0,169	29,8%		3,275	2,623	4,090	
M-Stadium	M0	655	5,403	0,373	52,2%	<0,001	1			<0,001
	M+	56	1,052	0,159	8,0%		3,344	2,441	4,583	
LR/FM	nein	634	5,293	0,446	50,4%	0,003	1			0,004
	ja	96	2,734	0,329	30,8%		1,459	1,131	1,883	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; S.d.: Standardfehler; 5-JÜR: 5-Jahresüberleben in Prozent; p-Wert *: durch Log-Rank-Test ermittelt; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; - Kein Wert definiert weil am Ende der Beobachtungszeit noch mehr als 50% (Median) bzw. 55% (S.d.) der untersuchten Patienten lebten; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.3.3 Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs

Ergänzend zur univariaten Überlebensanalyse wurde eine multivariate Analyse durchgeführt (Tabelle 18). Die signifikanten Variablen aus der univariaten Regressionsanalyse wurden als Basis für den ersten Schritt der multivariaten Überlebensanalyse genommen: das Alter, der HPV-Status, die Komorbidität (ECOG), TNM-Stadium sowie die exogenen Noxen Alkoholkonsum und Nikotinabusus. Die Variable „Lokalisation des Primärtumors“ wurde, trotz signifikantem Überlebensunterschied in der univariaten Analyse, nicht in der multivariaten Analyse berücksichtigt. Die Tumoren, welche in der Tonsille lokalisiert sind,

entsprechen weitgehend den Tumoren, die HPV-assoziiert sind. So wurde eine doppelte Anwendung vermieden. Ebenso wurde auch die Variable „UICC8-Stadium“ nicht in der multivariaten Analyse berücksichtigt, obwohl sich ein signifikanter Unterschied gezeigt hat. Das UICC8-Stadium setzt sich aus den Variablen TNM-Stadium und HPV-Status zusammen. Diese Variablen wurden einzeln in die multivariate Analyse aufgenommen. Auch die Variable „LR/FM“ wurde nicht in der multivariaten Analyse berücksichtigt, da diese auch das M-Stadium umfasst, welches bereits separat in die Analyse aufgenommen wurde. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wiesen alle Variablen mit Ausnahme des N-Stadiums und des Nikotinabusus einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben auf. Im zweiten Analyseschritt wurde der Raucherstatus nicht weiter eingeschlossen. Das N-Stadium bleibt ohne signifikanten Einfluss auf das Überleben und wurde folglich im letzten Schritt aus der Liste der einbezogenen Variablen entfernt.

Tabelle 18: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs.

		multivariate Cox-Regression											
		1. Schritt (alle Variablen)				2. Schritt				3. Schritt			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °	HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °	HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			0,005	1			0,002	1			0,002
	≥ Median	1,378	1,101	1,724		1,407	1,128	1,755		1,417	1,137	1,767	
HPV-Status	negativ	1			<0,001	1			<0,001	1			<0,001
	assoziiert	0,39	0,271	0,56		0,409	0,29	0,577		0,422	0,301	0,593	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<0,001	1			<0,001	1			<0,001
	krank (≥ 2)	1,694	1,331	2,156		1,683	1,323	2,141		1,687	1,327	2,145	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			0,048	1			0,057	1			0,049
	>2	1,283	1,002	1,643		1,266	0,993	1,614		1,1275	1,002	1,623	
T-Stadium	1-2	1			<0,001	1			<0,001	1			<0,001
	3-4	2,515	1,978	3,198		2,472	1,949	3,136		2,562	2,031	3,233	
M-Stadium	M0	1			<0,001	1			<0,001	1			<0,001
	M+	2,011	1,394	2,901		1,999	1,386	2,884		2,091	1,459	2,996	
N-Stadium	N0	1			0,149	1			0,166				
	N+	1,214	0,933	1,581		1,204	0,926	1,566					
Rauchen	Nein	1			0,393								
	Ja	0,85	0,584	1,235									

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; S.d.: Standardfehler; 5-JÜR: 5-Jahresüberleben in Prozent; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Nach Ausschluss der nicht signifikanten Variablen N-Status und Raucher-Status, entsteht im dritten Schritt ein Modell, das die signifikanten Einflüsse auf das Überleben zeigt. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass das Alter der Patienten bei Diagnosestellung ($p=0,002$), die Komorbidität (ECOG; $p<0,001$), der Alkoholkonsum ($p=0,049$), T- und M-Stadium (jeweils $p<0,001$) sowie der HPV-Status ($p<0,001$) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben und als unabhängige Einflussfaktoren angesehen werden können.

4.3.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte

Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC der Untersuchungskohorte hatten, im Gegensatz zu dem unselektionierten Gesamtkollektiv, mit 45,4% keine signifikant bessere 5-Jahresüberlebensrate als die Patienten mit HPV-negativen Tumoren mit 35,1% ($p=0,425$; Abbildung 13).

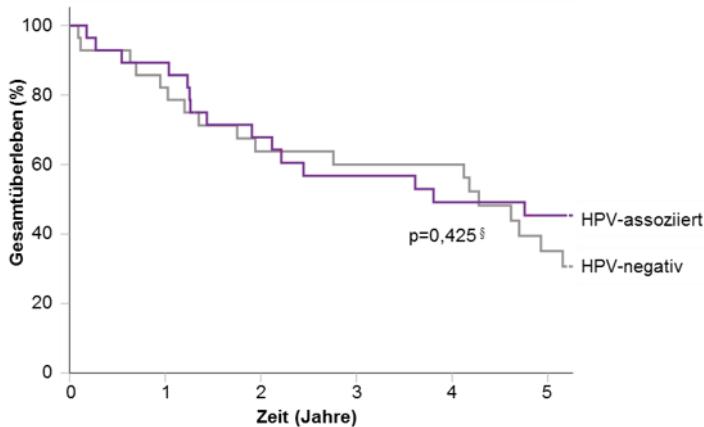
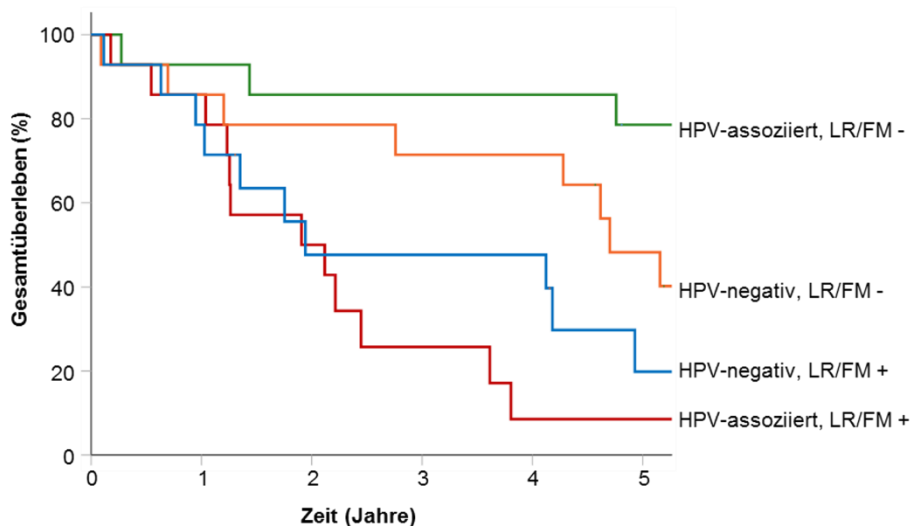


Abbildung 13: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. Die beiden Gruppen umfassen jeweils 28 Fälle. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

Bei der Unterteilung sowohl nach HPV-Status, als auch nach Krankheitsverlauf, zeichnet sich bei den Patienten der OPSCC-Untersuchungskohorte ein ähnlicher Verlauf wie bei dem OPSCC-Gesamtkollektiv ab (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 14). Die Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM hatte mit 78,6% die beste 5-Jahresüberlebensrate. An zweiter und dritter Stelle des Gesamtüberlebens waren die Patienten mit HPV-negativen Tumoren mit und ohne LR/FM mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 48,2% und 19,8%. Das geringste Gesamtüberleben wurde in der Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit einem LR/FM festgestellt. Nur 8,6% dieser Patienten überlebten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM hatten ein signifikant besseres Überleben als die drei anderen Gruppen. Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM hatten im Vergleich zu den anderen Gruppen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben, ausgenommen der Gruppe HPV-negativer OPSCC und LR/FM. Zwischen den beiden Patientengruppen mit HPV-negativen OPSCC unabhängig vom Auftreten eines LR/FM besteht kein signifikanter Überlebensunterschied (Abbildung 14).



p-Werte §	HPV-negativ LR/FM -	HPV-negativ LR/FM +	HPV-assoziert LR/FM -	HPV-assoziert LR/FM +
HPV-negativ LR/FM -		0,119	0,041	0,004
HPV-negativ LR/FM +	0,119		0,002	0,189
HPV-assoziert LR/FM -	0,041	0,002		<0,001
HPV-assoziert LR/FM +	0,004	0,189	<0,001	

Abbildung 14: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. Die Gruppen umfassen jeweils 14 Fälle. § Die p-Werte wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte.

4.3.5 Univariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte

Die ausführlichen Daten zur univariaten Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte sind in Tabelle 19 zu finden. Die Patienten der OPSCC-Untersuchungskohorte hatten ein medianes Gesamtüberleben von 4,3 Jahren und einer 5-Jahresüberlebensrate von 40,6% erreicht. Hinsichtlich des T-Stadiums gibt es einen signifikanten Unterschied in der Überlebensanalyse ($p=0,003$). Die Patienten mit niedrigen T-Stadien überlebten im Median 6,0 Jahre, die mit den hohen T-Stadien nur 2,2 Jahre. Ein Überleben von 5 Jahren nach Diagnosestellung wurde von 52,0% der Patienten mit einem T-Stadium von 1-2 erreicht, wohingegen die mit höheren T-Stadien von 3-4 nur einer 5-Jahresüberlebensrate von 24% hatten. Auch beim M-Stadium gibt es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens ($p<0,001$). Die Patienten ohne Fernmetastasen überlebten im Median 4,9 Jahre und erreichten zu 48,1% die 5-Jahresüberlebensrate. Die Patienten mit Fernmetastasen hatten ein medianes Überleben von 1,3 Jahren und 10,4% überlebten fünf Jahre ab Diagnosestellung. Folglich ergibt sich auch bei der Einteilung nach UICC8 ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen den niedrigen (I-III) und hohen UICC8-Stadien ($>III$; $p<0,001$). Auch die zentrale Auswahlvariable LR/FM zeigt einen signifikanten Unterschied des Überlebens ($p<0,001$). Patienten ohne LR/FM

haben ein medianes Überleben von 7,9 Jahren und eine 5-Jahresüberlebensrate von 63,8%. Patienten mit einem LR/FM überlebten im Median nur 1,9 Jahre und erreichten in 14,6% der Fälle ein Überleben von fünf Jahren ab Diagnosestellung. In der univariaten Cox-Regression zeigt sich eine signifikante prognostische Relevanz bei den Variablen: T-Stadium ($p=0,003$), M-Stadium ($p<0,001$), UICC8-Stadium ($p<0,001$) und LR/FM ($p<0,001$).

Tabelle 19: Univariete Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte.

		Rang	n	univariete Überlebensanalyse				univariete Cox-Regression			
				Median Überleben [Jahre]	S.d.	5-JÜR	p-Wert *	HR	95% KI		p-Wert °
									unten	oben	
gesamt			56	4,279	0,630	40,6%					
Geschlecht	weiblich	5	11	4,123	1,570	36,4%	0,463	1			0,464
	männlich		45	4,279	0,660	41,6%		0,755	0,356	1,602	
Lokalisation	nicht-Tonsille		28	4,181	0,388	35,8%	0,365	1			0,367
	Tonsille		28	4,616	1,607	45,0%		0,741	0,386	1,421	
Rauchen	Nein	2	19	4,929	1,171	43,7%	0,607	1			0,607
	Ja		37	4,181	1,126	35,9%		1,203	0,594	2,437	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	3	41	5,156	0,946	50,3%	0,110	1			0,115
	>2		14	2,759	1,103	10,4%		1,800	0,866	3,741	
Alter	< Median	6	28	4,759	1,509	48,0%	0,069	1			0,073
	≥ Median		28	3,614	1,441	32,9%		1,830	0,945	3,541	
HPV-Status	negativ	0	28	4,279	0,385	35,1%	0,425	1			0,427
	assoziiert		28	3,805	1,957	41,3%		0,769	0,402	1,471	
T-Stadium	1-2	4	19	6,047	2,124	52,0%	0,003	1			0,004
	3-4		17	2,214	0,980	23,9%		2,633	1,355	5,115	
N-Stadium	N0	1	5	4,616	0,540	40,0%	0,722	1			0,723
	N+		51	4,181	1,093	40,9%		1,239	0,380	4,042	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)		41	4,701	0,583	44,6%	0,202	1			0,206
	krank (≥ 2)		15	2,447	1,042	12,3%		1,578	0,778	3,198	
UICC 8 Stadium	I-III		25	7,926	-	66,0%	<0,001	1			0,001
	>III		31	1,942	0,511	20,4%		3,546	1,729	7,270	
M-Stadium	M0		44	4,929	0,580	48,1%	<0,001	1			<0,001
	M+		12	1,255	0,026	10,4%		4,010	1,903	8,448	
LR/FM	nein		28	7,926	-	63,8%	<0,001	1			<0,001
	ja		28	1,942	0,285	14,6%		4,072	2,001	8,287	
p63	schwach		26	3,614	1,323	36,5%	0,604	1			0,604
	stark		30	4,701	0,544	40,4%		0,843	0,441	1,609	
RIPK4	schwach		30	4,616	0,670	44,3%	0,208	1			0,211
	stark		26	3,805	1,681	36,0%		1,512	0,791	2,891	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; S.d.: Standardfehler; 5-JÜR: 5-Jahresüberleben in Prozent; p-Wert *: durch Log-Rank-Test ermittelt; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; - Kein Wert definiert weil am Ende der Beobachtungszeit noch mehr als 50% (Median) bzw. 55% (S.d.) der untersuchten Patienten lebten; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.3.6 Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte

Die Ergebnisse des finalen Modells der multivariaten Cox Regressionsanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs sollen mit denen der OPSCC-Untersuchungskohorte verglichen werden. Im ersten Analyseschritt zeigten nur der Alkoholkonsum sowie das T- und M-Stadium einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte (Tabelle 20). Der HPV-Status zeigt mit $p=0,768$ den geringsten Einfluss auf das Überleben und wurde daher im zweiten Schritt der Analyse nicht miteingeschlossen. Die Variablen, welche initial einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatten, bleiben

signifikant. Der p-Wert der Variable Alter wird geringer: von $p=0,098$ im ersten Analyseschritt vs. $p=0,062$ im zweiten Schritt. Der p-Wert des ECOG-Stadiums wurde mit Ausschluss des HPV-Status größer und entfernte sich weiter von der Grenze zur Signifikanz ($p=0,095$ vs. $p=0,229$). Für den dritten Analyseschritt wurde das ECOG-Stadium weglassen. Hieraus ergibt sich das finale Modell an Variablen, die einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte hatten: Alter ($p=0,010$), Alkoholkonsum ($p=0,009$), T-Stadium ($p=0,030$) und M-Stadium ($p<0,001$).

Tabelle 20: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte.

		multivariate Cox-Regression											
		1. Schritt (alle Variablen)				2. Schritt				3. Schritt			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °	HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °	HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
HPV	negativ	1			<i>0,768</i>								
	assoziiert	0,900	0,448	1,81									
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<i>0,095</i>	1			<i>0,229</i>				
	krank (≥ 2)	0,451	0,177	1,147		0,587	0,215	1,605					
Alter	< Median	1			<i>0,098</i>	1			<i>0,062</i>	1			<i>0,010</i>
	\geq Median	1,864	0,891	3,902		2,179	0,962	4,936		2,649	1,256	5,584	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤ 2	1			<i>0,021</i>	1			<i>0,008</i>	1			<i>0,009</i>
	> 2	2,607	1,155	5,885		3,014	1,338	6,788		2,963	1,314	6,681	
T-Stadium	1-2	1			<i>0,008</i>	1			<i>0,016</i>	1			<i>0,030</i>
	3-4	2,730	1,298	5,742		2,522	1,192	5,337		2,106	1,077	4,118	
M-Stadium	M0	1			<i><0,001</i>	1			<i><0,001</i>	1			<i><0,001</i>
	M+	7,697	3,027	19,573		7,823	3,135	19,525		6,463	2,779	15,035	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; S.d.: Standardfehler; 5-JÜR: 5-Jahresüberleben in Prozent; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

4.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von RIPK4 in der OPSCC-Untersuchungskohorte

4.4.1 Deskriptive Auswertung der RIPK4-Expression

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, wurden für die Auswertung die immunhistochemisch gefärbten FFPE-Schnitte mikroskopisch untersucht. Zunächst wurde das vorhandene Tumorgewebe identifiziert. Daraufhin wurde festgehalten, ob das Tumorgewebe ungefärbt, schwach, mittel oder stark angefärbt ist (Abbildung 15). Da sich in einer Mehrzahl der gefärbten FFPE-Schnitte eine inhomogene RIPK4-Expression innerhalb des Tumors zeigte, wurde die Intensität der Expression differenziert ausgewertet, indem der prozentuale Anteil des ungefärbten, schwach, mittel und stark angefärbten Tumorgewebes angegeben wurde.

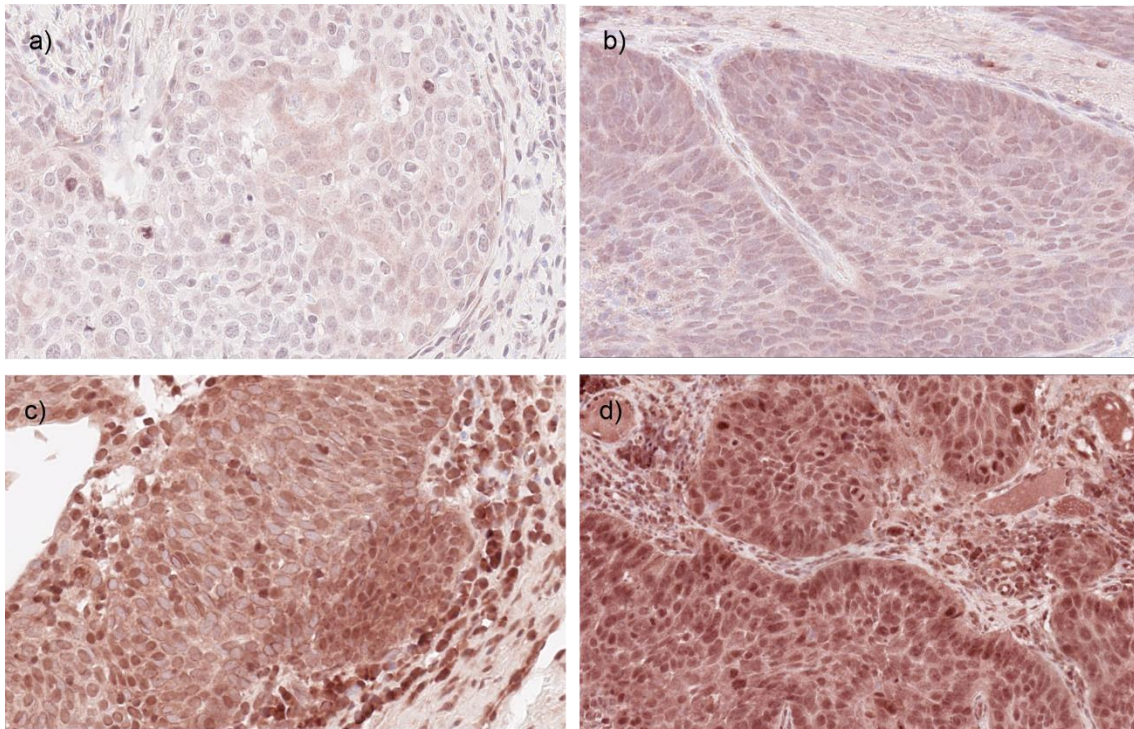


Abbildung 15: Intensitäten der Expression des RIPK4-Antikörpers aufgenommen mit dem 20-er Objektiv. a) ungefärbtes Tumorgewebe, b) schwache, c) mittlere und d) starke Expression im Tumorgewebe.

4.4.2 Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren bzw. Tumorkriterien und der metrisch eingeteilten RIPK4-Expression

Im folgenden Kapitel werden die Zusammenhänge der tumorbezogenen Charakteristika sowie der allgemeinen Risikofaktoren mit der metrisch eingeteilten RIPK4-Expression geschildert (Tabelle 21). In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass jeweils mit zunehmendem T- und N-Stadium auch die metrisch eingeteilte RIPK4-Expression signifikant stärker wird ($p=0,004$ und $p=0,009$). Die Korrelationskoeffizienten zeigen einen mäßig starken Zusammenhang an (0,376 bzw. 0,345).

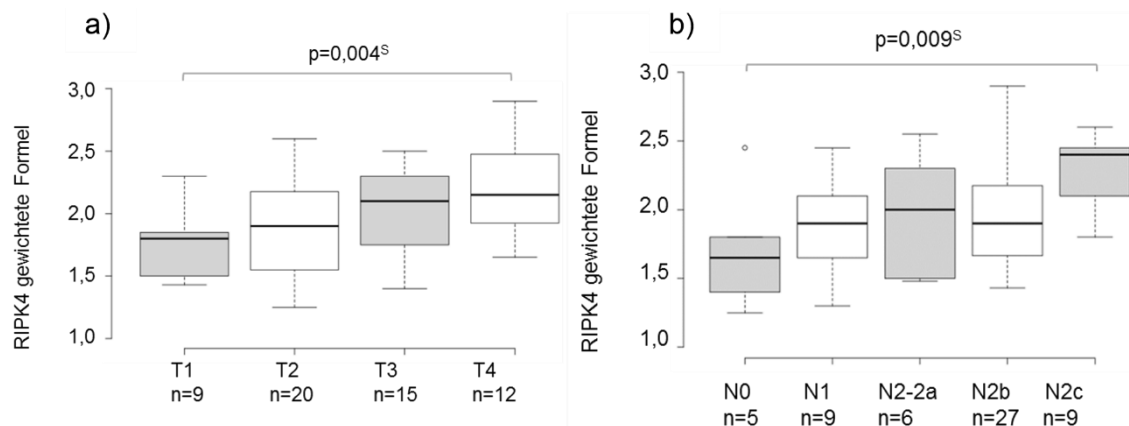


Abbildung 16: Korrelation der RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit a) dem T-Stadium und b) dem N-Stadium. a) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,376. b) Korrelationskoeffizient beträgt 0,345. ^s Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.

Das dritte Kriterium zur Tumoreinteilung, das M-Stadium, zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zur Färbeintensität von RIPK4. Ebenso besteht kein signifikanter Zusammenhang des HPV-Status, der Einteilung nach UICC7 oder UICC8 mit der Färbeintensität von RIPK4.

Tabelle 21: Korrelation der Tumorcharakteristika der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.

		Spearman	
		Korrelation	p-Wert
T-Stadium ²	0-2	0,327	0,014
	3-4		
	0	0,376	0,004
	1		
	2		
	3		
4			
N-Stadium	N0	0,210	0,121
	N+		
	N0	0,345	0,009
	N1		
	N2-N2a		
	N2b		
M-Stadium ¹	N2c	0,096	0,483
	M0		
HPV	M+	0,066	0,627
	assoziiert negativ		
UICC7 Stadium	I-III	0,220	0,103
	>III		
	I	0,234	0,083
	II		
	III		
	IV-IVa		
	IVb		
IVc			
UICC8 Stadium	I-III	0,168	0,215
	>III		
	I	0,202	0,135
	II		
	III		
	IV-IVa		
	IVb		
IVc			

Ausprägung der RIPK4 Färbeintensität zwischen 0 und 3; fett geschrieben: signifikante p-Werte; ¹M+ im Verlauf; ² aufgrund von geringer Fallzahl werden T4a-b zu T4 zusammengefasst; da keine Patienten in die Kategorie N3 fallen wurde diese Zeile weggelassen.

Die allgemeinen Patienteneigenschaften Geschlecht und Alter bei Diagnosestellung haben keinen Einfluss auf die Intensität der RIPK4-Expression auf den Tumorschnitten (Tabelle 22). Abbildung 17 zeigt, dass die Patientengruppen auch hinsichtlich des Alkoholkonsums keinen signifikanten Unterschied der RIPK4-Expression aufweisen. Ebenso kann zwischen dem Nikotinkonsum sowie der Anzahl konsumierter *packyears* kein signifikanter Zusammenhang mit der Expression von RIPK4 nachgewiesen werden.

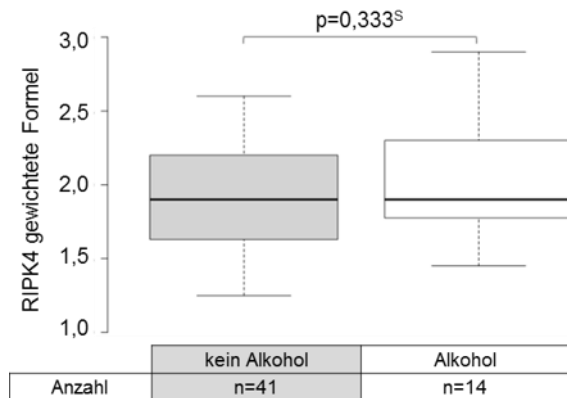


Abbildung 17: Korrelation des Alkoholkonsum in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit der RIPK4-Expression. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,133. ^s Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.

