

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Medizin

Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde / Kopf-Hals-Tumorforschung

„Die Bedeutung humaner Papillomviren in der Kopf-Hals-Onkologie“

Habilitationsschrift in kumulativer Form
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Onkologie der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Steffen Wagner

Gießen (2024)

Bibliografische Beschreibung

Dr. rer. nat. Wagner, Steffen

Titel der Habilitationsschrift:

„Die Bedeutung humaner Papillomviren in der Kopf-Hals-Onkologie“

Habilitation am Fachbereich Medizin, Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen,

Habilitationsschrift in kumulativer Form, 2024

Seitenzahl: 180 (inklusive Anhänge und Erklärung)

Anzahl der Abbildungen*: keine (drei in Anhängen)

Anzahl der Tabellen*: keine

Anzahl der Literaturzitate*: 233

* (ohne die in Publikationen, auf denen diese Arbeit beruht)

Anzahl der kumulativen Habilitation zu Grunde liegenden Publikationen: 12

Referat:

Trotz des allgemeinen sinkenden Konsums von Tabak bleibt die Inzidenz von Kopf-Hals-Karzinomen (KHK) in Deutschland und anderen Ländern weitgehend konstant. Dies geht auf eine signifikante Zunahme HPV-assoziiierter Karzinome zurück, was inzwischen als Risikofaktor bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx (OPSCC) anerkannt ist. Unsere, sowie weitere Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass HPV-assoziierte OPSCC eine eigenständige Tumorentität sind und sich grundlegend von Noxen-assoziierten KHK unterscheiden. Virale Onkoproteine wie E6 und E7 sind neben der charakteristischen Überexpression des zellulären p16^{INK4a} an einer Reihe molekularer Veränderungen beteiligt, die in HPV-negativen OPSCC durch genetische Veränderungen ausgelöst werden. Hierzu gehören insbesondere *immun-escape* Mechanismen, wie die Reduktion der HLA Klasse I Expression oder die Induktion hemmender Liganden (z.B. PD-L1) von Immun-Checkpoint Signalwegen. Dennoch sind HPV-assoziierte OPSCC durch eine Präsenz von Immunzellen (wie NK-Zellen) charakterisiert. Viele dieser HPV-bedingten Veränderungen können diagnostisch und therapeutisch bedeutsam sein. So kann virale DNA im Blut von Tumorpatienten (*liquid biopsy*) nachgewiesen und mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert werden. Angesichts der Bedeutung von HPV in der Kopf-Hals-Onkologie und des spezifischen Mechanismus der Karzinogenese, mit vergleichsweise homogenen Veränderungen und meist mildereren klinischen Verläufen, erscheinen HPV-assoziierte OPSCC besonders geeignet für neue immunologische Therapiekonzepte.

Schlagworte:

Humanes Papillomvirus; Oropharynx; Kopf-Hals-Onkologie; Karzinogenese; Plattenepithelkarzinom; Risikofaktor; Prognose; *immune-escape*; Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 1. Einführung und wissenschaftliche Einordnung der eigenen Ergebnisse..... | 1 |
| 1.1. Kopf-Hals-Onkologie & Inzidenz HPV-assoziiertes Karzinome des Oropharynx..... | 1 |
| 1.2. Humane Papillomviren | 1 |
| 1.3. Risikofaktoren und prognostische Modelle bei Kopf-Hals-Karzinomen | 2 |
| 1.4. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx | 4 |
| 1.5. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom | 6 |
| 1.6. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom..... | 7 |
| 1.7. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom | 8 |
| 2. Diskussion | 10 |
| 2.1. Inzidenz HPV-assoziiertes Karzinome des Oropharynx | 10 |
| 2.2. Risikofaktoren und prognostische Modelle | 11 |
| 2.3. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinom des Oropharynx | 16 |
| 2.4. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom | 25 |
| 2.5. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom..... | 29 |
| 2.6. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom | 33 |
| 3. Zusammenfassende Darstellung..... | 39 |
| 4. Literaturverzeichnis..... | 41 |
| 5. Abkürzungsverzeichnis | 51 |
| 6. Dieser Arbeit zu Grunde liegende eigene Publikationen | 52 |
| 6.1. Inzidenz HPV-assoziiertes Plattenepithelkarzinom des Oropharynx..... | 52 |
| 6.2. Risikofaktoren und Prognostischen Modelle | 61 |
| 6.3. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinom des Oropharynx | 91 |
| 6.4. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom | 112 |
| 6.5. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom..... | 130 |
| 6.6. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom | 148 |
| 7. Anhänge | 176 |
| 7.1. Anhang 1: Zigarettenkonsum in Deutschland 1991 bis 2022 | 176 |
| 7.2. Anhang 2: Auswertung des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS)..... | 177 |
| 7.3. Anhang 3: Grundlagen weiterer prognostischer Modelle | 178 |
| 8. Erklärung über die eigenständige Anfertigung der Arbeit und Kenntlichmachung der benutzten Hilfsmittel bzw. Hilfen. | 180 |