Tabelle 22: Korrelation der Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.

		Spearman	
		Korrelation	p-Wert
Geschlecht	männlich	0,142	0,296
	weiblich		
Alter bei Diagnose		0,199	0,141
Alkohol	ja	0,133	0,333
	nein		
Rauchen	ja	0,081	0,555
	nein		
Packyears		0,049	0,722

Ausprägung der RIPK4 Färbeintensität zwischen 0 und 3

4.4.3 Risikofaktoren und Tumorcharakteristika in Bezug zur dichotomisierten RIPK4-Expression

Die ausführlichen Daten zur Auswertung der Auswahlvariablen stratifiziert nach der Intensität der dichotomen RIPK4-Expression sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Insgesamt zeigten 26 Tumorschnitte eine starke und 30 eine schwache RIPK4-Expression. In der dichotomen Aufteilung des N-Status zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der RIPK4-Expression ($p=0,358$). Jedoch ist bei der nicht-dichotomen Einteilung des N-Stadiums von N0 bis N2c ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der RIPK4-Expression festzustellen ($p=0,041$). Unter den Patienten mit starker RIPK4-

Expression liegt häufiger ein hohes N-Stadium vor, als bei den Patienten mit schwacher RIPK4-Expression.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der RIPK4-Expression und dem Raucher-Status ($p=0,642$) sowie dem Alkoholkonsum ($p=0,813$). Von den insgesamt 37 Rauchern hatten 18 (69,2%) einen stark gefärbten Tumor. Von den 19 Nicht-Rauchern waren bei 8 (30,8%) die Tumore stark gefärbt. Die Verteilung der *packyears* unterscheidet sich kaum zwischen den Tumorschnitten mit schwacher bzw. starker RIPK4-Expression. Der Median lag bei den stark exprimierten Fällen bei 30 und bei den schwach exprimierten Fällen bei 31 py (Abbildung 18).

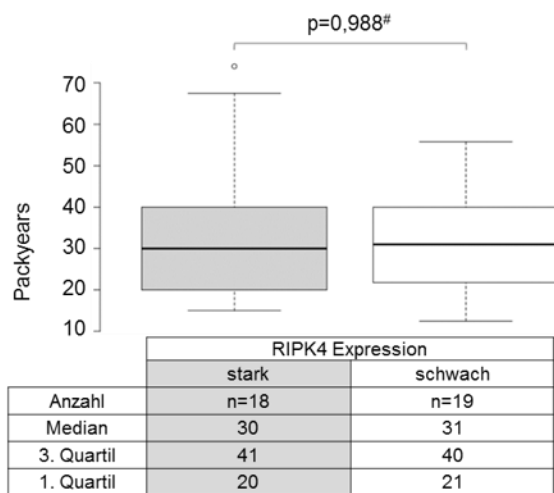


Abbildung 18: Konsumierte Packyears der Raucher (n=37) differenziert nach der RIPK4-Expression. # Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.

Hinsichtlich der dichotomen und nicht-dichotomen Einordnung des T-Stadium zeigt sich, dass die OPSCC-Patienten mit niedrigen T-Stadien eine signifikant schwächere RIPK4-Expression haben, als die in hohen T-Stadien (jeweils $p=0,003$).

Bezüglich der RIPK4-Expression gibt es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Geschlechterverteilung ($p=0,547$). Auch in Bezug zur Altersverteilung bei Diagnosestellung besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den RIPK4-Färbungsgruppen ($p=0,142$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Patienten mit schwacher RIPK4-Expression der Tumoren signifikant häufiger einem niedrigen T- und N-Stadium zugeteilt waren als die Patienten mit starker RIPK4-Expression.

Tabelle 23: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression in der Rangfolge der Auswahlkriterien.

		Rang	gesamt		stark exprimiert		schwach exprimiert		p-Wert
			n=56	%	n=26	%	n=30	%	
HPV	assoziiert negativ		28	50,0	14	53,8	14	46,7	0,592*
			28	50,0	12	46,2	16	53,3	
LR/FM	+		28	50,0	14	53,8	14	46,7	0,592*
	-		28	50,0	12	46,2	16	53,3	
N-Stadium	N0	1	5	8,9	1	3,8	4	13,3	0,358 ⁺
	N+		51	91,1	25	96,2	26	86,7	
	N0		5	8,9	1	3,8	4	13,3	0,041 [#]
	N1		9	16,1	3	11,5	6	20,0	
	N2-N2a		6	10,7	3	11,5	3	10,0	
	N2b		27	48,2	12	46,2	15	50,0	
N2c	9	16,1	7	26,9	2	6,7			
Rauchen	ja	2	37	66,1	18	69,2	19	63,3	0,642*
	nein		19	33,9	8	30,8	11	36,7	
Packyears ¹	Median	2a	30		30		31		0,988 [#]
	3. Quartil		40		41		40		
	1. Quartil		20,5		20		21		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	3	14	25,5	7	26,9	7	24,1	0,813*
	<2		41	74,5	19	73,1	22	75,9	
	unbekannt		1		0		1		
T-Stadium ²	0-2	4	29	51,8	8	30,8	21	70,0	0,003*
	3-4		27	48,2	18	69,2	9	30,0	
	0		1	1,8	0	0,0	1	3,3	0,003 [#]
	1		8	14,3	2	7,7	6	20,0	
	2		20	35,7	6	23,1	14	46,7	
	3		15	26,8	9	34,6	6	20,0	
4	12	21,4	9	34,6	3	10,0			
Geschlecht	männlich	5	45	80,4	20	76,9	25	83,3	0,547*
	weiblich		11	19,6	6	23,1	5	16,7	
Alter bei Diagnose	Median	6	64,3		66,3		58,9		0,142 [§]
	3. Quartil		70,6		71,7		68,3		
	1. Quartil		53,1		52,1		53,6		

* Chi, Asympt., 2-seitig; ⁺ Fisher Exakt, 2-seitig; [#] Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; [§] t-Test, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=37); ² aufgrund von geringer Fallzahl werden T4a-b zu T4 zusammengefasst; da keine Patienten in die Kategorie N3 fallen wurde diese Zeile weggelassen; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Im nächsten Schritt wurden in Bezug zur RIPK4-Expression weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren untersucht, die keinen Einfluss auf die Auswahl der Patienten hatten (Tabelle 24). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Färbungsgruppen hinsichtlich der Variablen: Lokalisation des Tumors, UICC7- und UICC8-Einteilung, Komorbidität (ECOG-Stadium), M-Stadium, p63-Expression.

Tabelle 24: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.

		gesamt		stark exprimiert		schwach exprimiert		p-Wert
		n=56	%	n=26	%	n=30	%	
Lokalisation	Tonsille	28	50,0	15	60,0	13	40,0	0,284*
	nicht Tonsille	28	50,0	11	40,0	17	60,0	
UICC7 Stadium	I-III	12	21,4	4	15,4	8	26,7	0,305*
	>III	44	78,6	22	84,6	22	73,3	
	I	1	1,8	0	0,0	1	3,3	0,147#
	II	2	3,6	0	0,0	2	6,7	
	III	9	16,1	4	15,4	5	16,7	
	IV-IVa	27	48,2	12	46,2	15	50,0	
	IVb	5	8,9	3	11,5	2	6,7	
IVc	12	21,4	7	26,9	5	16,7		
UICC8 Stadium	I-III	25	44,6	9	34,6	16	53,3	0,160*
	>III	31	55,4	17	65,4	14	46,7	
	I	7	12,5	2	7,7	5	16,7	0,329#
	II	10	17,9	2	7,7	8	26,7	
	III	8	14,3	5	19,2	3	10,0	
	IV-IVa	25	44,6	15	57,7	10	33,3	
	IVb	3	5,4	1	3,8	2	6,7	
IVc	3	5,4	1	3,8	2	6,7		
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	41	73,2	18	69,2	23	76,7	0,531*
	krank (2-4)	15	26,8	8	30,8	7	23,3	
	0	5	8,9	0	0,0	5	16,7	0,155#
	1	36	64,3	18	69,2	18	60,0	
	2	13	23,2	7	26,9	6	20,0	
	3	2	3,6	1	3,8	1	3,3	
4	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
M-Stadium ¹	M0	44	78,6	19	73,1	25	83,3	0,351*
	M+	12	21,4	7	26,9	5	16,7	
p63	stark	30	53,6	16	61,5	14	46,7	0,266*
	schwach	26	46,4	10	38,5	16	53,3	

* Chi, Asympt., 2-seitig; #Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; ¹ M+ im Verlauf

4.4.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte stratifiziert nach der RIPK4-Expression

In der OPSCC-Untersuchungskohorte differenziert nach der RIPK4-Expression zeigt sich hinsichtlich des Überlebens nach Kaplan-Meier kein signifikanter Unterschied ($p=0,208$; Abbildung 19). Die Patienten der Gruppe „RIPK4 schwach gefärbt“ hatten eine 5-Jahresüberlebensrate von 44,3% vs. 36,0% in der Gruppe „RIPK4 stark gefärbt“.

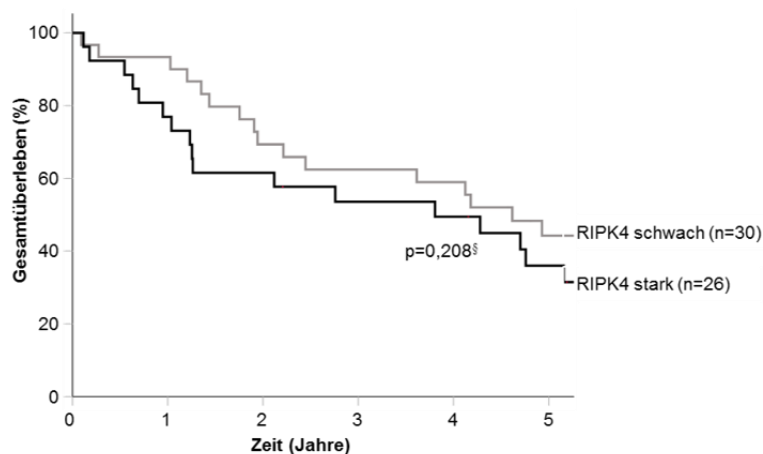


Abbildung 19: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach der dichotomisierten Expression von RIPK4 im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

4.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p63 der OPSCC-Untersuchungskohorte

4.5.1 Deskriptive Auswertung der p63-Expression

In Kapitel 3.6 wurde das Vorgehen zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Tumorschnitte ausführlich beschrieben. Gleich wie bei der RIPK4-Färbung, zeigte sich auch bei der Anfärbung mit dem p63-Antikörper bei manchen Tumorschnitten eine inhomogene Expression. Aus diesem Grund wurde ebenfalls das vorhandene Tumorgewebe nach Prozenten in ungefärbte, schwach, mittel und stark gefärbte Abschnitte eingeteilt (Abbildung 20).

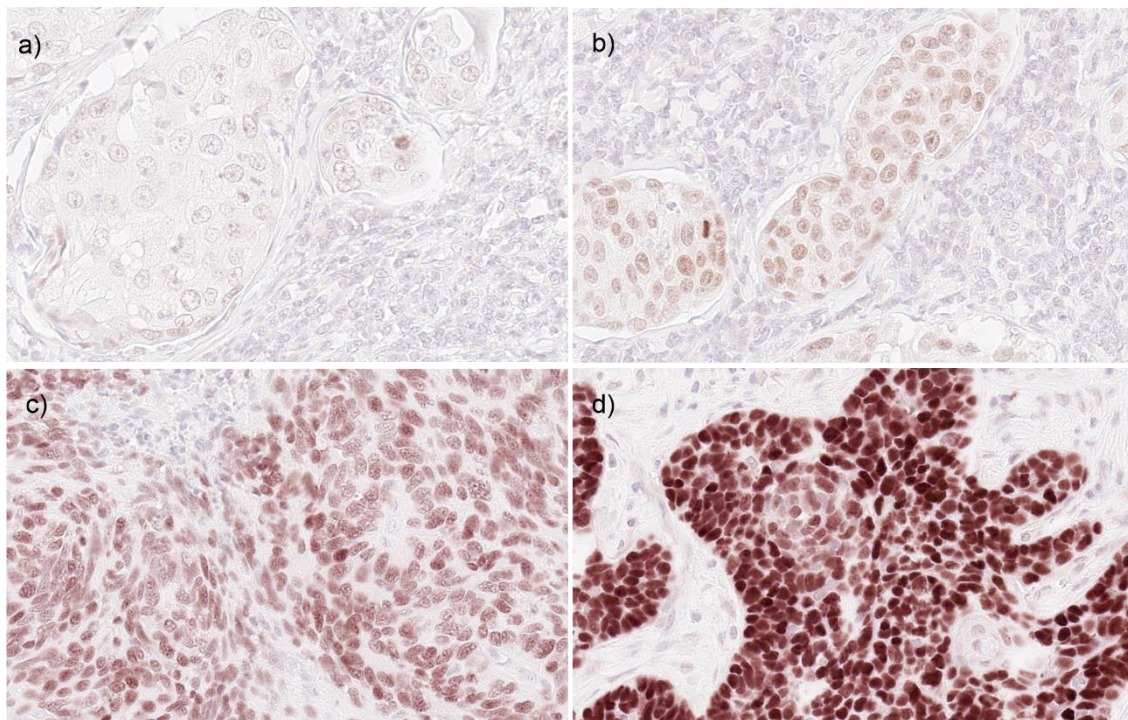


Abbildung 20: Intensitäten der Expression des p63-Antikörpers aufgenommen mit dem 20-er Objektiv. a) ungefärbtes Tumorgewebe, b) schwache, c) mittlere und d) starke Expression im Tumorgewebe.

4.5.2 Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren bzw. Tumorkriterien und der metrisch eingeteilten p63-Expression

Um der Frage nachzugehen welche Variablen Einfluss auf die p63-Expression nehmen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu finden sich in Tabelle 25. Hinsichtlich des TNM-Stadiums und der sich daraus ergebenden UICC7-Einteilung besteht kein signifikanter Zusammenhang mit der p63-Expression. Die differenzierte Aufteilung des T- und N-Stadiums wird in Abbildung 21 gezeigt. Auch zwischen dem HPV-Status und dem sich daraus ergebenden UICC8-Stadium besteht kein signifikanter Zusammenhang mit der Expression von p63.

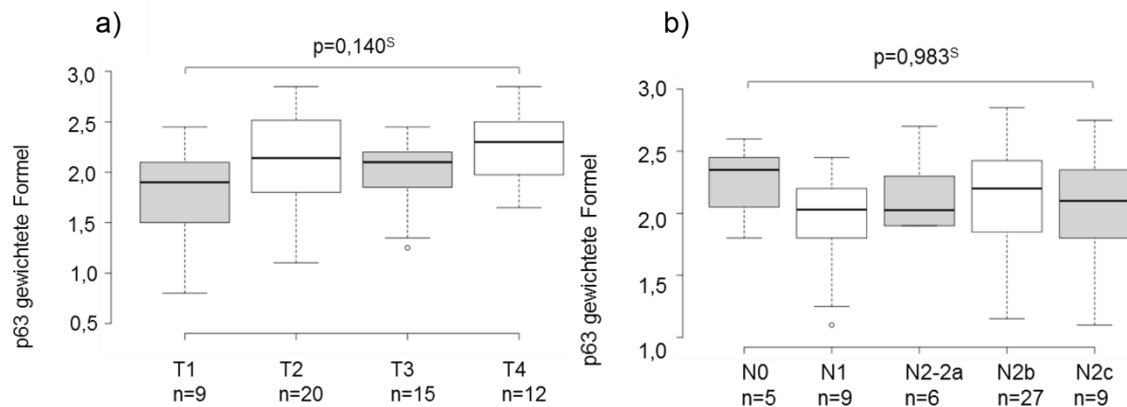


Abbildung 21: Korrelation der p63-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit a) dem T-Stadium und b) dem N-Stadium. a) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,200. b) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,003. ^s Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.

Tabelle 25: Korrelation der Tumorcharakteristika der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.

		Spearman	
		Korrelation	p-Wert
T-Stadium ²	0-2	0,081	0,554
	3-4		
	0	0,200	0,140
	1		
	2		
	3		
4			
N-Stadium	N0	-0,126	0,354
	N+		
	N0	0,003	0,983
	N1		
	N2-N2a		
	N2b		
N2c			
M-Stadium ¹	M0	-0,096	0,483
	M+		
HPV	assoziiert	-0,166	0,222
	negativ		
UICC7 Stadium	I-III	0,071	0,601
	>III		
	I	0,020	0,884
	II		
	III		
	IV-IVa		
	IVb		
IVc			
UICC8 Stadium	I-III	-0,049	0,720
	>III		
	I	0,009	0,948
	II		
	III		
	IV-IVa		
	IVb		
IVc			

Ausprägung der p63 Färbeintensität zwischen 0 und 3; ¹ M+ im Verlauf; ² aufgrund von geringer Fallzahl werden T4a-b zu T4 zusammengefasst; da keine Patienten in die Kategorie N3 fallen wurde diese Zeile weggelassen

In Tabelle 26 sind die Daten zu den allgemeinen Patienteneigenschaften und Risikofaktoren in Bezug zur p63-Expression festgehalten. Weder das Geschlecht noch das Alter bei Diagnosestellung wiesen einen signifikanten Zusammenhang zu der p63-Expression auf. Auch zwischen dem Raucher-Status und dem Tabakkonsum in *packyears* besteht kein signifikanter Zusammenhang zur metrisch eingeteilten p63-Expression. Bei den Pa-

tienten, welche einen Alkoholkonsum bejahten, wurde das Tumorgewebe in der immunhistochemischen Färbung signifikant stärker mit dem p63-Antikörper angefärbt ($p=0,030$, Korrelationskoeffizient= $0,292$; Abbildung 22).

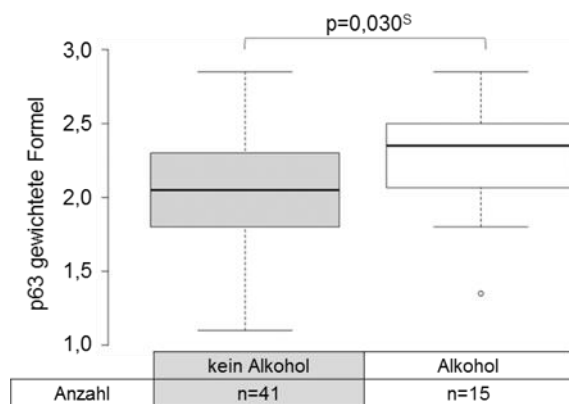


Abbildung 22: Korrelation des Alkoholkonsum in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit der p63-Expression. Der Korrelationskoeffizient beträgt $0,292$.^S Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.

Tabelle 26: Korrelation der Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.

		Spearman	
		Korrelation	p-Wert
Geschlecht	männlich	$-0,056$	$0,684$
	weiblich		
Alter bei Diagnose		$-0,120$	$0,380$
Alkohol	ja	$0,292$	$0,030$
	nein		
Rauchen	ja	$0,154$	$0,256$
	nein		
Packyears		$0,080$	$0,557$

Ausprägung der p63 Färbeintensität zwischen 0 und 3; fett geschrieben: signifikante p-Werte.

4.5.3 Risikofaktoren und Tumorcharakteristika in Bezug zur dichotomisierten p63-Expression

Tabelle 27 zeigt die ausführlichen Daten zu den Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte mit Differenzierung nach der Expression von p63. Insgesamt zeigten 30 Tumoren eine starke und 26 Tumoren eine schwache p63-Expression. Bei Betrachtung der Verteilung der Packyears in den Gruppen mit starker bzw. schwacher p63-Expression, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen ($p=0,489$, Abbildung 23). Der Median der Packyears bei den Patienten, deren Tumorgewebe eine starke Expression zeigte, lag bei 30. Bei den Patienten mit schwach gefärbten Tumoren lag der Median bei 31 py. Die anderen Variablen, die zur

Auswahl der OPSCC-Untersuchungskohorte herangezogen wurden, zeigen ebenso keinen signifikanten Unterschied bei der Stratifizierung nach Intensität der p63-Expression.

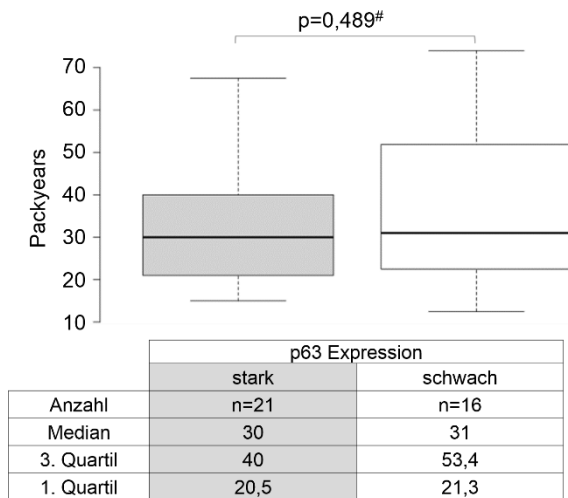


Abbildung 23: Konsumierte Packyears der Raucher (n=37) differenziert nach der p63-Expression. # Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.

Tabelle 27: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression in der Rangfolge der Auswahlkriterien.

		Rang	gesamt		stark exprimiert		schwach exprimiert		p-Wert
			n=56	%	n=30	%	n=26	%	
HPV	assoziiert		28	50,0	14	46,7	14	53,8	0,592*
	negativ		28	50,0	16	53,3	12	46,2	
LR/FM	+		28	50,0	12	40,0	16	61,5	0,108*
	-		28	50,0	18	60,0	10	38,5	
N-Stadium	N0	1	5	8,9	3	10,0	2	7,7	0,478#
	N+		51	91,1	27	90,0	24	92,3	
	N0		5	8,9	3	10,0	2	7,7	
	N1		9	16,1	3	10,0	6	23,1	
	N2-N2a		6	10,7	3	10,0	3	11,5	
	N2b		27	48,2	16	53,3	11	42,3	
Rauchen	ja	2	37	66,1	21	70,0	16	61,5	0,505*
	nein		19	33,9	9	30,0	10	38,5	
Packyears ¹	Median	2a	30		30		31	0,489#	
	3. Quartil		40		40		53,4		
	1. Quartil		20,5		20,5		21,3		
Alkohol (Standardgläser/Tag)	>2	3	14	25,5	10	34,5	4	15,4	0,105*
	<2		41	74,5	19	65,5	22	84,6	
	unbekannt		1		1		0		
T-Stadium ²	0-2	4	29	51,8	13	43,3	16	61,5	0,071#
	3-4		27	48,2	17	56,7	10	38,5	
	0		1	1,8	0	0,0	1	3,8	
	1		8	14,3	3	10,0	5	19,2	
	2		20	35,7	10	33,3	10	38,5	
	3		15	26,8	8	26,7	7	26,9	
Geschlecht	männlich	5	45	80,4	23	76,7	22	84,6	0,351*
	weiblich		11	19,6	7	23,3	4	15,4	
Alter bei Diagnose	Median	6	64,3		64,2		64,3	0,317§	
	3. Quartil		70,6		70,6		70,6		
	1. Quartil		53,1		51,1		57,3		

* Chi, Asympt., 2-seitig; + Fisher Exakt, 2-seitig; # Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; § t-Test, Asympt., 2-seitig; ¹ Bei der Berechnung der Packyears werden nur die Raucher berücksichtigt (n=37); ² aufgrund von geringer Fallzahl werden T4a-b zu T4 zusammengefasst; da keine Patienten in die Kategorie N3 fallen wurde diese Zeile weggelassen

In Tabelle 28 sind die Daten zu weiteren Tumorcharakteristika und Risikofaktoren aufgeführt, die keinen Einfluss auf die Auswahl der OPSCC-Untersuchungskohorte hatten, stratifiziert nach der p63-Expression. Hinsichtlich keiner der untersuchten Variablen zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei Differenzierung nach der dichotomen p63-Expression.

Tabelle 28: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.

		gesamt		stark exprimiert		schwach exprimiert		p-Wert
		n=56	%	n=30	%	n=26	%	
Lokalisation	Tonsille	28	50,0	17	60,0	11	40,0	0,284*
	nicht Tonsille	28	50,0	13	40,0	15	60,0	
UICC7 Stadium	I-III	12	21,4	5	16,7	7	26,9	0,351*
	>III	44	78,6	25	83,3	19	73,1	
	I	1	1,8	1	3,3	0	0,0	0,951#
	II	2	3,6	2	6,7	0	0,0	
	III	9	16,1	2	6,7	7	26,9	
	IV-IVa	27	48,2	16	53,3	11	42,3	
	IVb	5	8,9	4	13,3	1	3,8	
IVc	12	21,4	5	16,7	7	26,9		
UICC8 Stadium	I-III	25	44,6	14	46,7	11	42,3	0,743*
	>III	31	55,4	16	53,3	15	57,7	
	I	7	12,5	6	20,0	1	3,8	0,749#
	II	10	17,9	3	10,0	7	26,9	
	III	8	14,3	5	16,7	3	11,5	
	IV-IVa	25	44,6	13	43,3	12	46,2	
	IVb	3	5,4	2	6,7	1	3,8	
IVc	3	5,4	1	3,3	2	7,7		
Komorbidität ECOG	gesund (0-1)	41	73,2	21	70,0	20	76,9	0,560*
	krank (2-4)	15	26,8	9	30,0	6	23,1	
	0	5	8,9	2	6,7	3	11,5	0,389#
	1	36	64,3	19	63,3	17	65,4	
	2	13	23,2	7	23,3	6	23,1	
	3	2	3,6	2	6,7	0	0,0	
4	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
M-Stadium ¹	M0	44	78,6	25	83,3	19	73,1	0,351*
	M+	12	21,4	5	16,7	7	26,9	
RIPK 4	stark	26	46,4	16	53,3	10	38,5	0,266*
	schwach	30	53,6	14	46,7	16	61,5	

* Chi, Asympt., 2-seitig; # Mann-Whitney-U Test, Asympt., 2-seitig; ¹ M+ im Verlauf

4.5.4 Überleben der OPSCC-Untersuchungskohorte stratifiziert nach der p63-Expression

In der OPSCC-Untersuchungskohorte lässt sich bei Aufteilung der Patienten nach der Expression von p63 kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der 5-Jahresüberlebensrate feststellen ($p=0,604$). Patienten der Gruppe mit starker p63-Expression hatten ein 5-Jahresüberleben von 44,0%. Die Patienten in der Gruppe mit schwacher p63-Expression erreichten zu 36,5% ein Überleben von 5 Jahren nach Diagnosestellung (Abbildung 24).

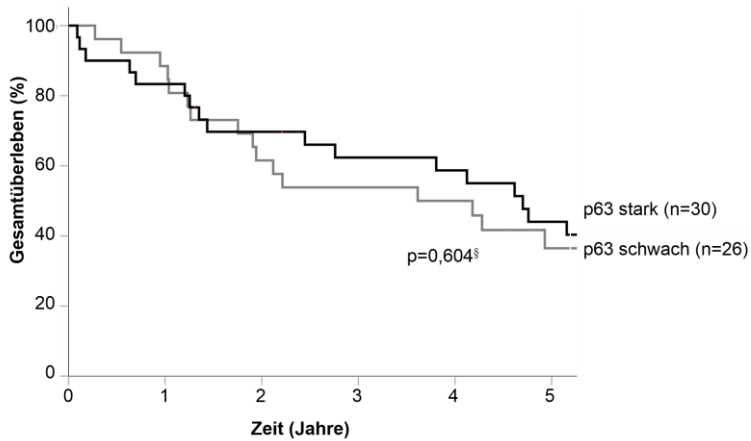


Abbildung 24: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dichotomisierten p63-Expression im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

4.6 Zusammenhänge zwischen der Expression von p63- und RIPK4

4.6.1 Korrelation der p63- und RIPK4-Expression

In einer Korrelationsanalyse wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang der Färbintensitäten zwischen der p63- und der RIPK4-Expression gibt. Die Abbildung 25 zeigt, dass mit ansteigender Expression von RIPK4 auch die Expression von p63 signifikant ansteigt ($p=0,038$). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,278. Folglich besteht ein schwacher bis mäßiger Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen.

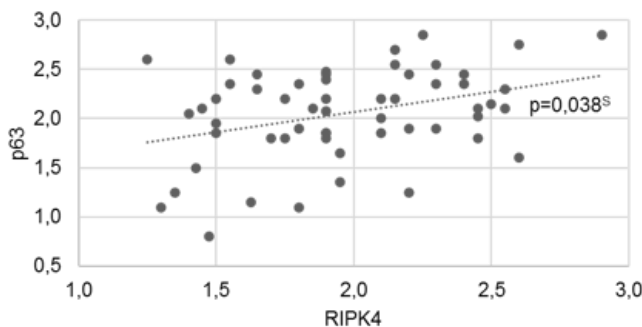


Abbildung 25: Korrelation der p63- mit der RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,278. § Der Korrelationskoeffizient und der p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.

4.6.2 Deskriptive Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob sich Unterschiede hinsichtlich der Expression von p63 und RIPK4 in den vier Untergruppen in der OPSCC-Untersuchungskohorte zeigen. Hinsichtlich der p63-Expression zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen ($p=0,368$). Der geringste Anteil stark p63-gefärbter Tumoren (35,7%; 5/14) ist in der Patientengruppe mit HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM zu finden. In den anderen drei Gruppen waren zu jeweils über 50% Patienten stark p63-gefärbte Tumoren (Abbildung 26a).

Auch die Verteilung der RIPK4-Expression ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,368$). Den höchsten Anteil starker RIPK4-Expression mit

64,3% (9/14) hatte die Patientengruppe mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM. Der geringste Anteil von 35,7% (5/14) fand sich sowohl bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC und LR/FM als auch bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne LR/FM. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC ohne LR/FM zeigte sich mit jeweils 50% (7/14) eine gleiche Verteilung zwischen der starken und der schwachen Expression (Abbildung 26b).

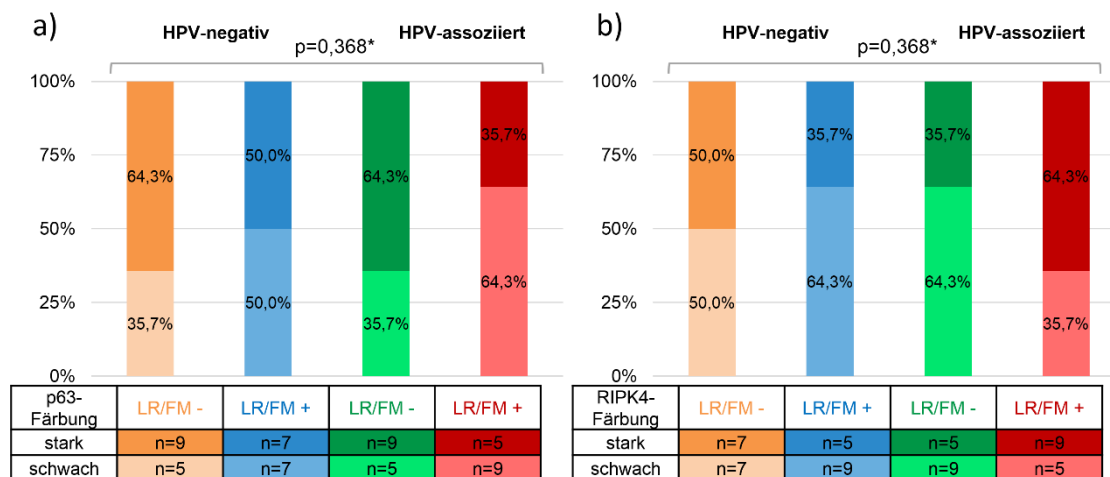


Abbildung 26: Verteilung der a) p63 und b) RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. * Der p-Wert wurde mittels Chi-Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.

4.6.3 Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte

In Tabelle 29 ist eine weiterführende Analyse zum Gesamtüberleben abgebildet. Hierfür wurden die Variablen zur Expression von p63 und RIPK4 in das finale Modell der multivariaten Cox-Regression (Tabelle 20 Schritt 3) miteinbezogen. Beide hinzugefügten Variablen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Auch in der einzelnen Einbeziehung der Variablen zur Expression von RIPK4 und p63 wurde kein signifikanter Einfluss auf das Überleben festgestellt (Anhang: Tabelle 33 und Tabelle 34). Daher kann konstatiert werden, dass die p63- und die RIPK4-Expression keine unabhängigen Variablen im Modell des Gesamtüberlebens sind.

Tabelle 29: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte inklusive der Variablen zur RIPK4- und p63-Expression.

		multivariate Cox-Regression			p-Wert °
		HR	95% KI unten	95% KI oben	
Alter	< Median	1			0,031
	≥ Median	2,353	1,081	5,122	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			0,005
	>2	3,367	1,438	7,883	
T-Stadium	1-2	1			0,020
	3-4	2,546	1,162	5,582	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	6,295	2,688	14,742	
p63	schwach	1			0,321
	stark	0,673	0,308	1,472	
RIPK4	schwach	1			0,706
	stark	0,867	0,413	1,82	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; S.d.: Standardfehler; 5-JÜR: 5-Jahresüberleben in Prozent; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

5. Diskussion

5.1 Analyse des OPSCC-Gesamtkollektivs

5.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

In Deutschland liegt der Anteil HPV-assoziiierter OPSCC bei 20-40% (Würdemann et al. 2017; Quabius et al. 2015). In dem untersuchten OPSCC-Gesamtkollektiv hatten 27,3% der Patienten HPV-assoziierte Tumore, was im angegebenen Rahmen der Prävalenz liegt (Tabelle 9). Verschiedene Studien zeigen, dass eine deutliche Mehrheit von über 70% der OPSCC-Patienten männlich ist (Lin et al. 2013; Ang et al. 2010; O'Sullivan et al. 2013). Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in dem OPSCC-Gesamtkollektiv wieder (77,9% vs. 22,1%). In einigen Studien waren die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren im Median jünger als die Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Lin et al. 2013; Ang et al. 2010; O'Sullivan et al. 2013). Jedoch waren in unserem Kollektiv die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC signifikant älter (im Median 62,6 vs. 60 Jahre). Es wurden auch andere Daten publiziert, die einen Anstieg des medianen Diagnosealters bei HPV-assoziierten OPSCC-Patienten zeigen (Thompson et al. 2018). Bereits veröffentlichte Daten unseres Kollektivs in Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit weisen einen ähnlichen Trend nach. Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC die Diagnose in zunehmend höherem Alter gestellt wird. Im Rahmen des demographischen Wandels könnte dies durch eine stetige Zunahme der Lebenserwartung erklärt werden. Als limitierend muss der Aspekt gewertet werden, dass die hier genannten Datensätze jeweils nur in einer einzelnen Institution erhoben wurden und populationsbasierende Daten weitgehend fehlen.

In unserem Kollektiv wird die allgemeine Ansicht bestätigt, dass die HPV-negativen OPSCC mehrheitlich auf den Konsum von Alkohol und Tabakwaren zurückzuführen sind. Die Karzinogenese bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC lässt sich dagegen weniger deutlich durch den Abusus von Noxen begründen. Jedoch wurden auch in dieser Subgruppe Patienten identifiziert, die das „klassische Risikoprofil“ aufwiesen. Die Malignomentstehung ist in den meisten Fällen daher kaum auf singuläre Aspekte zurückzuführen. Vielmehr kann der Einfluss verschiedenster kanzerogener Faktoren eine komplexe Kaskade an Interaktion begünstigen, die letztendlich in der malignen Entartung von Zellen gipfelt.

Verschiedene Studien zeigen, dass die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mehrheitlich einen guten Allgemeinzustand nach ECOG hatten (Ang et al. 2010; Fakhry et al. 2008). In unserem OPSCC-Gesamtkollektiv kann dieses Ergebnis ebenso gezeigt werden (ohne signifikante Unterschiede, $p=0,054$). Ein ähnlicher Trend wurde auch in einer

anderen Publikation nachgewiesen unter Anwendung des detaillierteren ACE27 Scores (Rietbergen et al. 2013). Im Gegensatz zur ECOG-Skala berücksichtigt der ACE27 Score unter anderem auch die Menge konsumierten Alkohols. Das könnte erklären, weshalb die Patienten mit HPV-negativen OPSCC oft in höhere Stadien eingeteilt wurden. Des Weiteren ist bekannt, dass der Konsum von Tabak und Alkohol grundsätzlich gesundheitsschädlich ist. Damit einhergehend erklärt sich, dass der intensive Noxenabusus auch zu einer erhöhten Komorbidität führt und dies folglich gehäuft bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC vorliegt.

Wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, ist eine Mehrheit der Patienten mit HPV-negativen OPSCC über 60 Jahre alt. Das könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die hohen ECOG-Stadien dieser Patienten sein. Nennenswert ist jedoch, dass die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren im Median älter sind als die mit HPV-negativen und trotzdem häufiger ein niedrigeres ECOG-Stadium haben. Möglicherweise hat das numerische Alter einen geringen Einfluss auf den Allgemeinzustand der Patienten. Vielmehr könnte das biologische Alter, das näherungsweise durch Skalen wie ECOG oder ACE27 abgebildet werden kann, für die Prognose entscheidender sein.

5.1.2 Tumorcharakteristika

Bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC werden die Tumorerkrankungen oft in niedrigen T-Stadien, jedoch bei bereits fortgeschrittenen N-Stadien diagnostiziert (Würdemann et al. 2017; Rietbergen et al. 2013; Klozar et al. 2013). Diese Ergebnisse werden auch in unserem OPSCC-Gesamtkollektiv wiedergespiegelt (jeweils $p < 0,001$; Tabelle 10). Bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC findet offenbar bereits früher im Krankheitsverlauf eine lymphogene Metastasierung statt als bei den HPV-negativen (Sood et al. 2014; Rajasekaran et al. 2021; Sood et al. 2014). Dies könnte erklären, weshalb die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren aufgrund einer Schwellung am Hals (hervorgerufen durch die Lymphknotenmetastase) „früher“ einen Arzt aufsuchen und daher häufiger kleinere Primärtumore diagnostiziert werden. Die Einteilung der Tumorstadien nach UICC7 zeigte keinen signifikanten Unterschied im OPSCC-Gesamtkollektiv bei Differenzierung nach dem HPV-Status. Dagegen wurde dargestellt, dass die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren signifikant niedrigere Stadien nach UICC8 hatten, als die HPV-negativen ($p < 0,001$). Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass die neue Version der Einteilung der Tumorstadien (UICC8) die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren einem adäquateren Stadium zuordnet (Würdemann et al. 2017; O'Sullivan et al. 2016).

Zusammenfassend bildet sich bei den Patienten des OPSCC-Gesamtkollektivs eine Zusammensetzung an Risikofaktoren und Tumorcharakteristika ab, die auch in anderen Studienkohorten wiedergefunden wurde. So kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegende Stichprobe eine weitgehend repräsentative Zusammensetzung an OPSCC-Patienten zeigt.

5.1.3 Uni- und multivariate Überlebensanalyse

In der univariaten Überlebensanalyse wurde bei allen untersuchten Risikofaktoren und Tumorcharakteristika mit Ausnahme des Geschlechts ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens gezeigt (Tabelle 17). In anderen Studien wurde ebenso belegt, dass die Differenzierung nach Geschlecht keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat (Hashida et al. 2021). Ein geringer Nikotin- und Alkoholkonsum ging dagegen in dem OPSCC-Gesamtkollektiv mit einem besseren Gesamtüberleben einher. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in weiteren Studien gezeigt: ein signifikant negativer Zusammenhang wurde zwischen einem hohen Nikotin- sowie Alkoholkonsum und dem Überleben nachgewiesen (Rios Velazquez et al. 2014; Ang et al. 2010). In den genannten Studien waren ebenfalls hohe T- und N-Stadien, ein schlechter Allgemeinzustand sowie ein negativer HPV-Status mit schlechtem Gesamtüberleben assoziiert. Für die gleichen Variablen wurde auch in unserem Kollektiv eine signifikant schlechtere Prognose gezeigt.

Zusammenfassend zeigen verschiedene Studien in Übereinstimmung mit unseren Daten, dass sich der Noxenabusus negativ auf das Überleben auswirkt. Möglicherweise sind diese Risikofaktoren auch ursächlich für ein höheres ECOG-Stadium, was ebenso das Gesamtüberleben negativ beeinflusst. Auch hohe T- und N-Stadien und damit einhergehend eine insgesamt fortgeschrittene Tumorerkrankung, wirken negativ auf die Prognose ein. Ebenso ist der HPV-Status als prognosebestimmender Faktor zu berücksichtigen.

In der multivariaten Überlebensanalyse wurden folgende Variablen identifiziert, die eine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben haben: Alter bei Diagnosestellung, HPV-Status, Komorbidität (nach ECOG), Alkoholkonsum, T- und M-Stadium (Tabelle 18). Der Alkoholkonsum scheint ein weitgehend unabhängiger Einflussfaktor hinsichtlich des Überlebens zu sein (Anhang: Tabelle 35 und Tabelle 36). Jedoch scheint die Variable Rauchen kein unabhängiger Risikofaktor zu sein (Anhang: Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 38).

Grundsätzlich wurde von Anderen gezeigt, dass sich Patienten anhand verschiedener Variablen in Risikogruppen hinsichtlich des Überlebens klassifizieren lassen. So wurden

die Variablen HPV-Status, Nikotinkonsum, T- und N-Stadium als unabhängige Risikofaktoren in der Überlebensanalyse identifiziert (Agrawal et al. 2011; Ang et al. 2010). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde neben dem HPV-Status zusätzlich die Komorbidität (nach ECOG), das T- und N-Stadium, der Raucherstatus sowie das Alter bei Diagnosestellung als Variablen mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben herausgearbeitet (Wagner et al. 2017).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in allen untersuchten Datensätzen der HPV-Status in Kombination mit bestimmten Risikofaktoren und den TNM-Stadien einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte. Der HPV-Status kann auch anhand der Ergebnisse der multivariaten Analyse in unserer OPSCC-Kohorte als prognosebestimmender Faktor benannt werden.

5.2 Analyse der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit LR/FM

5.2.1 Patientencharakteristika bei HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM

Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC haben ein sehr gutes Ansprechen auf die tumorspezifische Therapie und folglich ein besseres Gesamtüberleben als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (Wagner et al. 2020; Fakhry et al. 2017). Jedoch entwickeln auch unter diesen Patienten etwa 13-25% ein LR/FM innerhalb von zwei Jahren nach Durchführung der Standardtherapie (Vyas et al. 2021; Faraji et al. 2017; Fakhry et al. 2008). Unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC des Gesamtkollektivs dieser Arbeit wiesen 10,5% im Verlauf ein LR/FM auf (Tabelle 11 und Tabelle 12). Besonders auffällig an diesen Patienten war das fortgeschrittene Alter bei Diagnosestellung, sowie ein hohes EGOC-Stadium im Vergleich zu den anderen drei Gruppen. Das fortgeschrittene Alter gilt als allgemeiner Risikofaktor für Tumorerkrankungen (White et al. 2014). Neben zahlreichen weiteren Ursachen, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass metabolische Veränderungen bei älteren Menschen, einen Tumorprogress und aggressiven Krankheitsverlauf begünstigen können (Gomes et al. 2020). Eine weitere denkbare Erklärung für das Auftreten von LR/FM ist die intrinsische Schwächung des Immunsystems mit zunehmendem Alter (Salam et al. 2013).

5.2.2 Tumoreigenschaften bei HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM

In unserem Kollektiv wurde gezeigt, dass die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM mehrheitlich in einem hohen T-Stadium waren. Grundsätzlich könnte davon ausgegangen werden, dass ein lokal weit fortgeschrittener Tumorbefund durch begrenzte operative Möglichkeiten im Kopf-Halsbereich mit einem höheren Risiko für ein Lokalrezidiv assoziiert sein könnte. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC, die lediglich eine operative Therapie erhielten, das

T-Stadium keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten eines Lokalrezidivs hatte (Waltonen et al. 2021). Neben der primär chirurgischen Therapie kann auch bei ausgedehnten lokalen Tumorbefunden eine primäre Radio(chemo)therapie angewandt werden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Wahl des Therapieverfahrens keinen Unterschied im Hinblick auf das Gesamtüberleben von OPSCC-Patienten hatte (Zimmermann et al. 2021; Kano et al. 2013). Grundsätzlich geht ein hohes T-Stadium bei HPV-assoziierten OPSCC-Patienten mit einer schlechteren Überlebensprognose einher, als niedrige T-Stadien. Die Wahl des Therapieverfahrens scheint, unabhängig vom T-Stadium, keinen Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben zu bewirken (Beltz et al. 2018; Zimmermann et al. 2021).

Auch auf molekularer Ebene gibt es verschiedene Erklärungsansätze für einen schlechten Verlauf unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Unsere Arbeitsgruppe hat eine Mutationsanalyse veröffentlicht in der gezeigt werden konnte, dass die HPV-assoziierten Tumoren der Patienten mit einem LR/FM mehr Mutationen aufweisen, als die der Patienten ohne LR/FM. Die Anzahl der Mutationen entsprach ungefähr der in HPV-negativen Tumorproben (Reder et al. 2019). Dieses Ergebnis wurde von verschiedenen anderen Studien bestätigt (Harbison et al. 2018; Morris et al. 2017). Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, kann die HPV-DNA in verschiedenen Zuständen in den Tumorzellen vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration von HPV-DNA und somit der Verlust der E2-Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist (Nulton et al. 2018). Es scheint auch einen Zusammenhang zwischen der Tumorlokalisation und der Expression von E2 zu geben. So wurde in einer Studie nachgewiesen, dass bei Tumoren des Oropharynx das E2 Gen häufiger intakt ist, als bei Kopf-Halstumoren außerhalb des Oropharynx. Dies wurde auch mit einem besseren klinischen Verlauf in Verbindung gebracht (Anayannis et al. 2018). Dahingegen wurde unter den HPV-assoziierten OPSCC eine Subgruppe mit zerstörtem E2-Gen und/oder niedriger E2-Expression identifiziert, die eher eine schlechte Prognose haben (Anayannis et al. 2018).

Es ist nicht vollständig geklärt, weshalb manche Fälle ein LR/FM entwickeln. Einerseits scheint eine hohe Mutationslast mit einem schlechten Verlauf in Verbindung zu stehen. Auf der anderen Seite könnte HPV selbst, z.B. durch Interaktionen mit dem Wirtsgenom, zum gehäuften Auftreten eines LR/FM führen.

5.2.3 Gesamtüberleben des OPSCC-Gesamtkollektiv differenziert nach dem HPV-Status und dem Auftreten eines LR/FM

Das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit LR/FM ist schlechter als das der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren ohne LR/FM, sogar schlechter als das der Patienten mit HPV-negativen Tumoren unabhängig vom Auftreten eines LR/FM in dieser Gruppe (Abbildung 12). Dieses Ergebnis wurde bereits in einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Reder et al. 2021). Jedoch wurde in anderen Untersuchungen herausgefunden, dass das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM besser war, als das der HPV-negativen Patientengruppen (Faraji et al. 2017; Fakhry et al. 2014). Der Überlebensvorteil HPV-assoziiierter OPSCC-Patienten konnte, im Gegensatz zu unserem OPSCC-Gesamtkollektiv, bei den zitierten Studien auch im Fall des Auftretens eines LR/FM nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigt sich bei den Überlebenskurven der Patienten mit HPV negativen OPSCC mit bzw. ohne LR/FM ein umgekehrt sigmoidaler Verlauf (Abbildung 12). Bei den Patienten mit einem LR/FM zeigt sich früh ein Abfall der Kurve, der sich wieder stabilisiert. Die Überlebenskurve der Patienten ohne LR/FM ist initial relativ stabil und weist im Verlauf einen Abfall auf. Mögliche Ursachen für den auffälligen Verlauf könnten in den verschiedenen Therapieregimen liegen.

5.3 Komposition und Gesamtüberleben der OPSCC-Untersuchungskohorte

Die OPSCC-Untersuchungskohorte setzt sich aus gezielt ausgewählten Fällen zusammen (vgl. Kapitel 3.1). Dabei war die Gruppe der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit einem LR/FM, auf Grund des zu Verfügung stehenden FFPE-Materials, auf eine Fallzahl von n=14 limitiert. Durch die gezielte Auswahl wurden Einflüsse und Zusammenhänge der patientenspezifischen Eigenschaften, Risikofaktoren und Tumorcharakteristika weitgehend ausgeschaltet. Damit konnte eine vergleichbare Basis innerhalb der vier Gruppen zur Untersuchung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden unter anderem im Hinblick auf die immunohistochemische Expression von p63 und RIPK4 geschaffen werden. Die signifikanten Unterschiede des OPSCC-Gesamtkollektiv hinsichtlich der Auswahlkriterien wurden bei der gezielt ausgewählten OPSCC-Untersuchungskohorte weitgehend aufgehoben (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 15). In einer Publikation unserer Arbeitsgruppe wurde diese Patientenkohorte für die Untersuchung von Genommutationen genutzt (Reder et al. 2019). Auch andere Studien haben aus ähnlichen Gründen das Patientenkollektiv durch gezielte Auswahl zusammengestellt (Vyas et al. 2021).

Im Vergleich zum OPSCC-Gesamtkollektiv bildet sich bei der Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte ein weniger deutlicher Verlauf ab (Abbildung 14). Wie

das Kaplan-Meier Diagramm zeigt, kann nur eine Tendenz (ohne signifikante Unterschiede) hinsichtlich der unterschiedlichen Überlebenskurven konstatiert werden. Jedoch sind die Verläufe der Überlebenskurven der OPSCC-Untersuchungskohorte insgesamt betrachtet mit denen des OPSCC-Gesamtkollektivs vereinbar (Abbildung 12), trotz gezielter Auswahl der Patienten.