1. Einführung und wissenschaftliche Einordnung der eigenen Ergebnisse

1.1. Kopf-Hals-Onkologie & Inzidenz HPV-assoziiierter Karzinome des Oropharynx

Die häufigsten Krankheitsbilder in der Kopf-Hals-Onkologie sind bösartige Neoplasien im Bereich der Mundhöhle, des Oropharynx, Larynx, der Nase und Nasennebenhöhlen, sowie des äußeren Halses. In der aktuellen Auswertung des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts für das Jahr 2018 wurden bundesweit 497.890 Krebsneuerkrankungen registriert. Hiervon entfallen 4% (n=18.740) auf den Kopf-Hals-Bereich (ICD10: C00-C14, Mundhöhle und Rachen (n=14.310); C30-C31, Nasenhöhle, Mittelohr, Nasennebenhöhle (n=1.100)) und C32, Larynx (n=3.310))^[1]. Oropharynxkarzinome bilden die größte Gruppe innerhalb der Karzinome der Mundhöhle und des Rachens und machen insgesamt 30-40% aller Kopf-Hals-Karzinome (KHK) aus. Von diesen wiederum stehen weltweit etwa 30% in kausalem Zusammenhang mit dem humanen Papillomvirus (HPV), wobei es jedoch große geografische Unterschiede gibt^[2].

Der Tabakkonsum, einer der wichtigsten Risikofaktoren für KHK, geht in den meisten westlichen Ländern stetig zurück, was für Deutschland durch Finanzdaten zur Tabaksteuer nachweisbar ist^[3] (siehe Anhang 1). Entsprechend könnte man annehmen, dass dies mit einem Inzidenzrückgang von KHK einhergehen sollte. Tatsächlich ist insgesamt jedoch nur eine geringe Änderung der Fallzahlen erkennbar. Unsere eigene Auswertung des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS) zeigt einen leichten Rückgang der Gesamtzahl an KHK, die über einen Zeitraum von 25 Jahren an unserer Klinik, dem Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Gießen (HNO-Klinik Gießen), diagnostiziert und behandelt wurden. Bezogen auf die vier oben genannten größten Sublokalisationen sank die durchschnittliche Anzahl kontinuierlich von rund 165 Fällen im Jahr 1993 auf 145 Fälle im Jahr 2018. Dieser Rückgang betrifft die Sublokalisationen Mundhöhle und Rachen (mit Ausnahme von Oropharynxkarzinome), sowie den Larynx. Dagegen zeigen die Karzinome des Oropharynx einen deutlichen Anstieg, der den Rückgang der Fallzahlen der KHK im Großen und Ganzen kompensiert (unveröffentlicht, siehe Anhang 2). In einer 2019 publizierten eigenen Arbeit konnte anhand Krebsregisterdaten, sowohl für die Vereinigten Staaten von Amerika (USA), als auch für Deutschland belegt werden, dass die Inzidenz des Oropharynxkarzinom signifikant ansteigt und diese bereits 2013 die Zahl der Zervixkarzinome in den USA überschritten hat. Für Deutschland wurde dieser Punkt anhand unserer Daten für etwa 2030/31 prognostiziert^[4]. Anhand experimenteller Daten von Tumorproben der HNO-Klinik Gießen konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser Anstieg Plattenepithelkarzinomen (*squamous cell carcinoma*, SCC) des Oropharynx (OPSCC), sowie der Tonsille betrifft und durch eine Zunahme an Fällen hervorgerufen wird, die mit HPV assoziiert sind^[4].

1.2. Humane Papillomviren

HPV gehört zu den aktuell sieben bekannten Viren, die als onkogen beim Menschen anerkannt sind. Insgesamt sind schätzungsweise 12% aller Krebserkrankungen ursächlich auf onkogene Viren zurückzuführen, viele hiervon mit mukokutanen Erscheinungsformen^[5]. Für die Entdeckung des kausalen Zusammenhangs einer HPV-Infektion mit der Entstehung von Zervixkarzinomen erhielt der deutsche Virologe Harald zur Hausen 2008 den Nobelpreis für „Physiologie oder Medizin“ (*Nobelpriset i fysiologi eller medicin*). HPV gehören zu einer