5.4 Immunhistochemischer Nachweis von RIPK4

In HPV-assoziierten OPSCC findet sich eine signifikante Häufung von Mutationen im RIPK4-Gen (vgl. Kapitel 1.3.2; Gillison et al. 2019; Stransky et al. 2011). Unsere Arbeitsgruppe hat in einer Sequenzierungsuntersuchung des gesamten Genoms (*whole-exome-sequencing*) eines Falles mit HPV-assoziiertem OPSCC ebenso ein mutiertes RIPK4-Gen nachgewiesen (unveröffentlicht). Über verschiedene Interaktionen und durch die Regulation von Signalwegen nimmt RIPK4 eine zentrale Rolle in der Karzinogenese ein (vgl. Kapitel 1.3.2). Verschiedene Quellen belegen eine signifikant erhöhte Expression von RIPK4 in unterschiedlichen Tumorentitäten unter anderem auch in Kopfhals-Tumoren (Gong et al. 2018; Qi et al. 2018; Liu et al. 2015). Bei vielen Tumorentitäten konnte festgestellt werden, dass die Patienten mit starker RIPK4-Expression im Tumorgewebe ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben hatten (Yi et al. 2020; Liu et al. 2021; Azizmohammadi et al. 2017; Liu et al. 2015). Die RIPK4-Expression scheint daher häufig mit einer schlechten Prognose einherzugehen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Expression von RIPK4 in den OPSCC untersucht werden, insbesondere im Zusammenhang mit HPV und dem Auftreten von LR/FM bei bestimmten Patienten. So sollte diese Patientengruppe und mögliche Ursachen für das Auftreten eines LR/FM näher beschrieben werden.

Die immunhistochemische Färbung von RIPK4 zeigte in der Untersuchungskohorte bei 26 OPSCC eine starke und bei 30 eine schwache Expression (Tabelle 23 und Tabelle 24). Weder bei Aufteilung der Patienten nach dem HPV-Status noch nach dem Auftreten eines LR/FM zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der RIPK4-Expression. Jedoch hatten Patienten mit hohen T-Stadien im Tumorgewebe eine signifikant erhöhte RIPK4-Expression. Bei Cervixkarzinomen wurde ebenso eine signifikant erhöhte Expression von RIPK4 in den hohen T-Stadien nachgewiesen (Liu et al. 2015). Gleiches wurde auch in einer Untersuchung zu Osteosarkomen gezeigt (Yi et al. 2020). In der OPSCC-Untersuchungskohorte war ebenfalls bei den Patienten mit fortgeschrittener lymphogener Metastasierung die RIPK4-Expression erhöht. Auch bei Cervixkarzinompatientinnen mit positiven N-Stadien wurde eine starke RIPK4-Expression des Tumorgewebes festgestellt (Azizmohammadi et al. 2017). Dem gegenüber wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass das N-Stadium keinen Einfluss auf die RIPK4-Expression

hatte, jedoch waren dies keine OPSCC (Wang et al. 2014). Das M-Stadium hatte in der untersuchten Patientenkohorte keine Auswirkung auf die Intensität der RIPK4-Expression. Bei Patientinnen mit vorliegender Fernmetastasierung eines Cervixkarzinoms oder Ovarialkarzinoms wurde eine erhöhte RIPK4-Expression im Tumorgewebe nachgewiesen (Liu et al. 2021; Liu et al. 2015). Die allgemeinen Risikofaktoren wie Geschlecht, Alter, Nikotin- und Alkoholkonsum hatten in der OPSCC-Untersuchungskohorte keinen Einfluss auf die RIPK4-Expression. Bei Plattenepithelkarzinomen der Zunge wurde eine erhöhte RIPK4-Expression bei männlichen Patienten und auch bei Patienten in höherem Alter nachgewiesen (Wang et al. 2014). Jedoch konnte kein Einfluss der Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholkonsum auf die Expression von RIPK4 gezeigt werden (Wang et al. 2014).

Wie eingangs erwähnt, haben einige Autoren eine starke RIPK4-Expression mit einer schlechten Überlebensprognose in Verbindung gebracht. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde auch in der OPSCC-Untersuchungskohorte nachgewiesen, dass die Patienten mit starker RIPK4-Expression eine geringere 5-Jahresüberlebensrate hatten, als die Patienten mit schwacher RIPK4-Expression (jedoch ohne signifikanten Unterschied, Abbildung 24, $p=0,604$).

Aufgrund der starken Expression von RIPK4 bei Tumoren mit hohen T- und N-Stadien kann postuliert werden, dass RIPK4 in den OPSCC tumorfördernde Funktionen ausüben könnte. Besonders im Hinblick auf die aktivierende Wirkung von RIPK4 auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg könnte es möglicherweise zu einer generellen Tumorprogression sowie zu einer Begünstigung der lymphogenen Invasion kommen.

5.5 Immunhistochemischer Nachweis von p63

Je nach Isoform übernimmt p63 unterschiedliche Funktionen in der Karzinogenese (vgl. Kapitel 1.4.2). Unserer Arbeitsgruppe zeigte in einer *targeted-next-generation-sequencing* Untersuchung, dass p63 in 28,6% der HPV-negativen OPSCC mit einem LR/FM und in 50% der HPV-negativen ohne LR/FM mutiert war. In den HPV-assoziierten OPSCC mit LR/FM wurden die p63-Mutationen häufiger gefunden als bei den Patienten ohne LR/FM (Reder et al. 2021; Reder et al. 2019). Die Integration von HPV ins Wirtsgenom bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs findet oft in unmittelbarer Nähe von oder im p63 Gen selbst statt. Dies bewirkt häufig eine Überexpression des Gens mit entsprechenden physiologischen Konsequenzen (Koneva et al. 2018; Walline et al. 2016; Bodelon et al. 2016; Parfenov et al. 2014).

Viele Studien haben eine starke p63-Expression in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen, unter anderem auch in OPSCC (Snizek et al. 2004; Massion et al. 2003). In

der OPSCC-Untersuchungskohorte dieser Arbeit wurde bei 30 Proben eine starke und bei 26 eine schwache Expression von p63 festgestellt (Tabelle 27 und Tabelle 28). Bei Differenzierung der Patienten nach dem HPV-Status und nach dem Auftreten eines LR/FM wurde eine vergleichbare Aufteilung der Färbeintensität unter den Gruppen beobachtet. Hinsichtlich der Risikofaktoren wurde in unserer OPSCC-Untersuchungskohorte nachgewiesen, dass die Patienten die einen Alkoholkonsum bejaht haben eine signifikant höhere p63-Expression der OPSCC hatten, als die Patienten ohne regelmäßigen Alkoholkonsum. Eine ähnliche Tendenz konnte bei den Rauchern gezeigt werden. Die Tumorproben dieser Patienten wiesen häufiger eine starke p63-Expression auf als die der Nichtraucher, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die Patienten mit einem hohem Konsum an Alkohol oder Nikotin eine signifikant höhere p63-Expression hatten als die Patienten mit geringem Noxenabusus (Yang et al. 2021). Zusammenfassend wurde durch die Autoren der genannten Studie festgehalten, dass p63 eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt und dass dieser Effekt durch den regelmäßigen Konsum von Alkohol und Tabak verstärkt werden könnte.

In OPSCC, aber auch in anderen Tumorentitäten wurde vielfach nachgewiesen, dass ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer hohen p63-Expression assoziiert ist (Saghravanian et al. 2017). In unserer OPSCC-Untersuchungskohorte wurden keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Tumorstadium und die Expression von p63 nachgewiesen. In der nicht-dichotomen Einteilung der p63-Expression kann man erkennen, dass mit Zunahme des T-Stadiums auch die Färbeintensität zunimmt, jedoch ohne dass diese Korrelation Signifikanz erreicht. Bei der Differenzierung nach dem N-Stadium zeigt sich kein signifikanter Unterschied der p63-Expression. Auch in einer weiteren Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der p63-Expression und dem Tumorstadium nachgewiesen werden (Lo Muzio et al. 2005).

In viele anderen Publikationen wird nicht zwischen den einzelnen p63-Isoformen differenziert, da die genutzten Antikörper oft eine Vielzahl von Isoformen binden (Nekulova et al. 2013). Hierin könnte eine Erklärung für die zum Teil uneinheitlichen Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien liegen. Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, wird auch durch den hier verwendetet p63-Antikörper von Santa Cruz nicht zwischen den TAp63- und Δ Np63-Isoformen unterschieden.

Einige Studien haben den Einfluss der p63-Expression auf das Überleben von Tumorpatienten untersucht. Bei NSCLC war eine Überexpression von allen p63-Isoformen mit einem besseren Überleben assoziiert (Massion et al. 2003). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass in Mammakarzinomen die Überexpression von TAp63 mit einem

signifikant besseren Überleben assoziiert war, jedoch nicht die von $\Delta Np63$ (Coates et al. 2018). Auch hinsichtlich der Auswirkung einer p63-Überexpression auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Kopf-Halstumoren wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse gezeigt, dies ist möglicherweise auch darin begründet, dass in den Untersuchungen kaum eine Differenzierung der Isoformen stattfindet. So wurde einerseits eine bessere Prognose bei hoher p63-Expression festgestellt, auf der anderen Seite haben einige Studien eine verschlechterte Prognose nachgewiesen, bzw. kein signifikanten Einfluss auf das Überleben (Oliveira et al. 2007; Lo Muzio et al. 2005; Saghravarian et al. 2017; Moergel et al. 2010). In der von uns untersuchten Kohorte wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens bei Differenzierung nach der p63-Expression sichtbar.

Zusammenfassend wurde in der OPSCC-Untersuchungskohorte bei den Patienten mit hohem Alkoholkonsum auch eine signifikant stärkere p63-Expression festgestellt, als bei Patienten mit niedrigem Alkoholkonsum. Hinsichtlich der weiteren untersuchten Variablen, auch im Hinblick auf das Gesamtüberleben, zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit der p63-Expression. Der genutzte Antikörper lässt jedoch keine klare Aussage hinsichtlich der Anfärbung der Isoformen zu. Andere Publikationen haben teilweise uneinheitliche Ergebnisse gezeigt, so dass keine pauschal gültige Aussage hinsichtlich der p63-Expression und dem Gesamtüberleben möglich ist. Wie bereits in Kapitel 1.4.2 erwähnt, werden in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs einiger Publikationen zufolge vorrangig die $\Delta Np63$ -Isoformen exprimiert (Snizek et al. 2004; Brancaccio et al. 2018). Auf dieser Basis kann postuliert werden, dass auch in unserem Kollektiv primär diese Isoformen angefärbt wurden. Die $\Delta Np63$ -Isoformen wirken insgesamt eher tumorfördernd. Dies konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht dargestellt werden.

5.6 Zusammenhänge zwischen der Expression von RIPK4 und p63

Von verschiedenen Autoren wurde eine starke Expression von p63 und RIPK4 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs nachgewiesen. Auch in unserer Untersuchung wurde gezeigt, dass RIPK4 und p63 in den OPSCC exprimiert wird. In unserer Untersuchungskohorte wurde festgestellt, dass bei Zunahme der RIPK4-Expression auch die p63-Expression in den Tumorproben signifikant erhöht ist (Abbildung 25). Daraus lässt sich ein möglicher Zusammenhang dieser Proteine ableiten. Beide Proteine nehmen Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und können dadurch die Transkription bestimmter Zielgene regulieren. Außerdem besteht ein direkter Einfluss von p63 auf RIPK4: Die Transkription des RIPK4-Gens wird direkt durch $\Delta Np63$ aktiviert (Mitchell et

al. 2012). Demzufolge hat unsere Arbeitsgruppe bereits in einer vorangegangenen Publikation postuliert, dass zwischen p63 und RIPK4 ein Zusammenhang besteht, was einen Einfluss auf die Prognose von HPV-assoziierten OPSCC haben könnte (Reder et al. 2019). Eine weitere Komponente der p63-RIPK4-Interaktion ist der *interferon regulatory factor 6* (IRF6). Die Δ Np63-Isoform aktiviert auch die Transkription von IRF6. Über negative Rückkopplung kann IRF6 die Aktivität von p63 inhibieren (Moretti et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass es eine Interaktion von p63 und IRF6 mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg gibt (Ferretti et al. 2011). Auch RIPK4 ist ein Regulator von IRF6. Diese Interaktion verläuft primär über den PKC-Signalweg. Ausgeschlossen werden konnte jedoch nicht, dass die beiden Proteine auch im Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine bedeutende Rolle einnehmen (Kwa et al. 2014). So könnte IRF6 neben einer Funktion bei der Differenzierung von Epithelien, auch über Interaktionen mit p63 und RIPK4 bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen von Bedeutung sein (Kwa et al. 2014).

Zusammenfassend wurde in unserer Untersuchungskohorte ein signifikanter Zusammenhang von der p63- und der RIPK4-Expression festgestellt. Jedoch wurde kein Einfluss der Expression beider Proteine auf das Überleben der Patienten der Untersuchungskohorte nachgewiesen.

5.7 Limitationen

An erster Stelle muss als Einschränkung dieser Arbeit die Patientenzahl von n=56 in der OPSCC-Untersuchungskohorte genannt werden. Die relativ geringe Anzahl begründet sich einerseits darin, dass nur OPSCC-Patienten der Universitätsklinik in Gießen eingeschlossen wurden. Zum anderen war nicht von allen Patienten ausreichend in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe vorhanden. Des Weiteren kann die Qualität der FFPE-Schnitte als Limitation des Verfahrens gewertet werden. Je nach Alter der FFPE-Schnitte bindet der Antikörper möglicherweise unterschiedlich stark an das jeweilige Epitop. Auch die manuelle Herstellung der FFPE-Präparate und Schnitte kann zu Abweichungen der Qualität führen.

Als weiterer Aspekt ist die Bindungsspezifität der Antikörper zu nennen. Durch den genutzten Antikörper werden beide Isoformen von RIPK4 angefärbt. Durch den p63-Antikörper werden die Epitope der Δ Np63- sowie der TAp63-Isoformen gebunden. Folglich kann für die Ergebnisse der p63-Expression aus unserer OPSCC-Untersuchungskohorte keine eindeutige Aussage im Hinblick auf die Isoformen getroffen werden. Auch in der Literatur wird die Differenzierung nach Isoformen oft nicht berücksichtigt, da viele Studien Antikörper nutzen, welche alle p63-Isoformen binden (Nekulova et al. 2013). So kann häufig keine klare Unterscheidung hinsichtlich der Isoformen von p63 durchgeführt

werden. Zukünftig sind weitere Studien anzustreben, welche eine eindeutige Differenzierung der Isoformen gewähren, da sich hieraus unterschiedliche Implikationen auf die Karzinogenese ergeben könnten.

Hinsichtlich der klinischen Patientendaten ist zu erwähnen, dass diese vornehmlich aus Arztbriefen, dokumentierten Arzt-Patienten-Gesprächen der Tumornachsorge und Akten von stationären Aufenthalten stammen. Folglich wurden die Daten zu der OPSCC-Untersuchungskohorte retrospektiv aus Sekundärdaten erhoben. Bei manchen Variablen wie bspw. der Anzahl gerauchter *packyears* oder der Menge konsumierten Alkohols, kann von einer gewissen Unsicherheit in den Daten ausgegangen werden, da diese nicht direkt messbar waren.

5.8 Ausblick

Grundsätzlich sind gezielte Therapien (*targeted therapy*) in der Onkologie zunehmend erfolgsversprechend. Hierbei werden Arzneimittel appliziert, die bspw. in die Mechanismen der Onkogenese eingreifen. Basis für die Anwendung dieser neuen Therapien ist die genaue Kenntnis des Tumorgenoms, sowie der karzinogenen Mechanismen. Im Bereich der OPSCC gibt es hierzu aktuell verschiedene laufende Studien (Schuler et al. 2018). In diesem Rahmen wird bspw. die Ergänzung einer primären Radiochemotherapie durch den PD1-Inhibitor-Pembrolizumab untersucht (U.S. National Library of Medicine).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine RIPK4 und p63 näher untersucht. Hieraus lassen sich mögliche neue Therapieoptionen ableiten. So wurde in verschiedenen Veröffentlichungen RIPK4 als Zielgen für eine individuelle Therapie vorgeschlagen (Xu et al. 2020; Liu et al. 2015). Auch für p63 konnte aus unterschiedlichen Publikationen die Möglichkeit zur therapeutischen Anwendung abgeleitet werden (Sniezek et al. 2004). Beide Proteine spielen bei der Differenzierung von Epithelien und in der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen eine wichtige Rolle. Dies geschieht unter anderem durch Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Auch darin könnte ein möglicher Angriffspunkt für zukünftige Therapien liegen.

Der bereits angesprochene Aspekt der Prävention (Kapitel 1.2.1) könnte die Prävalenz der OPSCC insgesamt senken. Einerseits wäre eine Ausweitung der Aufklärung und Suchtberatung zur Reduktion des Nikotin- und Alkoholkonsums empfehlenswert. Auf der anderen Seite sollte auch eine flächendeckende Impfung aller Jugendlichen gegen HPV angestrebt werden. Hierdurch kann sowohl ein Schutz vor HPV-Infektionen im Allgemeinen, aber auch vor der Entstehung maligner Tumoren im Kopf-Hals-Bereich gewährt werden.

6. Zusammenfassung

Malignome des Oropharynx (OPSCC) werden anhand des HPV-Status in zwei unterschiedliche Tumorentitäten klassifiziert. Die Patienten mit HPV-negativen OPSCC haben mehrheitlich einen regelmäßigen Konsum an Noxen wie Alkohol und Nikotin. Die Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom und weitere zelluläre Interaktionen von HPV-Proteinen bewirken vielseitige Aktivierungen karzinogener Mechanismen. Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC haben insgesamt eine bessere Prognose als die Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Jedoch haben verschiedene Studien gezeigt, dass es auch unter den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC Fälle mit schlechter Prognose gibt. Diese zeichnen sich hauptsächlich durch das Auftreten von Fernmetastasen bzw. Lokalrezidiven (LR/FM) aus.

In der vorliegenden Arbeit wird die Subgruppe der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und LR/FM im Hinblick auf die patientenspezifischen Risikofaktoren und Tumorcharakteristika genauer beschreiben. Die mediane 5-Jahresüberlebensrate liegt bei den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC bei 74,5% gegenüber 39,2% bei den HPV-negativen. Bei den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren trat in 10,5% der Fälle im Verlauf ein LR/FM auf. Die Überlebensprognose dieser Patienten war deutlich schlechter als bei der Patientengruppe mit HPV-assoziierten Tumorpatienten ohne LR/FM.

Der experimentelle Hauptteil der Arbeit bestand in der immunhistochemischen Untersuchung der Expression von RIPK4 und p63 in OPSCC einer Untersuchungskohorte. Die Stärke der RIPK4-Expression korrelierte hierbei mit einem Anstieg des T- und N-Stadiums, als auch mit der Expression von p63. Eine starke p63-Expression war mit einem erhöhtem Alkoholkonsum assoziiert. Für die weiteren untersuchten Variablen zeigt sich kein signifikante Zusammenhänge mit der Expression von RIPK4 und p63. Für die Patienten mit einer starken RIPK4-Expression zeigte sich ein Überlebensvorteil, jedoch keine signifikanten Werte. Es zeigte sich kein Unterschied des Überlebens im Hinblick auf die p63-Expression.

Durch die zahlreichen Interaktionen und Regulationen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, sowohl durch RIPK4, p63 und auch durch HPV, kann auf einen Zusammenhang dieser drei Komponenten bei der Karzinogenese von OPSCC geschlossen werden.

7. Abstract

The malignancies of the oropharynx (OPSCC) are classified into two different entities of tumours based on HPV-status. The majority of patients with HPV-negative OPSCC have a frequent consumption of substances such as alcohol and nicotine. The integration of HPV-DNA into the host genome and other cellular interactions of HPV-proteins cause many activations of carcinogenic effects. The patients with HPV-associated OPSCC have overall a better prognosis than those with HPV-negative tumours. However, several studies showed that even among patients with HPV-associated OPSCC, there are cases having a poor prognosis. These are mainly caused by the occurrence of distant metastasis or local recurrences (LR/FM).

In the present study we describe in more detail the subgroup of patients with HPV-associated OPSCC with LR/FM particularly with regard to the patient specific attributes, risk factors and tumour characteristics. The median 5-year survival rate is 74,5% in the patients with HPV-associated OPSCC vs. 39,2% in the HPV-negative ones. Among patients with HPV-associated tumours, LR/FM occurred in 10,5% of cases during follow-up. The survival prognosis was considerably worse compared to the group with HPV-associated tumour patients without LR/FM.

The main experimental part of the work consisted of immunohistochemical staining (RIPK4 and p63) of an investigational cohort. RIPK4 expression was associated with an increase in T- and N-stage as well as with the p63 expression. Strong p63 expression was associated with high alcohol consumption. For the other investigated variables, there was no significant association with the staining intensity of RIPK4 or p63. For the patients with strong RIPK4 expression, there was a survival advantage, but without significant values. There was no difference in survival with respect to p63 expression.

Due to the numerous interactions and regulations of the Wnt/ β -Catenin signalling pathway both by RIPK4, p63 and also by HPV, a correlation of these three components in the carcinogenesis of OPSCC can be concluded.

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode
APC	Adenomatöse-Polyposis-Coli-Protein
Asympt.	Asymptotisch
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHAND-Syndrom	Syndrom mit krausem Haar (<i>curly hair</i>), Verwachsung von Ober- und Unterlid des Auges (<i>Ankyloblepharon</i>) und Fehlbildungen der Nägel (<i>nail dysplasia</i>)
CK1	Casein-Kinase 1
cm	Zentimeter
CT	Computertomogramm
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cTNM	TNM-Einteilung nach klinischer Untersuchung
ddH ₂ O	sterile ultra pure water
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
Dvl	Dishevelled
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EEC-Syndrom	Syndromale Erkrankung mit Ektrodaktylie, ektodermaler Dysplasie und <i>cleft lip/palate</i> (Lippen-Kiefer-Gaumenspalte)
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FFPE	Formalin-fixiertes in Paraffin-eingebettetes Gewebe
Fz	Frizzled-Membranrezeptor
ggfs.	gegebenenfalls
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure

HNO	Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde
HPCL-H ₂ O	Wasser für high performance liquid chromatographie
HPV-	HPV-negativer Status
HPV	Humanes Papillomavirus
HPV+	HPV-assoziiertes Status
HR	Hazard Ratio
HR-HPV	<i>high risk</i> HPV-Typen
ICD 10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problem</i>
IRF6	<i>interferon regulatory factor 6</i>
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LR	<i>low risk</i> HPV-Typen
LR/FM	Lokalrezidiv oder Fernmetastase
LR/FM-	kein Lokalrezidiv oder Fernmetastase
LR/FM+	Lokalrezidiv oder Fernmetastase vorhanden
LRP5/6	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
M+	Fernmetastasen vorhanden, nach TNM
M0	keine Fernmetastasen vorhanden, nach TNM
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
M-Stadium	Klassifikation der Fernmetastasen
n	Anzahl
N.	Nervus
N+	mind. 1 tumorbefallener regionärer Lymphknoten, nach TNM
N0	kein tumorbefallener regionärer Lymphknoten, nach TNM
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	non small cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
N-Stadium	Klassifikation der Lymphknotenmetastasen
N-Terminus	Amino-Terminus

OPSCC	<i>oropharynx squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom des Oropharynx
p63	Tumor Protein 63
PAP-Test	Abstrich der Cervix und Anfärbung nach Papanicolau
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie mit Computertomographie
pH	potentia hydrogenii
PKC-Signalweg	Proteinkinase C Signalweg
Prof.	Professor
pTNM	pathologisch gesichertes TNM-Stadium
py	<i>packyear</i>
RIPK4	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 4</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
S.d.	Standardfehler
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween
TCF/LEF	<i>T-cell factor / lymphoid enhancer factor family</i>
TNM-Stadium	Klassifizierung des Tumorstadiums
TRS	<i>target retrieval solution</i>
T-Stadium	Klassifikation der Tumorausdehnung
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
VE H ₂ O	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
vs.	Versus
x	-mal
β-TrCP	<i>β-transducin repeats-containing protein</i>
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a) Anatomie des Oropharynx in stark vereinfachter Darstellung in der Sagittalebene und b) Auflistung der anatomischen Regionen, deren maligne Neubildungen nach ICD 10 als OPSCC definiert sind.	2
Abbildung 2: Immunhistochemische Expression von p63 (Santa Cruz) in mehrschichtigem Plattenepithel des Oropharynx.....	9
Abbildung 3: Überblick zur Zusammensetzung des Patientenkollektivs und Auswahl der OPSCC-Untersuchungskohorte.....	18
Abbildung 4: Konsumierte Packyears der Raucher a) des OPSCC-Gesamtkollektivs (n=491) und b) der OPSCC-Untersuchungskohorte (n=37) differenziert nach dem HPV-Status der OPSCC. # Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.	25
Abbildung 5: Verteilung des Alkoholkonsums im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. * Der p-Wert wurde mittels Chi Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.	29
Abbildung 6: Verteilung des Raucherstatus im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton-Test (2-seitig) berechnet.	29
Abbildung 7: Verteilung des ECOG-Stadiums im OPSCC-Gesamtkollektiv aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. * Der p-Wert wurde mittels Chi Test Asympt., 2-seitig) berechnet.	30
Abbildung 8: Verteilung des Raucherstatus in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.....	34
Abbildung 9: Verteilung des Alkoholkonsums in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.....	34
Abbildung 10: Verteilung des ECOG-Stadiums in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. ^ Der p-Wert wurde mittels Fisher-Freeman-Halton Test berechnet.....	36

Abbildung 11: Überleben nach Kaplan-Meier aller Gießener Patienten mit OPSCC aufgeteilt nach dem HPV-Status im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.	37
Abbildung 12: Überleben nach Kaplan-Meier aller Gießener Patienten mit OPSCC aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Die p-Werte wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte.	38
Abbildung 13: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. Die beiden Gruppen umfassen jeweils 28 Fälle. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.	41
Abbildung 14: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. Die Gruppen umfassen jeweils 14 Fälle. § Die p-Werte wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte.	42
Abbildung 15: Intensitäten der Expression des RIPK4-Antikörpers aufgenommen mit dem 20-er Objektiv. a) ungefärbtes Tumorgewebe, b) schwache, c) mittlere und d) starke Expression im Tumorgewebe.	45
Abbildung 16: Korrelation der RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit a) dem T-Stadium und b) dem N-Stadium. a) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,376. b) Korrelationskoeffizient beträgt 0,345. § Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.	45
Abbildung 17: Korrelation des Alkoholkonsum in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit der RIPK4-Expression. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,133. § Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.	47
Abbildung 18: Konsumierte Packyears der Raucher (n=37) differenziert nach der RIPK4-Expression. # Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.	48
Abbildung 19: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach der dichotomisierten Expression von RIPK4 im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. § Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.	50
Abbildung 20: Intensitäten der Expression des p63-Antikörpers aufgenommen mit dem 20-er Objektiv. a) ungefärbtes Tumorgewebe, b) schwache, c) mittlere und d) starke Expression im Tumorgewebe.	51

Abbildung 21: Korrelation der p63-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit a) dem T-Stadium und b) dem N-Stadium. a) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,200. b) Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,003. [§] Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.	52
Abbildung 22: Korrelation des Alkoholkonsum in der OPSCC-Untersuchungskohorte mit der p63-Expression. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,292. [§] Der Korrelationskoeffizient und p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.	54
Abbildung 23: Konsumierte Packyears der Raucher (n=37) differenziert nach der p63-Expression. [#] Der p-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.	55
Abbildung 24: Überleben nach Kaplan-Meier der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dichotomisierten p63-Expression im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren. [§] Der p-Wert wurde mit dem Log-Rank-Test ermittelt.....	57
Abbildung 25: Korrelation der p63- mit der RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,278. [§] Der Korrelationskoeffizient und der p-Wert wurde mittels Spearman-Test bestimmt.	57
Abbildung 26: Verteilung der a) p63 und b) RIPK4-Expression in der OPSCC-Untersuchungskohorte aufgeteilt nach dem HPV-Status und LR/FM. Jede der Gruppen umfasst 14 Fälle. [*] Der p-Wert wurde mittels Chi-Test (Asympt., 2-seitig) berechnet.	58
Abbildung 27: Wnt/ β -Catenin-Signalweg a) inaktiv und b) aktiv.....	B
Abbildung 28: Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch RIPK4.....	C
Abbildung 29: Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch p63: a) physiologischer Zustand; b) Überexpression von p63; c) Herabregulierung von p63.	C

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 2: Chemikalien	15
Tabelle 3: Lösungen und Puffer.....	16
Tabelle 4: Primärantikörper	16
Tabelle 5: Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 6: Kits	16
Tabelle 7: Geräte.....	17
Tabelle 8: Software	17
Tabelle 9: Risikofaktoren des OPSCC-Gesamtkollektivs allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC.....	26
Tabelle 10: Tumorcharakteristika der Patienten allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC.....	27
Tabelle 11: Risikofaktoren der Patienten allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten eines LR/FM.	30
Tabelle 12: Tumorcharakteristika der Patienten allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten eines LR/FM.	31
Tabelle 13: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC, in der Rangfolge der Auswahlkriterien.	32
Tabelle 14: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie stratifiziert nach dem HPV-Status der OPSCC.	33
Tabelle 15: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status und dem Auftreten von LR/FM, in der Rangfolge der Auswahlkriterien.....	35
Tabelle 16: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte allgemein, sowie in Bezug zum HPV-Status der OPSCC und dem Auftreten von LR/FM.....	36
Tabelle 17: Univariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs.	39
Tabelle 18: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs.	40

Tabelle 19: Univariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte.	43
Tabelle 20: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte.	44
Tabelle 21: Korrelation der Tumorcharakteristika der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.	46
Tabelle 22: Korrelation der Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.	47
Tabelle 23: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression in der Rangfolge der Auswahlkriterien.	49
Tabelle 24: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur RIPK4-Expression.	50
Tabelle 25: Korrelation der Tumorcharakteristika der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.	53
Tabelle 26: Korrelation der Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.	54
Tabelle 27: Tumorcharakteristika und Risikofaktoren der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression in der Rangfolge der Auswahlkriterien.	55
Tabelle 28: Weitere Tumorcharakteristika und Risikofaktoren (ohne Einfluss auf die Patientenauswahl) der OPSCC-Untersuchungskohorte in Bezug zur p63-Expression.	56
Tabelle 29: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte inklusive der Variablen zur RIPK4- und p63-Expression.	59
Tabelle 30: Pathologische TNM-Stadien der OPSCC in der 8. Auflage	A
Tabelle 31: Pathologische Einteilung der Tumorstadien nach UICC bei den OPSCC in der 8. Auflage	A
Tabelle 32: Einteilung der ECOG-Stadien	D
Tabelle 33: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte mit Ergänzungen der Variable RIPK4.	D
Tabelle 34: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte mit Ergänzungen der Variable p63.	E

Tabelle 35: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Alkohol ohne den HPV-Status.	E
Tabelle 36: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variablen Rauchen und Alkohol ohne den HPV-Status.	F
Tabelle 37: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Rauchen.....	F
Tabelle 38: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Rauchen, ohne den HPV-Status.....	G

11. Literaturverzeichnis

Adams, Stephanie; Pankow, Sandra; Werner, Sabine; Munz, Barbara (2007): Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (3), S. 538–544. DOI: 10.1038/sj.jid.5700588;

Agrawal, Nishant; Frederick, Mitchell J.; Pickering, Curtis R.; Bettegowda, Chetan; Chang, Kyle; Li, Ryan J.; Fakhry, Carole; Xie, Tong-Xin; Zhang, Jiexin; Wang, Jing; Zhang, Nianxiang; El-Naggar, Adel K.; Jasser, Samar A.; Weinstein, John N.; Treviño, Lisa; Drummond, Jennifer A.; Muzny, Donna M.; Wu, Yuanqing; Wood, Laura D.; Hruban, Ralph H.; Westra, William H.; Koch, Wayne M.; Califano, Joseph A.; Gibbs, Richard A.; Sidransky, David; Vogelstein, Bert; Velculescu, Victor E.; Papadopoulos, Nickolas; Wheeler, David A.; Kinzler, Kenneth W.; Myers, Jeffrey N. (2011): Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6046), S. 1154–1157. DOI: 10.1126/science.1206923.

American Cancer Society: <https://www.cancer.org/healthy/stay-away-from-tobacco/benefits-of-quitting-smoking-over-time.html>, zuletzt geprüft am 06.01.2022.

Amin, Mahul B.; Greene, Frederick L.; Edge, Stephen B. (Hg.) (2017): AJCC cancer staging manual. Eighth edition. Chicago, IL, Schweiz: AJCC American Joint Committee on Cancer; Springer. Online verfügbar unter <http://www.springer.com/>.

Anayannis, Nicole V.; Schlecht, Nicolas F.; Ben-Dayana, Miriam; Smith, Richard V.; Belbin, Thomas J.; Ow, Thomas J.; Blakaj, Duk M.; Burk, Robert D.; Leonard, Sarah M.; Woodman, Ciaran B.; Parish, Joanna L.; Prystowsky, Michael B. (2018): Association of an intact E2 gene with higher HPV viral load, higher viral oncogene expression, and improved clinical outcome in HPV16 positive head and neck squamous cell carcinoma. In: *PloS one* 13 (2), e0191581. DOI: 10.1371/journal.pone.0191581.

Ang, K. Kian; Harris, Jonathan; Wheeler, Richard; Weber, Randal; Rosenthal, David I.; Nguyen-Tân, Phuc Felix; Westra, William H.; Chung, Christine H.; Jordan, Richard C.; Lu, Charles; Kim, Harold; Axelrod, Rita; Silverman, C. Craig; Redmond, Kevin P.; Gillison, Maura L. (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.

Azizmohammadi, Susan; Azizmohammadi, Sima; Safari, Aghdas; Kaghazian, Maria; Sadrkhanlo, Mina; Behnod, Vahid; Seifoleslami, Mehri (2017): High-Level Expression of

RIPK4 and EZH2 Contributes to Lymph Node Metastasis and Predicts Favorable Prognosis in Patients With Cervical Cancer. In: *Oncology research* 25 (4), S. 495–501. DOI: 10.3727/096504016X14749735594687.

Barbieri, Christopher E.; Tang, Luo Jia; Brown, Kimberly A.; Pietenpol, Jennifer A. (2006): Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. In: *Cancer research* 66 (15), S. 7589–7597. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2020.

Beachler, Daniel C.; D'Souza, Gypsyamber; Sugar, Elizabeth A.; Xiao, Wiehong; Gillison, Maura L. (2013): Natural history of anal vs oral HPV infection in HIV-infected men and women. In: *The Journal of infectious diseases* 208 (2), S. 330–339. DOI: 10.1093/infdis/jit170.

Beltz, A.; Gösswein, D.; Zimmer, S.; Stauber, R. H.; Hagemann, J.; Strieth, S.; Matthias, C.; Künzel, J. (2018): Staging von Oropharynxkarzinomen : Neue TNM-Klassifikation als Herausforderung für Kopf-Hals-Tumorzentren. In: *HNO* 66 (5), S. 375–382. DOI: 10.1007/s00106-018-0499-0.

Bodelon, Clara; Untereiner, Michael E.; Machiela, Mitchell J.; Vinokurova, Svetlana; Wentzensen, Nicolas (2016): Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. In: *Int. J. Cancer* 139 (9), S. 2001–2011. DOI: 10.1002/ijc.30243.

Bonilla-Delgado, José; Bulut, Gülay; Liu, Xuefeng; Cortés-Malagón, Enoc M.; Schlegel, Richard; Flores-Maldonado, Catalina; Contreras, Rubén G.; Chung, Sang-Hyuk; Lambert, Paul F.; Uren, Aykut; Gariglio, Patricio (2012): The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/ β -catenin pathway in skin epidermis in vivo. In: *Molecular cancer research : MCR* 10 (2), S. 250–258. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0287.

Brancaccio, Rosario N.; Robitaille, Alexis; Dutta, Sankhadeep; Cuenin, Cyrille; Santare, Daiga; Skenders, Girts; Leja, Marcis; Fischer, Nicole; Giuliano, Anna R.; Rollison, Dana E.; Grundhoff, Adam; Tommasino, Massimo; Gheit, Tarik (2018): Generation of a novel next-generation sequencing-based method for the isolation of new human papillomavirus types. In: *Virology* 520, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.virol.2018.04.017.

Busa, Tiffany; Jeraiby, Mohammed; Clémenson, Alix; Manouvrier, Sylvie; Granados, Viviana; Philip, Nicole; Touraine, Renaud (2017): Confirmation that RIPK4 mutations cause not only Bartsocas-Papas syndrome but also CHAND syndrome. In: *American journal of medical genetics. Part A* 173 (11), S. 3114–3117. DOI: 10.1002/ajmg.a.38475.

Buttmann-Schweiger, Nina; Deleré, Yvonne; Klug, Stefanie J.; Kraywinkel, Klaus (2017): Cancer incidence in Germany attributable to human papillomavirus in 2013. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 682. DOI: 10.1186/s12885-017-3678-6.

Castellsagué, Xavier; Alemany, Laia; Quer, Miquel; Halc, Gordana; Quirós, Beatriz; Tous, Sara; Clavero, Omar; Alòs, Lúcia; Biegner, Thorsten; Szafarowski, Tomasz; Alejo, Maria; Holzinger, Dana; Cadena, Enrique; Claros, Edith; Hall, Gillian; Laco, Jan; Poljak, Mario; Benevolo, Maria; Kasamatsu, Elena; Mehanna, Hisham; Ndiaye, Cathy; Guimerà, Núria; Lloveras, Belen; León, Xavier; Ruiz-Cabezas, Juan C.; Alvarado-Cabrero, Isabel; Kang, Chang-Suk; Oh, Jin-Kyoung; Garcia-Rojo, Marcial; Ilijazovic, Ermina; Ajayi, Oluseyi F.; Duarte, Flora; Nessa, Ashrafun; Tinoco, Leopoldo; Duran-Padilla, Marco A.; Pirog, Edyta C.; Viarheichyk, Halina; Morales, Hesler; Costes, Valérie; Félix, Ana; Gerra, Maria Julieta V.; Mena, Marisa; Ruacan, Arzu; Jain, Asha; Mehrotra, Ravi; Goodman, Marc T.; Lombardi, Luis Estuardo; Ferrera, Annabelle; Malami, Sani; Albanesi, Estela I.; Dabed, Pablo; Molina, Carla; López-Revilla, Rubén; Mandys, Václav; González, Manuel E.; Velasco, Julio; Bravo, Ignacio G.; Quint, Wim; Pawlita, Michael; Muñoz, Nubia; Sanjosé, Silvia de; Xavier Bosch, F. (2016): HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 108 (6), djv403. DOI: 10.1093/jnci/djv403.

Celli, Jacopo; Duijf, Pascal; Hamel, Ben C.J; Bamshad, Michael; Kramer, Bridget; Smits, Arie P.T; Newbury-Ecob, Ruth; Hennekam, Raoul C.M; van Buggenhout, Griet; van Haeringen, Arie; Woods, C.Geoffrey; van Essen, Anthonie J.; Waal, Rob de; Vriend, Gert; Haber, Daniel A.; Yang, Annie; McKeon, Frank; Brunner, Han G.; van Bokhoven, Hans (1999): Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. In: *Cell* 99 (2), S. 143–153. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81646-3.

Chen, Yonglong; Peng, Yougong; Fan, Shijie; Li, Yimin; Xiao, Zhi-Xiong; Li, Chenghua (2018): A double dealing tale of p63: an oncogene or a tumor suppressor. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75 (6), S. 965–973. DOI: 10.1007/s00018-017-2666-y.

Clevers, Hans; Nusse, Roel (2012): Wnt/ β -catenin signaling and disease. In: *Cell* 149 (6), S. 1192–1205. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

Coates, Philip J.; Nenuil, Rudolf; Holcakova, Jitka; Nekulova, Marta; Podhorec, Jan; Svoboda, Marek; Vojtesek, Borivoj (2018): p63 isoforms in triple-negative breast cancer: Δ Np63 associates with the basal phenotype whereas TAp63 associates with androgen receptor, lack of BRCA mutation, PTEN and improved survival. In: *Virchows Archiv : an*

international journal of pathology 472 (3), S. 351–359. DOI: 10.1007/s00428-018-2324-2.

Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2022/block-c00-c14.htm>, zuletzt geprüft am 04.01.2022.

Drewelus, Isabella; Göpfert, Constanze; Hippel, Cathrin; Dickmanns, Antje; Damianitsch, Katharina; Pieler, Tomas; Dobbstein, Matthias (2010): p63 antagonizes Wnt-induced transcription. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (3), S. 580–587. DOI: 10.4161/cc.9.3.10593.

Economopoulou, Panagiota; Kotsantis, Ioannis; Psyrris, Amanda (2021): De-Escalating Strategies in HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Viruses* 13 (9). DOI: 10.3390/v13091787.

Erdmann, Friederike; Spix, Claudia; Katalinic, Alexander; Christ, Monika; Folkerts, Juliane; Hansmann, Jutta; Kranzhöfer, Kristine; Kunz, Beatrice; Manegold, Katrin; Penzkofer, Andrea; Treml, Kornelia; Vollmer, Grit; Weg-Remers, Susanne; Barnes, Benjamin; Buttman-Schweiger, Nina; Dahm, Stefan; Fiebig, Julia; Franke, Manuela; Gurung-Schönfeld, Ina; Haberland, Jörg; Imhoff, Maren; Kraywinkel, Klaus; Starker, Anne; Berenberg-Gossler, Petra von; Wienecke, Antje (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.

Fakhry, C.; Westra, W. H.; Li, S.; Cmelak, A.; Ridge, J. A.; Pinto, H.; Forastiere, A.; Gillison, M. L. (2008): Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 100 (4), S. 261–269. DOI: 10.1093/jnci/djn011.

Fakhry, Carole; Westra, William H.; Wang, Steven J.; van Zante, Annemieke; Zhang, Yuehan; Rettig, Eleni; Yin, Linda X.; Ryan, William R.; Ha, Patrick K.; Wentz, Alicia; Koch, Wayne; Richmon, Jeremy D.; Eisele, David W.; D'Souza, Gypsyamber (2017): The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and non-oropharyngeal head and neck squamous cell cancer. In: *Cancer* 123 (9), S. 1566–1575. DOI: 10.1002/cncr.30353.

Fakhry, Carole; Zhang, Qiang; Nguyen-Tan, Phuc Felix; Rosenthal, David; El-Naggar, Adel; Garden, Adam S.; Soulieres, Denis; Trotti, Andy; Avizonis, Vilija; Ridge, John Andrew; Harris, Jonathan; Le, Quynh-Thu; Gillison, Maura (2014): Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. In:

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 32 (30), S. 3365–3373. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.1937.

Falcaro, Milena; Castañon, Alejandra; Ndlela, Busani; Checchi, Marta; Soldan, Kate; Lopez-Bernal, Jamie; Elliss-Brookes, Lucy; Sasieni, Peter (2021): The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. In: *The Lancet* 398 (10316), S. 2084–2092. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02178-4.

Faraji, Farhoud; Eisele, David W.; Fakhry, Carole (2017): Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: *Laryngoscope investigative otolaryngology* 2 (1), S. 10–18. DOI: 10.1002/lio2.37.

Ferretti, Elisabetta; Li, Bingsi; Zewdu, Rediet; Wells, Victoria; Hebert, Jean M.; Karner, Courtney; Anderson, Matthew J.; Williams, Trevor; Dixon, Jill; Dixon, Michael J.; Depew, Michael J.; Selleri, Licia (2011): A conserved Pbx-Wnt-p63-Irf6 regulatory module controls face morphogenesis by promoting epithelial apoptosis. In: *Developmental cell* 21 (4), S. 627–641. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.005.

Gao, Chenxi; Xiao, Gutian; Hu, Jing (2014): Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. In: *Cell & bioscience* 4 (1), S. 13. DOI: 10.1186/2045-3701-4-13.

Gillison, Maura L.; Akagi, Keiko; Xiao, Weihong; Jiang, Bo; Pickard, Robert K. L.; Li, Jingfeng; Swanson, Benjamin J.; Agrawal, Amit D.; Zucker, Mark; Stache-Crain, Birgit; Emde, Anne-Katrin; Geiger, Heather M.; Robine, Nicolas; Coombes, Kevin R.; Symer, David E. (2019): Human papillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers. In: *Genome research* 29 (1), S. 1–17. DOI: 10.1101/gr.241141.118.

Gomes, Ana P.; Ilter, Didem; Low, Vivien; Endress, Jennifer E.; Fernández-García, Juan; Rosenzweig, Adam; Schild, Tanya; Broekaert, Dorien; Ahmed, Adnan; Planque, Melanie; Elia, Ilaria; Han, Julie; Kinzig, Charles; Mullarky, Edouard; Mutvei, Anders P.; Asara, John; Cabo, Rafael de; Cantley, Lewis C.; Dephoure, Noah; Fendt, Sarah-Maria; Blenis, John (2020): Age-induced accumulation of methylmalonic acid promotes tumour progression. In: *Nature* 585 (7824), S. 283–287. DOI: 10.1038/s41586-020-2630-0.

Gong, Yongqian; Luo, Xinggu; Yang, Jing; Jiang, Qingshan; Liu, Zhifeng (2018): RIPK4 promoted the tumorigenicity of nasopharyngeal carcinoma cells. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 108, S. 1–6. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.147.

Harbison, R. Alex; Kubik, Mark; Konnick, Eric Q.; Zhang, Qing; Lee, Seok-Geun; Park, Heuijoon; Zhang, Jianan; Carlson, Christopher S.; Chen, Chu; Schwartz, Stephen M.; Rodriguez, Cristina P.; Duvvuri, Umamaheswar; Méndez, Eduardo (2018): The mutational landscape of recurrent versus nonrecurrent human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. In: *JCI insight* 3 (14). DOI: 10.1172/jci.insight.99327.

Hashida, Yumiko; Higuchi, Tomonori; Matsumoto, Shuichi; Iguchi, Mitsuko; Murakami, Ichiro; Hyodo, Masamitsu; Daibata, Masanori (2021): Prognostic significance of human papillomavirus 16 viral load level in patients with oropharyngeal cancer. In: *Cancer science*. DOI: 10.1111/cas.15105.

Heim, D.; Cornils, K.; Schulze, K.; Fehse, B.; Lohse, A. W.; Brümmendorf, T. H.; Wege, H. (2015): Retroviral insertional mutagenesis in telomerase-immortalized hepatocytes identifies RIPK4 as novel tumor suppressor in human hepatocarcinogenesis. In: *Oncogene* 34 (3), S. 364–372. DOI: 10.1038/onc.2013.551.

Hernandez, Brenda Y.; Wilkens, Lynne R.; Zhu, Xuemei; Thompson, Pamela; McDuffie, Katharine; Shvetsov, Yuri B.; Kamemoto, Lori E.; Killeen, Jeffrey; Ning, Lily; Goodman, Marc T. (2008): Transmission of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples. In: *Emerg. Infect. Dis.* 14 (6), S. 888–894. DOI: 10.3201/eid1406.0706162.

Herold, Gerd (2021): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2021 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold.

Herrero, Rolando; Castellsagué, Xavier; Pawlita, Michael; Lissowska, Jolanta; Kee, Frank; Balaram, Prabda; Rajkumar, Thangarajan; Sridhar, Hema; Rose, Barbara; Pintos, Javier; Fernández, Leticia; Idris, Ali; Sánchez, María José; Nieto, Adoración; Talamini, Renato; Tavani, Alessandra; Bosch, F. Xavier; Reidel, Ulrich; Snijders, Peter J. F.; Meijer, Chris J. L. M.; Viscidi, Raphael; Muñoz, Nubia; Franceschi, Silvia (2003): Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95 (23), S. 1772–1783. DOI: 10.1093/jnci/djg107.

Hibi, K.; Trink, B.; Patturajan, M.; Westra, W. H.; Caballero, O. L.; Hill, D. E.; Ratovitski, E. A.; Jen, J.; Sidransky, D. (2000): AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10), S. 5462–5467. DOI: 10.1073/pnas.97.10.5462.

Howard, Sara; Deroo, Tom; Fujita, Yasuyuki; Itasaki, Nobue (2011): A positive role of cadherin in Wnt/ β -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. In: *PLoS one* 6 (8), e23899. DOI: 10.1371/journal.pone.0023899.

Hu, Hai; Xia, Shu-Hua; Li, Ai-Dong; Xu, Xin; Cai, Yan; Han, Ya-Ling; Wei, Fang; Chen, Bao-Sheng; Huang, Xiao-Ping; Han, Yu-Sheng; Zhang, Jian-Wei; Zhang, Xun; Wu, Min; Wang, Ming-Rong (2002): Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. In: *International journal of cancer* 102 (6), S. 580–583. DOI: 10.1002/ijc.10739.

Hu, Zhongliang; Müller, Susan; Qian, Guoqing; Xu, Jing; Kim, Sungjin; Chen, Zhengjia; Jiang, Ning; Wang, Dongsheng; Zhang, Hongzheng; Saba, Nabil F.; Shin, Dong M.; Chen, Zhuo Georgia (2015): Human papillomavirus 16 oncoprotein regulates the translocation of β -catenin via the activation of epidermal growth factor receptor. In: *Cancer* 121 (2), S. 214–225. DOI: 10.1002/cncr.29039.

Huang, Christine S.; Oberbeck, Nina; Hsiao, Yi-Chun; Liu, Peter; Johnson, Adam R.; Dixit, Vishva M.; Hymowitz, Sarah G. (2018): Crystal Structure of Ripk4 Reveals Dimerization-Dependent Kinase Activity. In: *Structure (London, England : 1993)* 26 (5), 767–777.e5. DOI: 10.1016/j.str.2018.04.002.

Huang, XiaoDong; McGann, James C.; Liu, Bob Y.; Hannoush, Rami N.; Lill, Jennie R.; Pham, Victoria; Newton, Kim; Kakunda, Michael; Liu, Jinfeng; Yu, Christine; Hymowitz, Sarah G.; Hongo, Jo-Anne; Wynshaw-Boris, Anthony; Polakis, Paul; Harland, Richard M.; Dixit, Vishva M. (2013): Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6126), S. 1441–1445. DOI: 10.1126/science.1232253.

Jung, Andreas; Schrauder, Michael; Oswald, Ursula; Knoll, Claudia; Sellberg, Petter; Palmqvist, Richard; Niedobitek, Gerald; Brabletz, Thomas; Kirchner, Thomas (2001): The Invasion Front of Human Colorectal Adenocarcinomas Shows Co-Localization of Nuclear β -Catenin, Cyclin D1, and p16INK4A and Is a Region of Low Proliferation. In: *The American Journal of Pathology* 159 (5), S. 1613–1617. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63007-6.