Gruppe latenter Viren der Klasse der Papovaviricetes (2020 umgruppiert aus der früheren Familie Papovaviren). Diese Klasse umfasst zwei verwandte Familien mit zirkulärer doppelsträngiger DNA: der Polyomaviridae und Papillomaviridae. Viren beider Familien infizieren verschiedene Wirbeltiere (darunter Säugetiere, Nagetiere und Vögel). HPV-Infektionen sind in der Bevölkerung weit verbreitet. Sie betreffen Epithelien von Haut und Schleimhäuten und führen zur Warzenbildung. Ausschließlich teilungsfähige Basalzellen werden von HPV infiziert. Daher ist die Zugänglichkeit der Zielzellen eine Voraussetzung für die Infektion mit HPV, z.B. nach Mikrotraumen oder an besonders dünnen Epithelien, wie sie an der Transformationszone der Zervix oder in den Tonsillenkrypten zu finden sind. Im Replikationszyklus von HPV erfolgt nach der Infektion zunächst die Expression der regulatorischen viralen Proteine E1-E7 (*early*, E). Danach erfolgt mit der Wanderung der infizierten Zellen im Rahmen des Erneuerungsprozesses der Haut, die Expression der viralen Capsid-Proteine L1 und L2 (*late*, L), gefolgt von der anschließenden Virusassemblierung und Freisetzung in den obersten Bereichen des Epithels. Bei Immunkompetenten sind HPV-Infektionen häufig asymptomatisch und verschwinden innerhalb von 1–2 Jahre spontan. Jedoch können sich persistierende Infektionen entwickeln, die (meist nach Jahren) zur malignen Entartung der infizierten Zellen führen. Dies betrifft anogenitale Bereiche wie Vulva, Vagina, Penis und Anus aber auch den Larynx und insbesondere den Oropharynx^[6]. Inzwischen ist bekannt, dass unter den aktuell mehr als 200 bekannten HPV-Typen einige als hoch-Risiko (*high risk*, HR) bezeichnete Typen Karzinome der Zervix sowie weitere humane Tumore auslösen können. Die Gruppe dieser als karzinogen eingestuften HR-Typen umfasst nach der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aktuell zwölf Typen (Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59)^[7]. Acht weitere Typen werden aufgrund begrenzter Beweise als wahrscheinlich (Typ 68) bzw. möglicherweise karzinogen (Typen 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 und 82) eingestuft, ebenso wie fünf weitere Typen (30, 34, 69, 85 und 97) aufgrund ihrer sehr engen Verwandtschaft zu karzinogenen Typen. Die als nicht karzinogen eingestuften Typen wie HPV 6 und 11 werden als niedrig-Risiko (*low risk*, LR) HPV bezeichnete. Da in dieser Arbeit ausschließlich onkologischen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich betrachtet werden, ist im Folgenden zur Vereinfachung lediglich HPV verwendet, wenn im Zusammenhang mit der Onkogenese HR-HPV Typen gemeint sind.

1.3. Risikofaktoren und prognostische Modelle bei Kopf-Hals-Karzinomen

Histologisch handelt es sich bei mehr als 90% der KHK um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC)^[8]. Zu den übrigen, selteneren Histologien gehören die aus drüsenartigem Gewebe hervorgehende Adenokarzinome (vorwiegend der Nase und Nasennebenhöhlen), sowie Sarkome (Weichteiltumoren mesenchymalen Ursprungs). Charakteristisch für Plattenepithelien ist, dass die der Basalmembran direkt anliegenden Zellen zur Regeneration des Gewebes teilungsfähig bleiben und Tochterzellen horizontal und vertikal zur Basalmembran abgeben können. Mit jeder weiteren Teilung entfernen sich hierbei vertikal abgegebene Zellen von der Basalmembran und wandern im Gewebeverbund zur Oberfläche des Epithels. Währenddessen verlieren diese Zellen ihre Teilungsfähigkeit und differenzieren sich zum verhornenden oder unverhornten Plattenepithel. Bis zu einem gewissen Grad behalten Karzinomzellen die Differenzierungsstufe ihrer Ausgangszelle bei. Dieser Differenzierungsgrad korreliert mit der Aggressivität der Krebserkrankung in sofern, dass wenig- oder undifferenzierte Neoplasien in der Regel aggressivere onkologische Eigenschaften aufweisen

als Läsion gut differenzierter Zellen. Entsprechend korreliert der Differenzierungsgrad eines Karzinoms mit der Prognose der Patienten.

Für die Entstehung von HNSCC sind sogenannte Gewohnheits- oder Lebensstilfaktoren (*habitual and lifestyle related factors*) wie dem Konsum von Tabak und Alkohol als Risikofaktoren allgemein anerkannt. Beide variieren jedoch stark zwischen den Ländern und geografischen Regionen sowie im Laufe der Zeit. In der Bevölkerung der USA sank der Anteil der Raucher beispielsweise zwischen 2005 und 2015 von 20,9% auf 15,1%^[9]. Dagegen rauchten nach einer vom Robert