Kaelin, W. G. (1999): The p53 gene family. In: *Oncogene* 18 (53), S. 7701–7705. DOI: 10.1038/sj.onc.1202955.

Kalay, Ersan; Sezgin, Orhan; Chellappa, Vasant; Mutlu, Mehmet; Morsy, Heba; Kayserili, Hulya; Kreiger, Elmar; Cansu, Aysegul; Toraman, Bayram; Abdalla, Ebtessam Mohammed; Aslan, Yakup; Pillai, Shiv; Akarsu, Nurten A. (2012): Mutations in RIPK4 cause

the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. In: *American journal of human genetics* 90 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.014.

Kano, Satoshi; Homma, Akihiro; Hayashi, Ryuichi; Kawabata, Kazuyoshi; Yoshino, Kunitoshi; Iwae, Shigemichi; Hasegawa, Yasuhisa; Nibu, Kenichi; Kato, Takakuni; Shiga, Kiyoto; Matsuura, Kazuto; Monden, Nobuya; Fujii, Masato (2013): Matched-pair analysis in patients with advanced oropharyngeal cancer: surgery versus concurrent chemoradiotherapy. In: *Oncology* 84 (5), S. 290–298. DOI: 10.1159/000346908.

Kaufmann, Olaf; Fietze, Ellen; Mengers, Jörg; Dietel, Manfred (2001): Value of p63 and Cytokeratin 5/6 as Immunohistochemical Markers for the Differential Diagnosis of Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas. In: *Am J Clin Pathol* 116 (6), S. 823–830. DOI: 10.1309/21TW-2NDG-JRK4-PFJX.

Kierner, A. K.; Takeuchi, K.; Quinlan, M. P. (2001): Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. In: *Oncogene* 20 (46), S. 6679–6688. DOI: 10.1038/sj.onc.1204872.

Kim, Wantae; Kim, Minseong; Jho, Eek-hoon (2013): Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. In: *The Biochemical journal* 450 (1), S. 9–21. DOI: 10.1042/BJ20121284.

Kjaer, Susanne K.; Dehlendorff, Christian; Belmonte, Federica; Baandrup, Louise (2021): Real-World Effectiveness of Human Papillomavirus Vaccination Against Cervical Cancer. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 113 (10), S. 1329–1335. DOI: 10.1093/jnci/djab080.

Klozar, Jan; Koslabova, Eva; Kratochvil, Vit; Salakova, Martina; Tachezy, Ruth (2013): Nodal status is not a prognostic factor in patients with HPV-positive oral/oropharyngeal tumors. In: *Journal of surgical oncology* 107 (6), S. 625–633. DOI: 10.1002/jso.23292.

Koga, Fumitaka; Kawakami, Satoru; Fujii, Yasuhisa; Saito, Kazutaka; Ohtsuka, Yukihiro; Iwai, Aki; Ando, Noboru; Takizawa, Touichiro; Kageyama, Yukio; Kihara, Kazunori (2003): Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. In: *Clin Cancer Res* 9 (15), S. 5501–5507.

Koneva, Lada A.; Zhang, Yanxiao; Virani, Shama; Hall, Pelle B.; McHugh, Jonathan B.; Chepeha, Douglas B.; Wolf, Gregory T.; Carey, Thomas E.; Rozek, Laura S.; Sartor, Maureen A. (2018): HPV Integration in HNSCC Correlates with Survival Outcomes, Immune Response Signatures, and Candidate Drivers. In: *Molecular cancer research : MCR* 16 (1), S. 90–102. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0153.

Krausova, Michaela; Korinek, Vladimir (2014): Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. In: *Cellular signalling* 26 (3), S. 570–579. DOI: 10.1016/j.cell-sig.2013.11.032.

Kreimer, Aimée R.; Shiels, Meredith S.; Fakhry, Carole; Johansson, Mattias; Pawlita, Michael; Brennan, Paul; Hildesheim, Allan; Waterboer, Tim (2018): Screening for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer: Considerations for feasibility and strategies for research. In: *Cancer* 124 (9), S. 1859–1866. DOI: 10.1002/cncr.31256.

Kwa, Mei Qi; Huynh, Jennifer; Aw, Jiamin; Zhang, Lianyi; Nguyen, Thao; Reynolds, Eric C.; Sweet, Matthew J.; Hamilton, John A.; Scholz, Glen M. (2014): Receptor-interacting protein kinase 4 and interferon regulatory factor 6 function as a signaling axis to regulate keratinocyte differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (45), S. 31077–31087. DOI: 10.1074/jbc.M114.589382.

Lenarz, Thomas; Boenninghaus, Hans-Georg (2012): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 14., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=968415>.

Lin, Brian M.; Wang, Hao; D'Souza, Gypsyamber; Zhang, Zhe; Fakhry, Carole; Joseph, Andrew W.; Drake, Virginia E.; Sanguineti, Giuseppe; Westra, William H.; Pai, Sara I. (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.

Liu, De-Qing; Li, Fang-Fang; Zhang, Jiang-Bo; Zhou, Tie-Jun; Xue, Wen-Qiong; Zheng, Xiao-Hui; Chen, Yuan-Bin; Liao, Xiao-Yu; Zhang, Lan; Zhang, Shao-Dan; Hu, Ye-Zhu; Jia, Wei-Hua (2015): Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients. In: *Scientific reports* 5, S. 11955. DOI: 10.1038/srep11955.

Liu, Shaoqiu; He, Lewei; Sheng, Chenchen; Su, Rongjia; Wu, Xiaomei; Sun, Yunyan; Xi, Xiaowei (2021): Overexpression of RIPK4 Predicts Poor Prognosis and Promotes Metastasis in Ovarian Cancer. In: *BioMed research international* 2021, S. 6622439. DOI: 10.1155/2021/6622439.

Lo Muzio, Lorenzo; Santarelli, Andrea; Caltabiano, Rosario; Rubini, Corrado; Pieramici, Tiziana; Trevisiol, Lorenzo; Carinci, Francesco; Leonardi, Rosalia; Lillo, Alfredo de; Lanzafame, Salvatore; Bufo, Pantaleo; Piattelli, Adriano (2005): p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Human pathology* 36 (2), S. 187–194. DOI: 10.1016/j.humpath.2004.12.003.

Mangiulli, Marina; Valletti, Alessio; Caratozzolo, Mariano Francesco; Tullo, Apollonia; Sbisà, Elisabetta; Pesole, Graziano; D'Erchia, Anna Maria (2009): Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. In: *Nucleic acids research* 37 (18), S. 6092–6104. DOI: 10.1093/nar/gkp674.

Massion, Pierre P.; Taflan, Peter M.; Jamshedur Rahman, S. M.; Yildiz, Pinar; Shyr, Yu; Edgerton, Mary E.; Westfall, Matthew D.; Roberts, John R.; Pietenpol, Jennifer A.; Carbone, David P.; Gonzalez, Adriana L. (2003): Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. In: *Cancer research* 63 (21), S. 7113–7121.

Matos, Irina; Dufloth, Rozany; Alvarenga, Marcelo; Zeferino, Luiz Carlos; Schmitt, Fernando (2005): p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 447 (4), S. 688–694. DOI: 10.1007/s00428-005-0010-7.

Melar-New, Marta; Laimins, Laimonis A. (2010): Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. In: *Journal of virology* 84 (10), S. 5212–5221. DOI: 10.1128/JVI.00078-10.

Meylan, Etienne; Martinon, Fabio; Thome, Margot; Gschwendt, Michael; Tschopp, Jürg (2002): RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. In: *EMBO reports* 3 (12), S. 1201–1208. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf236.

Mitchell, Karen; O'Sullivan, James; Missero, Caterina; Blair, Ed; Richardson, Rose; Anderson, Beverley; Antonini, Dario; Murray, Jeffrey C.; Shanske, Alan L.; Schutte, Brian C.; Romano, Rose-Anne; Sinha, Satrajit; Bhaskar, Sanjeev S.; Black, Graeme C. M.; Dixon, Jill; Dixon, Michael J. (2012): Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. In: *American journal of human genetics* 90 (1), S. 69–75. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.013.

Moergel, Maximilian; Abt, Eva; Stockinger, Marcus; Kunkel, Martin (2010): Overexpression of p63 is associated with radiation resistance and prognosis in oral squamous cell carcinoma. In: *Oral Oncology* 46 (9), S. 667–671. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.06.012.

Moll, Ute M.; Erster, Susan; Zaika, Alex (2001): p53, p63 and p73 – solos, alliances and feuds among family members. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1552 (2), S. 47–59. DOI: 10.1016/S0304-419X(01)00036-1.

Moretti, Francesca; Marinari, Barbara; Lo Iacono, Nadia; Botti, Elisabetta; Giunta, Alessandro; Spallone, Giulia; Garaffo, Giulia; Vernersson-Lindahl, Emma; Merlo, Giorgio; Mills, Alea A.; Ballarò, Costanza; Alemà, Stefano; Chimenti, Sergio; Guerrini, Luisa; Costanzo, Antonio (2010): A regulatory feedback loop involving p63 and IRF6 links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (5), S. 1570–1577. DOI: 10.1172/JCI40267.

Morgan, Iain M.; DiNardo, Laurence J.; Windle, Brad (2017): Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift? In: *Viruses* 9 (8). DOI: 10.3390/v9080208.

Morris, Luc G. T.; Chandramohan, Raghu; West, Lyndsay; Zehir, Ahmet; Chakravarty, Debyani; Pfister, David G.; Wong, Richard J.; Lee, Nancy Y.; Sherman, Eric J.; Baxi, Shrujal S.; Ganly, Ian; Singh, Bhuvanesh; Shah, Jatin P.; Shaha, Ashok R.; Boyle, Jay O.; Patel, Snehal G.; Roman, Benjamin R.; Barker, Christopher A.; McBride, Sean M.; Chan, Timothy A.; Dogan, Snjezana; Hyman, David M.; Berger, Michael F.; Solit, David B.; Riaz, Nadeem; Ho, Alan L. (2017): The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform. In: *JAMA oncology* 3 (2), S. 244–255. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.1790.

Münger, K.; Basile, J. R.; Duensing, S.; Eichten, A.; Gonzalez, S. L.; Grace, M.; Zacny, V. L. (2001): Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. In: *Oncogene* 20 (54), S. 7888–7898. DOI: 10.1038/sj.onc.1204860.

Muñoz-Bello, J. Omar; Olmedo-Nieva, Leslie; Castro-Muñoz, Leonardo Josué; Manzo-Merino, Joaquín; Contreras-Paredes, Adriana; González-Espinosa, Claudia; López-Saavedra, Alejandro; Lizano, Marcela (2018): HPV-18 E6 Oncoprotein and Its Spliced Isoform E6*I Regulate the Wnt/ β -Catenin Cell Signaling Pathway through the TCF-4 Transcriptional Factor. In: *International journal of molecular sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19103153.

Nekulova, Marta; Holcakova, Jitka; Coates, Philip; Vojtesek, Borivoj (2011): The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. In: *Cellular & molecular biology letters* 16 (2), S. 296–327. DOI: 10.2478/s11658-011-0009-9.

Nekulova, Marta; Holcakova, Jitka; Nenutil, Rudolf; Stratmann, Rembert; Bouchalova, Pavla; Müller, Petr; Mouková, Lucie; Coates, Philip J.; Vojtesek, Borivoj (2013): Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 463 (3), S. 415–425. DOI: 10.1007/s00428-013-1459-4.

Ng, Marie; Freeman, Michael K.; Fleming, Thomas D.; Robinson, Margaret; Dwyer-Lindgren, Laura; Thomson, Blake; Wollum, Alexandra; Sanman, Ella; Wulf, Sarah; Lopez, Alan D.; Murray, Christopher J. L.; Gakidou, Emmanuela (2014): Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. In: *JAMA* 311 (2), S. 183–192. DOI: 10.1001/jama.2013.284692.

Nulton, Tara J.; Kim, Nak-Kyeong; DiNardo, Laurence J.; Morgan, Iain M.; Windle, Brad (2018): Patients with integrated HPV16 in head and neck cancer show poor survival. In: *Oral Oncology* 80, S. 52–55. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.03.015.

Nylander, K.; Coates, P. J.; Hall, P. A. (2000): Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. In: *International journal of cancer* 87 (3), S. 368–372.

Oken, M. M.; Creech, R. H.; Tormey, D. C.; Horton, J.; Davis, T. E.; McFadden, E. T.; Carbone, P. P. (1982): Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. In: *American journal of clinical oncology* 5 (6), S. 649–655.

Oliveira, Lucinei Roberto; Ribeiro-Silva, Alfredo; Zucoloto, Sérgio (2007): Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. In: *Acta histochemica* 109 (5), S. 388–396. DOI: 10.1016/j.acthis.2007.03.006.

Olthof, Nadine C.; Huebbers, Christian U.; Kolligs, Jutta; Henfling, Mieke; Ramaekers, Frans C. S.; Cornet, Iris; van Lent-Albrechts, Josefa A.; Stegmann, Alexander P. A.; Silling, Steffi; Wieland, Ulrike; Carey, Thomas E.; Walline, Heather M.; Gollin, Susanne M.; Hoffmann, Thomas K.; Winter, Johan de; Kremer, Bernd; Klussmann, Jens P.; Speel, Ernst-Jan M. (2015): Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. In: *International journal of cancer* 136 (5), E207–18. DOI: 10.1002/ijc.29112.

O'Sullivan, Brian; Huang, Shao Hui; Siu, Lillian L.; Waldron, John; Zhao, Helen; Perez-Ordóñez, Bayardo; Weinreb, Ilan; Kim, John; Ringash, Jolie; Bayley, Andrew; Dawson, Laura A.; Hope, Andrew; Cho, John; Irish, Jonathan; Gilbert, Ralph; Gullane, Patrick; Hui, Angela; Liu, Fei-Fei; Chen, Eric; Xu, Wei (2013): Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (5), S. 543–550. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.0164.

O'Sullivan, Brian; Huang, Shao Hui; Su, Jie; Garden, Adam S.; Sturgis, Erich M.; Dahlstrom, Kristina; Lee, Nancy; Riaz, Nadeem; Pei, Xin; Koyfman, Shlomo A.; Adelstein,

David; Burkey, Brian B.; Friberg, Jeppe; Kristensen, Claus A.; Gothelf, Anita B.; Hoebbers, Frank; Kremer, Bernd; Speel, Ernst-Jan; Bowles, Daniel W.; Raben, David; Karam, Sana D.; Yu, Eugene; Xu, Wei (2016): Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. In: *The Lancet Oncology* 17 (4), S. 440–451. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00560-4.

Parfenov, Michael; Peadarallu, Chandra Sekhar; Gehlenborg, Nils; Freeman, Samuel S.; Danilova, Ludmila; Bristow, Christopher A.; Lee, Semin; Hadjipanayis, Angela G.; Ivanova, Elena V.; Wilkerson, Matthew D.; Protopopov, Alexei; Yang, Lixing; Seth, Sahil; Song, Xingzhi; Tang, Jiabin; Ren, Xiaojia; Zhang, Jianhua; Pantazi, Angeliki; Santoso, Netty; Xu, Andrew W.; Mahadeshwar, Harshad; Wheeler, David A.; Haddad, Robert I.; Jung, Joonil; Ojesina, Akinyemi I.; Issaeva, Natalia; Yarbrough, Wendell G.; Hayes, D. Neil; Grandis, Jennifer R.; El-Naggar, Adel K.; Meyerson, Matthew; Park, Peter J.; Chin, Lynda; Seidman, J. G.; Hammerman, Peter S.; Kucherlapati, Raju (2014): Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (43), S. 15544–15549. DOI: 10.1073/pnas.1416074111.

Patturajan, Meera; Nomoto, Shuji; Sommer, Matthias; Fomenkov, Alexey; Hibi, Kenji; Zangen, Rachel; Poliak, Nina; Califano, Joseph; Trink, Barry; Ratovitski, Edward; Sidransky, David (2002): $\Delta Np63$ induces β -catenin nuclear accumulation and signaling. In: *Cancer Cell* 1 (4), S. 369–379. DOI: 10.1016/S1535-6108(02)00057-0.

Perdomo, Sandra; Anantharaman, Devasena; Foll, Matthieu; Abedi-Ardekani, Behnoush; Durand, Geoffroy; Reis Rosa, Luciana Albina; Holmila, Reetta; Le Calvez-Kelm, Florence; Tajara, Eloiza H.; Wünsch-Filho, Victor; Levi, José Eduardo; Vilensky, Marta; Polesel, Jerry; Holcatova, Ivana; Simonato, Lorenzo; Canova, Cristina; Lagiou, Pagona; McKay, James D.; Brennan, Paul (2018): Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions. In: *PloS one* 13 (1), e0191701. DOI: 10.1371/journal.pone.0191701.

Pickard, Robert K. L.; Xiao, Weihong; Broutian, Tatevik R.; He, Xin; Gillison, Maura L. (2012): The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. In: *Sexually transmitted diseases* 39 (7), S. 559–566. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e31824f1c65.

Plummer, Martyn; Martel, Catherine de; Vignat, Jerome; Ferlay, Jacques; Bray, Freddie; Franceschi, Silvia (2016): Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a

synthetic analysis. In: *The Lancet Global Health* 4 (9), e609-e616. DOI: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.

Prigge, Elena-Sophie; Arbyn, Marc; Knebel Doeberitz, Magnus von; Reuschenbach, Miriam (2017): Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. In: *International journal of cancer* 140 (5), S. 1186–1198. DOI: 10.1002/ijc.30516.

Qi, Zi-Hao; Xu, Hua-Xiang; Zhang, Shi-Rong; Xu, Jin-Zhi; Li, Shuo; Gao, He-Li; Jin, Wei; Wang, Wen-Quan; Wu, Chun-Tao; Ni, Quan-Xing; Yu, Xian-Jun; Liu, Liang (2018): RIPK4/PEBP1 axis promotes pancreatic cancer cell migration and invasion by activating RAF1/MEK/ERK signaling. In: *International journal of oncology* 52 (4), S. 1105–1116. DOI: 10.3892/ijo.2018.4269.

Quabius, Elgar Susanne; Haag, Jochen; Kühnel, André; Henry, Hannes; Hoffmann, Anna Sophie; Görögh, Tibor; Hedderich, Jürgen; Evert, Matthias; Beule, Achim G.; Maune, Steffen; Knecht, Rainald; Óvári, Attila; Durisin, Martin; Hoppe, Florian; Tribius, Silke; Röcken, Christoph; Ambrosch, Petra; Hoffmann, Markus (2015): Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany. In: *International journal of oncology* 46 (1), S. 414–422. DOI: 10.3892/ijo.2014.2697.

Rajasekaran, Karthik; Carey, Ryan M.; Lin, Xiang; Seckar, Tyler D.; Wei, Zhi; Chorath, Kevin; Newman, Jason G.; O'Malley, Bert W.; Weinstein, Gregory S.; Feldman, Michael D.; Robertson, Erle (2021): The microbiome of HPV-positive tonsil squamous cell carcinoma and neck metastasis. In: *Oral Oncology* 117, S. 105305. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105305.

Rampias, Theodore; Boutati, Eleni; Pectasides, Eirini; Sasaki, Clarence; Kountourakis, Panteleimon; Weinberger, Paul; Psyrris, Amanda (2010): Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. In: *Molecular cancer research : MCR* 8 (3), S. 433–443. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0345.

Reder, Henrike; Wagner, Steffen; Gamerding, Ulrike; Sandmann, Sarah; Wuerdemann, Nora; Braeuninger, Andreas; Dugas, Martin; Gattenloehner, Stefan; Klussmann, Jens Peter; Wittekindt, Claus (2019): Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure. In: *Oral Oncology* 93, S. 59–65. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.04.013.

Reder, Henrike; Wagner, Steffen; Wuerdemann, Nora; Langer, Christine; Sandmann, Sarah; Braeuninger, Andreas; Dugas, Martin; Gattenloehner, Stefan; Wittekindt, Claus; Klussmann, Jens Peter (2021): Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status. In: *Cancer medicine* 10 (4), S. 1347–1356. DOI: 10.1002/cam4.3741.

Reis-Filho, Jorge S.; Torio, Beatriz; Albergaria, André; Schmitt, Fernando C. (2002): p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. In: *Journal of cutaneous pathology* 29 (9), S. 517–523. DOI: 10.1034/j.1600-0560.2002.290902.x.

Reiß, Michael (2021): Facharztwissen HNO-Heilkunde. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Reshmi, G.; Pillai, M. Radhakrishna (2008): Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. In: *FEBS letters* 582 (30), S. 4113–4116. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.11.011.

Reuschenbach, M.; Wagner, S.; Würdemann, N.; Sharma, S. J.; Prigge, E-S; Sauer, M.; Wittig, A.; Wittekindt, C.; Knebel Doeberitz, M. von; Klussmann, J. P. (2016): Humane Papillomviren bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion : Relevanz für Prognose, Therapie und Prophylaxe. In: *HNO* 64 (7), S. 450–459. DOI: 10.1007/s00106-016-0123-0.

Reuschenbach, Miriam; Huebbers, Christian U.; Prigge, Elena-Sophie; Bermejo, Justo Lorenzo; Kalteis, Martin S.; Preuss, Simon F.; Seuthe, Inga M. C.; Kolligs, Jutta; Speel, Ernst-Jan M.; Olthof, Nadine; Kremer, Bernd; Wagner, Steffen; Klussmann, Jens P.; Vinokurova, Svetlana; Knebel Doeberitz, Magnus von (2015): Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. In: *Cancer* 121 (12), S. 1966–1976. DOI: 10.1002/cncr.29315.

Rietbergen, M. M.; Brakenhoff, R. H.; Bloemena, E.; Witte, B. I.; Snijders, P. J. F.; Heideman, D. A. M.; Boon, D.; Koljenovic, S.; Baatenburg-de Jong, R. J.; Leemans, C. R. (2013): Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (11), S. 2740–2745. DOI: 10.1093/annonc/mdt319.

Rios Velazquez, Emmanuel; Hoebbers, Frank; Aerts, Hugo J. W. L.; Rietbergen, Michelle M.; Brakenhoff, Ruud H.; Leemans, René C.; Speel, Ernst-Jan; Straetmans, Jos; Kremer, Bernd; Lambin, Philippe (2014): Externally validated HPV-based prognostic nomogram for oropharyngeal carcinoma patients yields more accurate predictions than TNM

staging. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 113 (3), S. 324–330. DOI: 10.1016/j.radonc.2014.09.005.

Rodríguez-Sastre, María Alexandra; González-Maya, Leticia; Delgado, Ricardo; Lizano, Marcela; Tsubaki, Gerardo; Mohar, Alejandro; García-Carrancá, Alejandro (2005): Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. In: *Gynecologic oncology* 97 (2), S. 330–336. DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.12.062.

Rountree, Ryan B.; Willis, Cynthia R.; Dinh, Huyen; Blumberg, Hal; Bailey, Keith; Dean, Charles; Peschon, Jacques J.; Holland, Pamela M. (2010): RIP4 regulates epidermal differentiation and cutaneous inflammation. In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (1), S. 102–112. DOI: 10.1038/jid.2009.223.

Saghraivanian, Nasrollah; Anvari, Kazem; Ghazi, Narges; Memar, Bahram; Shahsavari, Maryam; Aghaee, Monavar Afzal (2017): Expression of p63 and CD44 in oral squamous cell carcinoma and correlation with clinicopathological parameters. In: *Archives of oral biology* 82, S. 160–165. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.011.

Salam, Nasir; Rane, Sanket; Das, Rituparna; Faulkner, Matthew; Gund, Rupali; Kandpal, Usha; Lewis, Virginia; Mattoo, Hamid; Prabhu, Savit; Ranganathan, Vidya; Durdik, Jeanine; George, Anna; Rath, Satyajit; Bal, Vineeta (2013): T cell ageing: effects of age on development, survival & function. In: *The Indian journal of medical research* 138 (5), S. 595–608.

Sano, Daisuke; Oridate, Nobuhiko (2016): The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. In: *International journal of clinical oncology* 21 (5), S. 819–826. DOI: 10.1007/s10147-016-1005-x.

Schaller, Katrin; Kahnert, Sarah; Graen, Laura; Mons, Ute; Ouédraogo, Nobila (2020): *Tabakatlas Deutschland 2020*. 1. Auflage. Lengerich: Pabst Science Publishers.

Schuler, P. J.; Witzleben, A. von; Doescher, J.; Wollenberg, B.; Dietz, A.; Hoffmann, T. K. (2018): Immun-, radio- und chemotherapeutische Studien bei Kopf-Hals-Tumoren : Highlights der ASCO-Jahrestagung 2017. In: *HNO* 66 (3), S. 212–218. DOI: 10.1007/s00106-018-0482-9.

Sethi, Isha; Romano, Rose-Anne; Gluck, Christian; Smalley, Kirsten; Vojtesek, Borivoj; Buck, Michael J.; Sinha, Satrajit (2015): A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. In: *BMC genomics* 16, S. 584. DOI: 10.1186/s12864-015-1793-9.

Smeets, Serge J.; Hesselink, Albertus T.; Speel, Ernst-Jan M.; Haesevoets, Annick; Snijders, Peter J. F.; Pawlita, Michael; Meijer, Chris J. L. M.; Braakhuis, Boudewijn J. M.; Leemans, C. René; Brakenhoff, Ruud H. (2007): A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. In: *International journal of cancer* 121 (11), S. 2465–2472. DOI: 10.1002/ijc.22980.

Smith, Elaine M.; Parker, Michael A.; Rubenstein, Linda M.; Haugen, Thomas H.; Hamsikova, Eva; Turek, Lubomir P. (2010): Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. In: *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 2010, S. 326369. DOI: 10.1155/2010/326369.

Snizek, Joseph C.; Matheny, Keith E.; Westfall, Mathew D.; Pietenpol, Jennifer A. (2004): Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. In: *The Laryngoscope* 114 (12), S. 2063–2072. DOI: 10.1097/01.mlg.0000149437.35855.4b.

Sood, Amit J.; McIlwain, Wesley; O'Connell, Brendan; Nguyen, Shaun; Houlton, Jeffrey J.; Day, Terry (2014): The association between T-stage and clinical nodal metastasis in HPV-positive oropharyngeal cancer. In: *American journal of otolaryngology* 35 (4), S. 463–468. DOI: 10.1016/j.amjoto.2013.12.008.

Srivastava, Kirtiman; Pickard, Adam; McDade, Simon; McCance, Dennis J. (2017): p63 drives invasion in keratinocytes expressing HPV16 E6/E7 genes through regulation of Src-FAK signalling. In: *Oncotarget* 8 (10), S. 16202–16219. DOI: 10.18632/oncotarget.3892.

Ständige Impfkommission (STIKO) (2021): Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2021. DOI: 10.25646/8824.

Steinau, Martin; Hariri, Susan; Gillison, Maura L.; Broutian, Tatevic R.; Dunne, Eileen F.; Tong, Zhen-yue; Markowitz, Lauri E.; Unger, Elizabeth R. (2014): Prevalence of cervical and oral human papillomavirus infections among US women. In: *The Journal of infectious diseases* 209 (11), S. 1739–1743. DOI: 10.1093/infdis/jit799.

Stransky, Nicolas; Egloff, Ann Marie; Tward, Aaron D.; Kostic, Aleksandar D.; Cibulskis, Kristian; Sivachenko, Andrey; Kryukov, Gregory V.; Lawrence, Michael S.; Sougnez, Carrie; McKenna, Aaron; Shefler, Erica; Ramos, Alex H.; Stojanov, Petar; Carter, Scott L.; Voet, Douglas; Cortés, Maria L.; Auclair, Daniel; Berger, Michael F.; Saksena, Gordon; Guiducci, Candace; Onofrio, Robert C.; Parkin, Melissa; Romkes, Marjorie; Weissfeld, Joel L.; Seethala, Raja R.; Wang, Lin; Rangel-Escareño, Claudia; Fernandez-Lopez, Juan Carlos; Hidalgo-Miranda, Alfredo; Melendez-Zajgla, Jorge; Winckler,

Wendy; Ardlie, Kristin; Gabriel, Stacey B.; Meyerson, Matthew; Lander, Eric S.; Getz, Gad; Golub, Todd R.; Garraway, Levi A.; Grandis, Jennifer R. (2011): The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6046), S. 1157–1160. DOI: 10.1126/science.1208130.

Strauss, S.; Sastry, P.; Sonnex, C.; Edwards, S.; Gray, J. (2002): Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. In: *Sexually transmitted infections* 78 (2), S. 135–138. DOI: 10.1136/sti.78.2.135.

Su, Xiaohua; Chakravarti, Deepavali; Cho, Min Soon; Liu, Lingzhi; Gi, Young Jin; Lin, Yu-Li; Leung, Marco L.; El-Naggar, Adel; Creighton, Chad J.; Suraokar, Milind B.; Wistuba, Ignacio; Flores, Elsa R. (2010): TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. In: *Nature* 467 (7318), S. 986–990. DOI: 10.1038/nature09459.

Thompson, James D.; Harari, Paul M.; Hartig, Gregory K. (2018): Is HPV-Associated Oropharyngeal Cancer Becoming More Common in Older Patients? In: *Laryngoscope investigative otolaryngology* 3 (6), S. 446–449. DOI: 10.1002/liv.2.181.

Thurfjell, Niklas; Coates, Philip J.; Uusitalo, Tony; Mahani, David; Dabelsteen, Erik; Dahlqvist, Ake; Sjöström, Björn; Roos, Göran; Nylander, Karin (2004): Complex p63 mRNA isoform expression patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *International journal of oncology* 25 (1), S. 27–35.

Tota, Joseph E.; Chevarie-Davis, Myriam; Richardson, Lyndsay A.; Devries, Maaïke; Franco, Eduardo L. (2011): Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. In: *Preventive medicine* 53 Suppl 1, S12-21. DOI: 10.1016/j.ypmed.2011.08.017.

Tsujita-Kyutoku, Miki; Kiuchi, Katsuji; Danbara, Naoyuki; Yuri, Takashi; Senzaki, Hideto; Tsubura, Airo (2003): p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. In: *Journal of cutaneous pathology* 30 (1), S. 11–17. DOI: 10.1034/j.1600-0560.2003.300102.x.

U.S. National Library of Medicine: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02586207>, zuletzt geprüft am 07.01.2022.

Uniprot: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H3D4>, zuletzt geprüft am 03.01.2022.

Urist, Marshall J.; Di Como, Charles J.; Lu, Ming-Lan; Charytonowicz, Elizabeth; Verbel, David; Crum, Christopher P.; Ince, Tan A.; McKeon, Frank D.; Cordon-Cardo, Carlos (2002): Loss of p63 Expression Is Associated with Tumor Progression in Bladder Cancer.

In: *The American Journal of Pathology* 161 (4), S. 1199–1206. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64396-9.

Vectorlabs: VECTASTAIN ABCHRP Kit (Peroxidase, Rabbit IgG). Online verfügbar unter <https://vectorlabs.com/guides/page/avidin-biotin-complex-abc-based-detection#:~:text=Avidin-Biotin%20Complex%20%28ABC%29-Based%20Detection%20Modular%20and%20versatile%20with,between%20the%20protein%20avidin%20and%20the%20vitamin%20biotin.,> zuletzt geprüft am 09.12.2021.

Villiers, Ethel-Michele de; Fauquet, Claude; Broker, Thomas R.; Bernard, Hans-Ulrich; zur Hausen, Harald (2004): Classification of papillomaviruses. In: *Virology* 324 (1), S. 17–27. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

Vyas, Avani; Harbison, Richard A.; Faden, Daniel L.; Kubik, Mark; Palmer, Drake; Zhang, Qing; Osmanbeyoglu, Hatice U.; Duvvuri, Umamaheswar; Méndez, Eduardo (2021): Recurrent human papillomavirus-related head and neck cancer undergoes metabolic reprogramming and is driven by oxidative phosphorylation. In: *Clin Cancer Res*, clincanres.4789.2020. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4789.

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, Steffen; Prigge, Elena-Sophie; Wuerdemann, Nora; Reder, Henrike; Bushnak, Ayman; Sharma, Shachi Jenny; Obermueller, Theresa; Knebel Doeberitz, Magnus von; Dreyer, Thomas; Gattenlöhner, Stefan; Wolf, Gregor; Pons-Kühnemann, Jörn; Wittekindt, Claus; Klusmann, Jens Peter (2020): Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. In: *British journal of cancer* 123 (7), S. 1114–1122. DOI: 10.1038/s41416-020-0964-x.

Wagner, Steffen; Wittekindt, Claus; Sharma, Shachi Jenny; Wuerdemann, Nora; Jüttner, Theresa; Reuschenbach, Miriam; Prigge, Elena-Sophie; Knebel Doeberitz, Magnus von; Gattenlöhner, Stefan; Burkhardt, Ernst; Pons-Kühnemann, Jörn; Klusmann, Jens Peter (2017): Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. In: *British journal of cancer* 116 (12), S. 1604–1611. DOI: 10.1038/bjc.2017.132.

Walline, Heather M.; Komarck, Christine M.; McHugh, Jonathan B.; Bellile, Emily L.; Brenner, J. Chad; Prince, Mark E.; McKean, Erin L.; Chepeha, Douglas B.; Wolf, Gregory

T.; Worden, Francis P.; Bradford, Carol R.; Carey, Thomas E. (2016): Genomic Integration of High-Risk HPV Alters Gene Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. In: *Molecular cancer research : MCR* 14 (10), S. 941–952. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0105.

Waltonen, Joshua D.; Thomas, Sydney G.; Russell, Gregory B.; Sullivan, Christopher A. (2021): Oropharyngeal Carcinoma Treated with Surgery Alone: Outcomes and Predictors of Failure. In: *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 34894211021287. DOI: 10.1177/00034894211021287.

Wang, Xiaohong; Tang, Shuang; Le, Shu-Yun; Lu, Robert; Rader, Janet S.; Meyers, Craig; Zheng, Zhi-Ming (2008): Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. In: *PloS one* 3 (7), e2557. DOI: 10.1371/journal.pone.0002557.

Wang, Xinhua; Zhu, Wenyan; Zhou, Yi; Xu, Wanlian; Wang, Huiming (2014): RIPK4 is downregulated in poorly differentiated tongue cancer and is associated with migration/invasion and cisplatin-induced apoptosis. In: *The International journal of biological markers* 29 (2), e150-9. DOI: 10.5301/jbm.5000073.

Weinberger, Paul M.; Yu, Ziwei; Kountourakis, Panteleimon; Sasaki, Clarence; Haffty, Bruce G.; Kowalski, Diane; Merkley, Mark A.; Rimm, David L.; Camp, Robert L.; Psyrri, Amanda (2009): Defining molecular phenotypes of human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: validation of three-class hypothesis. In: *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 141 (3), S. 382–389. DOI: 10.1016/j.otohns.2009.04.014.

Welsch, Ulrich (2009): Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Aufl., 2. Nachdr. München: Urban & Fischer in Elsevier (StudentConsult).

Werness, B. A.; Levine, A. J.; Howley, P. M. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. In: *Science (New York, N.Y.)* 248 (4951), S. 76–79. DOI: 10.1126/science.2157286.

White, Mary C.; Holman, Dawn M.; Boehm, Jennifer E.; Peipins, Lucy A.; Grossman, Melissa; Henley, S. Jane (2014): Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. In: *American journal of preventive medicine* 46 (3 Suppl 1), S7-15. DOI: 10.1016/j.amepre.2013.10.029.

Wienecke, Antje; Kraywinkel, Klaus (2019): Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. In: *Onkologie* 25 (3), S. 190–200. DOI: 10.1007/s00761-019-0534-0.

Würdemann, Nora; Wagner, Steffen; Sharma, Shachi Jenny; Prigge, Elena-Sophie; Reuschenbach, Miriam; Gattenlöhner, Stefan; Klussmann, Jens Peter; Wittekindt, Claus (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.

Xu, Jing; Wei, Qichun; He, Zhixing (2020): Insight Into the Function of RIPK4 in Keratinocyte Differentiation and Carcinogenesis. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 1562. DOI: 10.3389/fonc.2020.01562.

Yamaguchi, Kengo; Wu, Li; Caballero, Otvia L.; Hibi, Kenji; Trink, Barry; Resto, Vicente; Cairns, Paul; Okami, Kenji; Koch, Wayne M.; Sidransky, David; Jen, Jin (2000): Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. In: *Int. J. Cancer* 86 (5), S. 684–689. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000601)86:5<684::AID-IJC13>3.0.CO;2-M.

Yang, Annie; Kaghad, Mourad; Wang, Yunmei; Gillett, Emily; Fleming, Mark D.; Dötsch, Volker; Andrews, Nancy C.; Caput, Daniel; McKeon, Frank (1998): p63, a p53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. In: *Molecular Cell* 2 (3), S. 305–316. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80275-0.

Yang, Zhan; Du, Wei; Zhang, Xu; Chen, Defeng; Fang, Qigen; He, Yuezhong; Yang, Yang; Li, Ding; Fan, Jie (2021): Nonsmoking and Nondrinking Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Different Entity. In: *Frontiers in oncology* 11, S. 558320. DOI: 10.3389/fonc.2021.558320.

Yi, Zhigang; Pu, Yanchuan; Gou, Ruoyan; Chen, Yonggang; Ren, Xiaojun; Liu, Wenzhong; Dong, Ping (2020): Silencing of RIPK4 inhibits epithelial-mesenchymal transition by inactivating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma. In: *Molecular medicine reports* 21 (3), S. 1154–1162. DOI: 10.3892/mmr.2020.10939.

Zangen, Rachel; Ratovitski, Edward; Sidransky, David (2005): DeltaNp63alpha levels correlate with clinical tumor response to cisplatin. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (10), S. 1313–1315. DOI: 10.4161/cc.4.10.2066.

Zimmermann, Philipp H.; Stuut, Marijn; Würdemann, Nora; Möllenhoff, Kathrin; Suchan, Malte; Eckel, Hans; Wolber, Philipp; Sharma, Shachi J.; Kämmerer, Fabian; Langer, Christine; Wittekindt, Claus; Wagner, Steffen; Kremer, Bernd; Speel, Ernst Jan

M.; Klussmann, Jens P. (2021): Upfront Surgery vs. Primary Chemoradiation in an Unselected, Bicentric Patient Cohort with Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma-A Matched-Pair Analysis. In: *Cancers* 13 (21). DOI: 10.3390/cancers13215265.

Zumsteg, Zachary S.; Cook-Wiens, Galen; Yoshida, Emi; Shiao, Stephen L.; Lee, Nancy Y.; Mita, Alain; Jeon, Christie; Goodman, Marc T.; Ho, Allen S. (2016): Incidence of Oropharyngeal Cancer Among Elderly Patients in the United States. In: *JAMA oncology* 2 (12), S. 1617–1623. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.1804.

zur Hausen, Harald (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (5), S. 342–350. DOI: 10.1038/nrc798.

zur Hausen, Harald (2009): Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. In: *Virology* 384 (2), S. 260–265. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.046.

12. Anhang

12.1 Einteilung der TNM-Stadien und UICC8 Stadien

Tabelle 30: Pathologische TNM-Stadien der OPSCC in der 8. Auflage

p16-negative OPSCC		p16-positive OPSCC	
T-Stadium			
T1	≤2 cm	T1	≤2 cm
T2	>2 cm, ≤4 cm	T2	>2 cm, ≤4 cm
T3	>4 cm, oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis	T3	>4 cm, oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis
T4a	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Hartgaumen, Mandibula, Lamina med. Processus pterygoideus, harter Gaumen oder Unterkiefer	T4	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Lamina med./lat. Processus pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, ACI, lat. Nasopharynx
T4b	Infiltration M. pterygoideus lateralis, Processus pterygoideus, Schädelbasis, ACI		
N-Stadium			
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilateral solitär ≤3 cm	N1	≤4 betroffene Lymphknoten
N2a	Ipsilateral solitär, ≤3 cm mit ECS, >3cm aber ≤6 cm ohne ECS	N2	≥5 betroffene Lymphknoten
N2b	Ipsilateral multipel, ≤6 cm, ohne ECS		
N2c	Bilateral, kontralateral ≤6 cm ohne ECS		
N3a	Metastasen >6 cm, ohne ECS		
N3b	Metastasen >3 cm mit ECS oder kontra-/bilateral mit ECS		
M-Stadium			
M0	Keine Fernmetastase	M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastasen vorhanden	M1	Fernmetastasen vorhanden

ECS= extranodale Ausbreitung
 Die Tabelle wurde erstellt auf Grundlage von (Amin et al. 2017).

Tabelle 31: Pathologische Einteilung der Tumorstadien nach UICC bei den OPSCC in der 8. Auflage

HPV-negative OPSCC				HPV-assoziierte OPSCC			
Stadium	T-Status	N-Status	M-Status	Stadium	T-Status	N-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0	I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T2	N0	M0	II	T1, T2	N2	M0
					T3	N0, N1	M0
III	T3	N0	M0	III	T3, T4	N2	M0
	T1, T2, T3	N1	M0				
IVA	T4a	N0, N1	M0	IV	Jedes T	Jedes N	M1
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0				
IVB	Jedes T	N3	M0				
	T4b	Jedes N	M0				
IVC	Jedes T	Jedes N	M1				

Die Tabelle wurde erstellt auf Grundlage von (Amin et al. 2017).

12.2 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

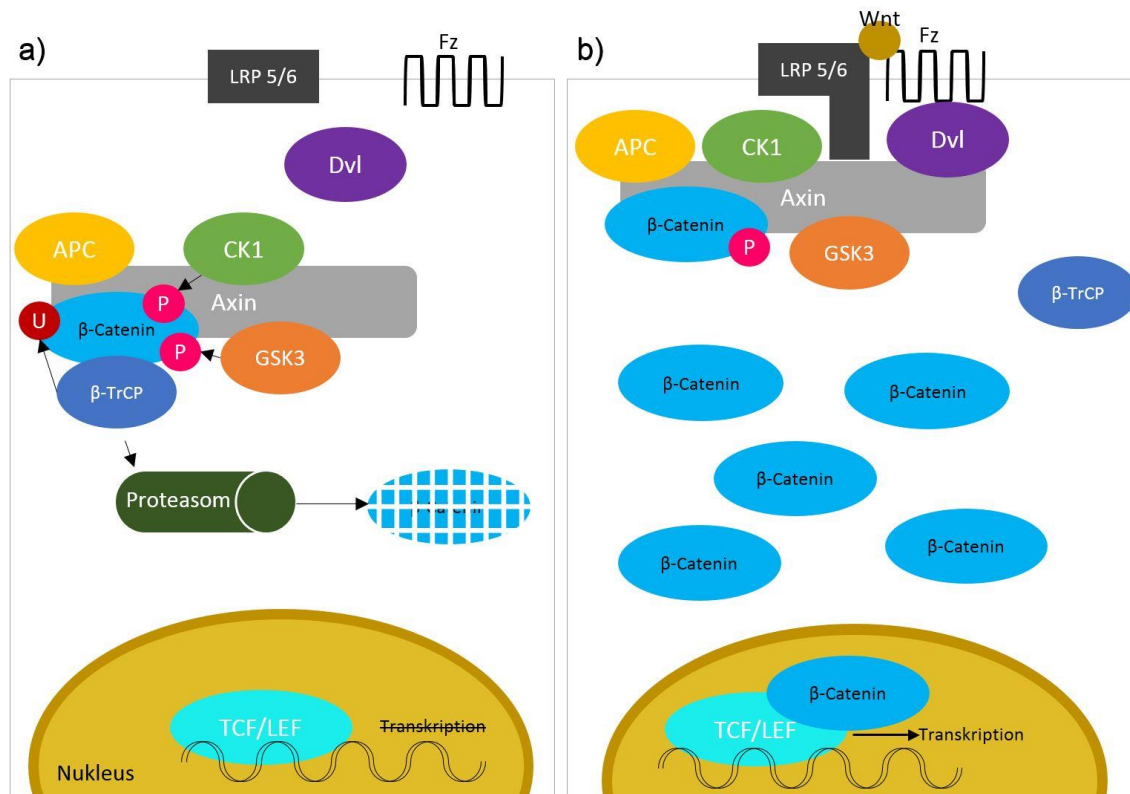


Abbildung 27: Wnt/ β -Catenin-Signalweg a) inaktiv und b) aktiv.

Die Abbildung ist modifiziert nach einer Vorlage von (Gao et al. 2014) erstellt.

a) Im Zytoplasma bildet sich der *destruction*-Komplex durch Bindung des Gerüstproteins Axin an GSK 3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3), CK1 (Casein-Kinase 1), APC (Adenomatöse-Polyposis-Coli-Protein) und β -Catenin. β -Catenin wird durch CK1 und GSK3 phosphoryliert (P in pinkem Kreis). Dieses wird durch Bindung an β -TrCP (β -transducin repeats-containing protein) ubiquitiniert (U in rotem Kreis), was den Abbau im Proteasom zur Folge hat.

b) Ein Wnt-Protein bindet an den Membranrezeptor Fz (*Frizzled*) und den Corezeptor LRP 5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*). Dadurch wird Dvl (*Dishevelled*) aktiviert und begünstigt die Bindung des *destruction*-Komplex an der Membran. β -Catenin wird phosphoryliert (P in pinkem Kreis), jedoch nicht ubiquitiniert. So kommt es zu einer Sättigung des *destruction*-Komplex mit phosphoryliertem β -Catenin und der Abbau wird inhibiert. Die neu synthetisierten Transkriptionscofaktoren reichern sich im Zytosol an und translozieren zum Nukleus. Dort interagiert β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) und bewirkt die Transkription von Genen.

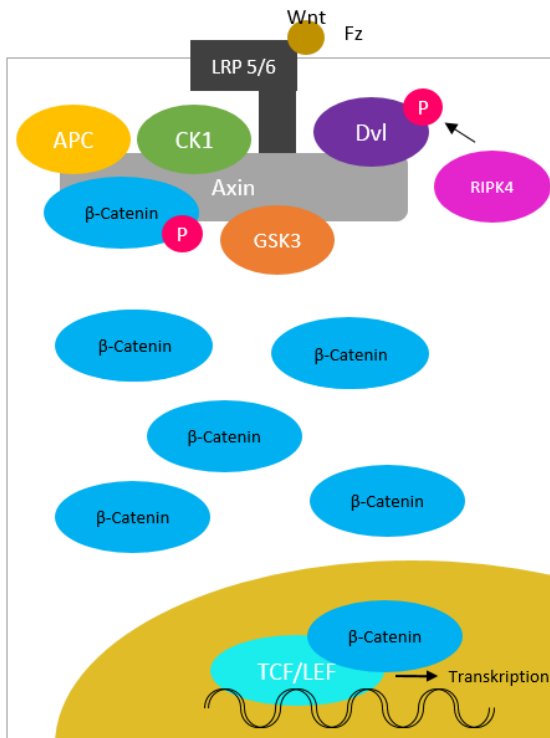


Abbildung 28: Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch RIPK4.

Die Abbildung wurde modifiziert nach einer Vorlage von (Gao et al. 2014) erstellt.

RIPK4 kann Dvl phosphorylieren (P in pinkem Kreis). Dadurch wird die Anlagerung des *destruction*-Komplex begünstigt und führt so zu einer Stabilisierung von β -Catenin. Dadurch wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert und die Wnt-abhängigen Gene können verstärkt transkribiert werden.

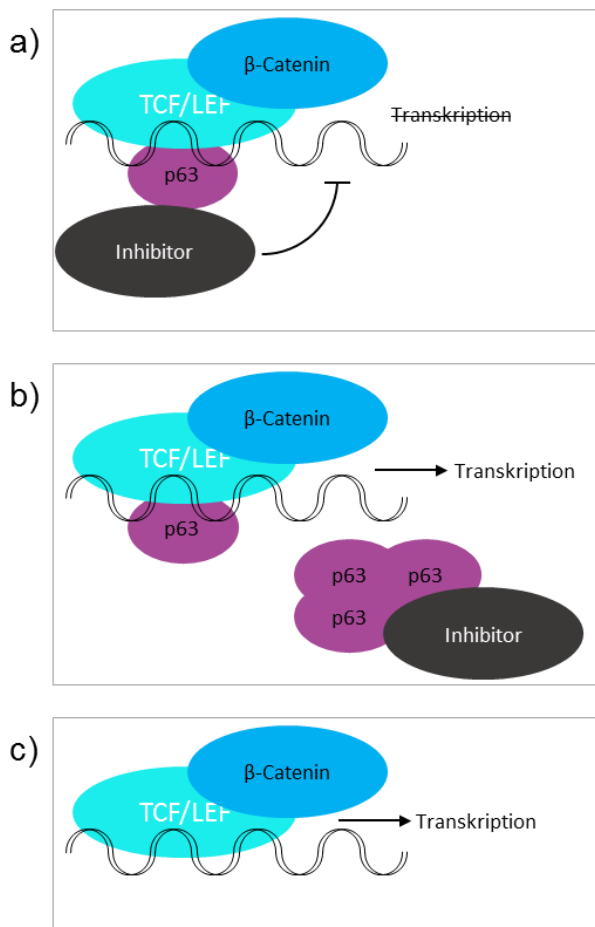


Abbildung 29: Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch p63: a) physiologischer Zustand; b) Überexpression von p63; c) Herabregulierung von p63.

Die Abbildung wurde modifiziert nach einer Vorlage von (Drewelus et al. 2010) erstellt.

a) Beim Vorliegen einer physiologischen Expression von p63 wird durch eine Anreicherung von inhibierenden Faktoren die Transkription gemindert.

b) Beim Vorliegen einer p63-Überexpression, werden die inhibierenden Faktoren gehemmt, sodass die Wnt-abhängigen-Gene transkribiert werden.

c) In frühen Tumorstadien bewirkt eine p63-Expression die Erneuerung und Proliferation von Tumorzellen. In den fortgeschrittenen Tumorstadien wird p63 häufig herabreguliert. Die Verminderung von p63 kann zu einer Aktivierung der Transkription führen und das invasive Wachstum sowie die Metastasierung begünstigen.

12.3 Definition ECOG-Stadieneinteilung

Tabelle 32: Einteilung der ECOG-Stadien

ECOG-Schweregrad	Leistungszustand
0	keine Einschränkung, normale Aktivität
1	leichte Einschränkung, geh- und arbeitsfähig
2	gefhähig, nicht arbeitsfähig, Selbstversorgung möglich, >50% pflegebedürftig
3	nur teilweise Selbstversorgung möglich, >50% kontinuierlich pflegebedürftig
4	100% pflegebedürftig
5	Tod *

Die Tabelle wurde modifiziert nach einer Vorlage von (Herold 2021; Oken et al. 1982) erstellt.

* Die Schweregradeinteilung 5 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, da bei Erhebung des ECOG-Stadiums alle Patienten lebten und somit keiner in diese Kategorie eingenordet wurde.

12.4 Ergänzende Tabellen zur multivariaten Überlebensanalyse

Tabelle 33: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte mit Ergänzungen der Variable RIPK4

		multivariate Cox-Regression			p-Wert °
		HR	95% KI unten	95% KI oben	
Alter	< Median	1			0,009
	≥ Median	2,672	1,272	5,613	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			0,008
	>2	3,042	1,338	6,915	
T-Stadium	1-2	1			0,030
	3-4	2,260	1,083	4,717	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	6,629	2,843	15,455	
RIPK4	schwach	1			0,643
	stark	0,84	0,406	1,746	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Tabelle 34: Multivariate Überlebensanalyse der OPSCC-Untersuchungskohorte mit Ergänzungen der Variable p63

		multivariate Cox-Regression			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			0,035
	≥ Median	2,316	1,062	5,051	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			0,005
	>2	3,291	1,42	7,628	
T-Stadium	1-2	1			0,017
	3-4	2,401	1,169	4,933	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	6,149	2,641	14,317	
p63	schwach	1			0,304
	stark	0,665	0,305	1,449	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Tabelle 35: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Alkohol ohne den HPV-Status.

		multivariate Cox-Regression			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			0,005
	≥ Median	1,368	1,099	1,704	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<0,001
	krank (≥ 2)	1,593	1,256	2,021	
T-Stadium	1-2	1			<0,001
	3-4	2,674	2,12	3,374	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	2,245	1,568	3,214	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			<0,001
	>2	1,66	1,322	2,084	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Tabelle 36: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variablen Rauchen und Alkohol ohne den HPV-Status.

		multivariate Cox-Regression			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			0,004
	≥ Median	1,390	1,112	1,739	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<0,001
	krank (≥ 2)	1,598	1,259	2,028	
T-Stadium	1-2	1			<0,001
	3-4	2,650	2,095	3,351	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	2,228	1,556	3,192	
Alkohol (Standardgläser/Tag)	≤2	1			<0,001
	>2	1,594	1,257	2,02	
Rauchen	Nein	1			0,965
	Ja	1,192	0,840	1,692	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Tabelle 37: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Rauchen.

		multivariate Cox-Regression			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			<0,001
	≥ Median	1,472	1,191	1,820	
HPV-Status	negativ	1			<0,001
	assoziiert	0,362	0,261	0,502	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<0,001
	krank (≥ 2)	1,763	1,401	2,218	
T-Stadium	1-2	1			<0,001
	3-4	2,626	2,099	3,285	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	1,994	1,419	2,801	
Rauchen	Nein	1			0,531
	Ja	0,898	0,64	1,259	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

Tabelle 38: Multivariate Überlebensanalyse des OPSCC-Gesamtkollektivs mit Ergänzungen der Variable Rauchen, ohne den HPV-Status.

		multivariate Cox-Regression			
		HR	95% KI unten	95% KI oben	p-Wert °
Alter	< Median	1			0,001
	≥ Median	1,446	1,17	1,787	
Komorbidität (ECOG)	gesund (0-1)	1			<0,001
	krank (≥ 2)	1,676	1,334	2,105	
T-Stadium	1-2	1			<0,001
	3-4	2,704	2,162	3,381	
M-Stadium	M0	1			<0,001
	M+	2,099	1,493	2,951	
Rauchen	Nein	1			0,029
	Ja	1,418	1,037	1,939	

Median des Überlebens in Jahren nach Kaplan-Meier; HR: Hazard Ratio; 95% KI: 95% Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze; p-Wert °: durch Cox-Regression ermittelt; fett geschrieben: signifikante p-Werte

12.5 Bescheid der Ethikkommission



Ethik-Kommission, Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik), D-35385 Gießen

Prof. Dr. J.P. Klußmann
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Klinikstr. 33
35392 Gießen

**ETHIK-KOMMISSION
am Fachbereich Medizin
Vorsitz: Prof. H. Tillmanns**

Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik)
D-35385 Gießen
Tel.: (0641)99-42470 / 47660
ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de

Gießen, 19. Oktober 2015
Dr. Kr./

AZ.: 95/15

Titel: *Untersuchung und Biobanking von Blut- und Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zur Etablierung prognostischer und prädiktiver Biomarker sowie von Zellkulturmodellen.*

Sitzung am 25.06.15

Sehr geehrte(r) Antragsteller/Antragstellerin,

lieber Herr Klußmann

wir bedanken uns für die Vorstellung Ihres Forschungsprojektes. Im Folgenden erhalten Sie das Votum der Gießener Ethik-Kommission zur oben genannten Studie:

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)

Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung

Eingesandte Unterlagen:

- Formalisierter Antrag
- Genaue Beschreibung des Vorhabens (Studienprotokoll)
- Patientenaufklärung und -Einverständnis zum "Biobanking" Version 1 vom 08.05.2015
- Erhebungsbogen Biomarker



Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt.

Sie stimmt dem Vorhaben zu.

Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).

Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).



Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr bis ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem (roten) Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 25.06.15:

Herr Prof. Dr. med. Claus Wittekindt trägt vor. Hintergrund und Ziele der Studie: Unter Kopf-Hals-Karzinomen versteht man eine Gruppe maligner Tumore, die im Kopf-Hals-Bereich ihren Ursprung haben. Die Malignome im Kopf-Hals-Bereich weisen, in Abhängigkeit vom Ort ihrer Entstehung, individuelle Besonderheiten auf. In der Mehrzahl (in > 90 %) handelt es sich um Plattenepithelkarzinome [Uniklinik Heidelberg: Bösartige Tumore des Kopf-Hals-Bereichs allgemein, abgerufen am 10. August 2007 (<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Boesartige-Erkrankungen-des-Kopf-Hals-Bereiches.7069.0.html>)]. Die meisten bösartigen Tumore im Kopf-Hals-Bereich werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt, was zu einer erheblichen Verschlechterung der Prognose führt. Die Therapie wird, je nach Lokalisation, von Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Ärzten oder Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen (MKG-Chirurgen) vorgenommen. Weltweit stellen Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich heute die siebthäufigste Malignomerkrankung dar; diese Krebsform wird zunehmend bei Männern in den 50er und 60er Jahren sowie vor allem auch bei jungen Frauen beobachtet (M.R. Spitz: Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. (Semin. Oncol. 1994; 21: 281-288). Zu den Kopf-Hals-Karzinomen werden u.a. folgende Krebserkrankungen gerechnet: 1) Das Mundhöhlenkarzinom, 2) das Nasopharynxkarzinom, 3) das Oropharynxkarzinom, 4) das Hypopharynxkarzinom, 5) das Larynxkarzinom, 6) das Trachealkarzinom. Die Hauptursache für die meisten Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich ist der Nikotinabusus in Form von Tabakrauchen. Rauchen potenziert das Risiko, an einer Form von Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken, erheblich. Die Wahrscheinlichkeit erhöht sich zudem noch durch den übermäßigen Konsum von hochprozentigem Alkohol, der hierbei als Lösungsmittel für die im Zigarettenrauch befindlichen Kanzerogene dient (Uniklinik Heidelberg, <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Boesartige-Erkrankungen-des-Kopf-Hals-Bereiches.7069.0.html>); M.R. Spitz, Semin. Oncol. 1994; 21: 281-288; André, K., Schraub, S., Mercier, M., Bontemps, P.: Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. Eur. J. Cancer B Oral Oncol. 1995; 31B: 301-309.). – Schuppenförmige (squamöse) Zellkarzinome stellen Malignome dar, die aus besonderen Zellen, den schuppenförmigen (squamosen) Zellen entstehen. Squamöse Zellen werden in der äußeren Schicht der Haut und in den Schleimhäuten gefunden, welche die feuchten Gewebe darstellen, die Körperhöhlen, wie z.B. die Luftwege und den Darm auskleiden. Das squamöse Zellkarzinom des Kopfes und des Nackens (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) entwickelt sich in den Schleimhäuten des Munds, der Nase und des Rachens. Die HNSCC werden nach ihrer Lokalisation klassifiziert: Sie können im Mund (in der Mundhöhle), im mittleren Teil des Rachens nahe dem Mund (im Oropharynx), im Raum hinter der Nase (in der Nasenhöhle und in den paranasalen Sinus), im oberen Teil des Rachens in der Nähe der Nasenhöhle (im Nasopharynx), im Kehlkopf (Larynx) oder im unteren Teil des Rachens in der Nähe des Larynx (im Hypopharynx) auftreten. HNSCC können in andere Teile des Körpers metastasieren, wie z.B. in Lymphknoten oder in die Lungen. Wenn das HNSCC metastasiert, hat das Karzinom eine schlechtere Prognose und kann zum Tod führen. Etwa die Hälfte der von einem HNSCC befallenen Personen überleben nach der Diagnosestellung mehr als 5 Jahre. – Die HNSCC stellen eine heterogene Gruppe solider Tumore dar, deren Behandlung weitgehend unabhängig ihrer zugrundeliegenden Biologie erfolgt. Mit einem humanen Papillomavirus (HPV) assoziierte Tumore unterscheiden sich von Noxen-assoziierten Tumoren in verschiedenen Aspekten der Tumorbiologie. – Die Behandlung in Deutschland erfolgt multimodal (Chirurgie, simultane Radiochemotherapie), ohne zwischen beiden Tumoridentitäten zu unterscheiden; dies ist mit einer erheblichen Toxizität und Spätschäden verbunden. HPV-assoziierte orale squamöse Zellkarzinome (OSCC) weisen üblicherweise weniger, aber dafür spezifischere Mutationen auf, und die Tumore sind weniger heterogen. In einer eigenen Studie konnten die Antragsteller zeigen, daß Deletionen auf den Chromosomen 3p, 5q, 9p, 15q und 18q sowie Genamplifikationen in der Region 11q13 bei HPV-assoziierten OSCC signifikant seltener auftreten als bei HPV-negativen Tumoren. In bis zu 50 % der Fälle zeigen sich bei HPV-positiven oralen squamosen Zellkarzinomen (OSCC) genetische Veränderungen im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, welche zu einer Steigerung des Zellwachstums und –überlebens führen. Derzeit sind die besten prognostischen Biomarker der Nachweis von HPV-DNA bzw. RNA, sowie die Expression des zellulären p16-Proteins, das mit der onkogenen Aktivität von HPV assoziiert ist. Tumormarker oder prädiktive Marker, die das Therapieansprechen oder den Verlauf charakterisieren, ebenso wie gezielte Therapieansätze fehlen. – Ziele des Forschungsprojektes sind: 1) Die Identifizierung und Etablierung neuer prognostischer und prädiktiver Biomarker, anhand derer im Verlauf von Tumorbehandlung und –nachsorge ein Therapieerfolg oder –versagen abgeleitet werden kann: a) Die Detektion von HPV- und Tumor-spezifischen genetischen Veränderungen im Blut und im Gewebe mittels Sequenzierungsverfahren; b) die Detektion HPV- und Tumor-spezifischer Immunreaktionen im Blut; c) die Bestimmung von HPV- und Tumor-spezifischen

Markern im Gewebe; d) die Analyse eines Zusammenhangs von HPV- und Tumor-spezifischen Responsemarkern im klinischen Verlauf und deren prognostische Aussage; e) Therapie- und Verlaufsdokumentation anhand von Erhebungsbögen (Hals-, Nasen- und Ohren-Klinik, Strahlenklinik) sowie eine Zusammenhangsanalyse zum Therapieansprechen bzw. zum klinischen Verlauf. 2) Die experimentelle Erarbeitung neuer Therapiestrategien: a) Die Extraktion von Tumorzellen aus Gewebe zum Anlegen von Zellkulturen; b) die Identifizierung therapierbarer Zellcharakteristika der oben genannten Analysen bei Zellkulturen; c) die Testung neuer Konzepte in Abhängigkeit identifizierter therapierbarer Charakteristika der angelegten Zellkulturen. –

Bei dem Vorhaben handelt es sich um eine prospektive, multizentrische, offene, rein deskriptive, explorative Studie der Grundlagenforschung (Blutentnahmen, Biopsien). Leiter der klinischen Prüfung ist Prof. Dr. med. Jens-Peter Klußmann, Leiter der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen. Hiesige Prüfärzte sind Prof. Dr. med. Jens-Peter Klußmann, Prof. Dr. med. Claus Wittekindt, leitender Oberarzt der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Dr. med. S.J. Sharma und N. Würdemann, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen. Das Vorhaben wird 1) in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Jens-Peter Klußmann), 2) im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner), sowie 3) in der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen (Abteilungsleiterin: Frau Prof. Dr. med. Engenhardt-Cabillic) durchgeführt. Biometrische Bearbeitung: Die Aufnahme der Patientendaten erfolgt durch die behandelnden Ärzte der jeweiligen Zentren. Die Auswertungen der klinischen und experimentellen Daten erfolgt durch Mitarbeiter der Giessener Institutionen. Das Projekt wird finanziell durch die Rhön-Förderung unterstützt. Die Studie soll baldmöglichst nach dem Erhalt des positiven Votums unserer Ethik-Kommission beginnen, die Nachbeobachtungen werden bis zu 5 Jahre nach der Erstdiagnose erfolgen. Insgesamt sollen 20 bis 40 Patienten beiderlei Geschlechts (Alter: 18 bis 99 Jahre) (stationär und ambulant) in die Studie eingeschlossen werden. Einschlusskriterium ist ein histologisch gesichertes head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Ausschlusskriterium ist die Ablehnung der Studienteilnahme. Hauptzielkriterium ist der prognostische Einfluß einer HPV-Infektion auf das Gesamtüberleben bei HNSCC. Nebenzielkriterien sind 1) der prognostische Einfluß einer HPV-Infektion auf das progressionsfreie Überleben bei HNSCC; 2) der prognostische Einfluß relevanter molekularer Marker auf das progressionsfreie Gesamtüberleben bei HNSCC. –

In der Diskussion berichtet Herr Prof. Dr. med. Claus Wittekindt, daß die vorliegende Studie zwei Ziele verfolge: Es sollen prognostische und prädiktive Biomarker identifiziert werden, anhand derer im Verlauf von Tumorbehandlung und –nachsorge ein Therapieerfolg oder –versagen abgeleitet werden könne. Hierzu sollen Blut- und Gewebeprobe von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (HNSCC) über einen Zeitraum von 5 Jahren ab Erstdiagnose untersucht werden. Anhand der Tumorproben sollen experimentell neue Therapiestrategien erarbeitet werden, dies stelle das zweite Ziel der Studie dar. Die Blutentnahme erfolge nach Diagnosestellung, während der Therapie sowie in der Tumornachsorge. Herr Prof. Wittekindt erläutert, daß Körperzellen einem kontinuierlichen Auf- und Abbau unterliegen würden, wodurch ihre Bestandteile, wie z.B. DNA in das Blut gelangten. So würde auch DNA von Tumorzellen in das Blut abgegeben; aus technischen Gründen liefere dieser Prozeß jedoch wenig praktikable Diagnostikansätze. Er betont, daß es mit Hilfe von Next Generation Sequencing (NGS) und anderen Sequenzierungsverfahren möglich sei, Tumor-DNA (und somit Tumor-assoziierte genetische Veränderungen) sowohl im Gewebe, als auch im Blut nachzuweisen und zu vergleichen. Nach Entfernung des Tumors sollte die relative Menge dieser DNA im Blut abnehmen und bei Wiederauftreten der Erkrankung erneut ansteigen. Hierdurch würde eine Überwachung (ein „Monitoring“) des Behandlungserfolgs (auch während der Tumornachsorge) spezifisch und minimalinvasiv ermöglicht. Hierzu müßten die therapeutischen Maßnahmen exakt erfaßt werden; dies beinhaltet die Dokumentation des operativen sowie strahlentherapeutischen Vorgehens in einem entsprechenden Erhebungsbogen für jeden in die Studie eingeschlossenen Patienten. Darüber hinaus werde der Verlauf in einem entsprechenden Erhebungsbogen bei jeder routinemäßigen Nachuntersuchung dokumentiert. Für die Studie seien keine gesonderten Nachuntersuchungen vorgesehen. Herr Prof. Wittekindt erläutert, daß mit dem humanen Papillomavirus (HPV) assoziierte squamöse Zellkarzinome des Kopfes und des Nackens (HNSCC) als ideale Forschungsobjekte angesehen würden, um neue Sequenzierungsverfahren unter „Klinikbedingungen“ zu etablieren, da leicht nachweisbare „nicht-humane“ DNA vorhanden sei, die mit der Karzinogenese und einer Reihe spezifischer Mutationen assoziiert sei. Neben dem „Monitoring“-Ansatz gelte es, diese „Treibermutationen“ zu identifizieren, um die entsprechenden Signalwege gezielt behandeln zu können. Neben der bislang üblichen HPV-Diagnostik (HPV-DNA-Nachweis und p16-Expressionsstatus) sowie genetischen Tests sollen HPV-spezifische Immunreaktionen im Blut und im Gewebe u.a. anhand der Zusammensetzung von „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMCs) sowie der Anwesenheit HPV-spezifischer Antikörper z.B. gegen das virale L1-Protein,

untersucht werden, da ein prognostischer Zusammenhang zwischen HPV und einer Virus-spezifischen Immunantwort diskutiert werde. – Das zweite Teilprojekt, das Ziel 2, experimentelle neue Therapiestrategien, beinhalte die Extraktion von Tumorzellen aus überschüssigem Gewebe zum Anlegen von Zellkulturen. Anhand dieser Zellkulturen sollen klassische Zellkultur-Experimente zur Erforschung spezifischer Tumormarker und neuartiger Therapiekonzepte durchgeführt, sowie Grundlagenforschung betrieben und weitere Kenntnisse bezüglich der Entstehung HPV-assoziiierter HNSCC gewonnen werden. Herr Prof. Wittekindt räumt ein, daß die Zahl der derzeit zur Verfügung stehenden Zellkulturen aus dem Kopf-Hals-Bereich begrenzt sei. Dies gelte besonders für HPV-positive Zellkulturen, von denen bislang weltweit lediglich 5 beschrieben seien. Herr Prof. Wittekindt betont, daß in einer eigenen Studie der Antragsteller bezüglich des Therapieansprechens bei HPV-positiven HNSCC sich eine erhöhte Sensibilität gegenüber Bestrahlung ± Cisplatin-Chemotherapie gezeigt habe. Jedoch habe sich auch gezeigt, daß die einzelnen HPV-positiven Tumor-Zelllinien in Bezug auf Radio- und Chemosensibilität sich unterschiedlich verhielten. Diese tumorspezifische Heterogenität mache es zudem erforderlich, daß weitere Zellkulturen angelegt würden, damit repräsentative in vitro-Modelle für die Forschung zur Verfügung stehen würden. – Herr Prof. Dr. Wittekindt schildert, daß die Patienten an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und an der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, sowie an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde in Frankfurt/Oder für die Studie rekrutiert würden. Die Analyse der Blut- und Gewebeprobe mittels molekular- und zellbiologischer, sowie histologischer Methoden erfolge im Forschungslabor des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen. Es sei vorgesehen, daß im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen Materialien und anonymisierte Daten mit anderen Institutionen ausgetauscht würden, die keine kommerzielle Verwendung für diese Proben und Daten hätten und nur zu Forschungszwecken dienten. Es werde erwartet, daß die Ergebnisse der Analyse Rückschlüsse auf den Verlauf der Erkrankung und für zukünftige Therapieentscheidungen liefern würden. – Im weiteren Verlauf der Diskussion werden 1) die Lokalisationen des oralen squamösen Zellkarzinoms (OSCC): Ca. 40 % der intraoralen squamösen Zellkarzinome gehen vom Boden der Mundhöhle oder von den lateralen und ventralen Oberflächen der Zunge aus; ca. 38 % aller OSCC träten an der Unterlippe auf (gewöhnlicherweise durch Sonneneinstrahlung bewirkte Karzinome an der äußeren Oberfläche); 2) die funktionelle Bedeutung der Expression des zellulären p16-Proteins, die mit der onkogenen Aktivität von HPV assoziiert ist; 3) die zu erhebenden Studienparameter des Erhebungsbogens „Biomarker bei HNSCC, first visit/run-in“ [a] die Biometrie: Männlich/weiblich, Tumorerkrankung in der Anamnese (Freitext), b) die Tumorerkrankung (OSCC): Lokalisation (Seite, Dach, Vorderwand, Hinterwand), HPV-Test (DNA, p16, andere), das Stadium (der höchste cTNM-Grad), Immunkompromittierung: ja/nein (Freitext), c) die Leistungsfähigkeit: ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), Beurteilung der Aktivität, Grad 1 – 5), d) Risikofaktoren: Nikotin (Pack years), Alkohol (Standardgläser pro Tag), e) sexuelle Risikofaktoren: Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, Anzahl der Partner, Feigwarzen/Warzen (Lokalisation)]; 4) die zu erhebenden Studienparameter des Erhebungsbogens „Biomarker bei Oropharynxkarzinom, second visit/Therapie“ [a] die Therapie zur Tumorkontrolle: Operation (transoral, von außen), Radiotherapie (Gesamtdosis, Fraktionierung, Boost, etc.), Chemotherapie (Absolutdosis, gewichtsbezogene Dosis), b) Details zur Operation: Neck dissection (Art), Resektion des Tumors (laserchirurgisch, etc.), Defektdeckungen/Eingriffe zum Funktionserhalt (Lappen, Interponat), c) histopathologische Details: Der Resektionsstatus (R0/R1/R2), das extrakapsuläre Wachstum (ECS), das Stadium (höchster pTNM-Grad)]; 5) die zu erhebenden Studienparameter des Erhebungsbogens "Biomarker bei Oropharynxkarzinom, Follow-up-visit" [a] der Remissionsstatus: Komplette Remission (CR), partielle Remission (PR), stabile Erkrankung (SD), fortschreitende Erkrankung (PD), b) Nebenwirkungen nach CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events): Laborwerte, Gastrointestinaltrakt, Herz-Kreislauf, Lunge, Kehlkopf, Niere/Blase, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrinologie, Haut/Allergie, Fieber/Infektion, Allgemeinsymptome, Allgemeinzustand, c) die Nahrungsaufnahme: Perorale Ernährung (flüssig, fest), Sondennahrung, Trachealkanüle zum Schutz der Atemwege (ja/nein), PAS nach Rosenbek: Penetrations-Aspirations-Skala (1 = keine Perforation, 2 – 5 = Penetration des Larynx mit/ohne Reinigung, 6 – 8 = Aspiration mit/ohne Reinigung der Trachae)]; 6) die Patienten-Information und –Einwilligung, sowie 7) der Datenschutz (Pseudonymisierung der Daten) erörtert.

Die Kommission hat keine fachlichen Einwände gegen das geplante Vorhaben. Sie weist allerdings auf einige formale Kritikpunkte hin: 1) Auf S 2/6, Abschnitt 4, "Risiken: Der Satz "Die Entnahme der Gewebeprobe hat neben dem Operationsrisiko keine weiteren Risikofaktoren." ist missverständlich. Das Operationsrisiko ist nicht studienbedingt und sollte gestrichen werden. Die Formulierung beispielsweise: Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgt im Rahmen der notwendigen Operation und birgt keine weiteren zusätzlichen Risiken (nicht: Risikofaktoren!) ist adäquater! 2) Es fehlt ein Hinweis auf das Lösch- und Vernichtungsrecht der Daten und Proben im Falle eines Widerrufs der

Einwilligung. 3) Auf S4/6, Einwilligungserklärung, ist im ersten Satz die Rede von "...die zu prüfende Behandlungsmethode und die Vergleichsmethode...". Dies ist nicht zutreffend und muss korrigiert werden.

In der sicheren Annahme, daß die oben erwähnten Korrekturen und Ergänzungen der Patienten-Information und der Patienten-Einwilligung durchgeführt werden, stimmt die Kommission der klinisch relevanten, multizentrischen, explorativen Kooperationsstudie der Arbeitsgruppen der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und des Instituts für Pathologie sowie der Klinik für Strahlentherapie der Justus-Liebig-Universität Gießen ohne Einwände zu und wünscht den Antragstellern gutes Gelingen.



Prof. Dr. H. Tillmanns
Vorsitzender

Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Mitglieder: Frau Dr. Dr. Blüters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Bödeker (Informatik); Herr Brumhard (Pharmazie); Dr. Degehardt (Gynäkologie/Pränatalmedizin); Prof. Dr. Dr. Dettmeyer (Rechtsmedizin); Prof. Dr. Krämer (Zahnheilkunde); Prof. Dr. Kretschmer (Rechtswissenschaften); Dr. Repp (Pharmakologie); Prof. Tillmanns, Vorsitzender (Innere Med).

Vertreter: Prof. Dreyer (Pharmakologie); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Dr. Pons-Kühnemann (Informatik); Prof. Riße (Rechtsmedizin); Prof. Schmidt, (Rheumatologie), Frau Schneider (Rechtswissenschaften).

P.S.: Bitte informieren Sie die Ethik-Kommission unter Benutzung des beigefügten Formulars über den Beginn der Studie!

13. 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. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift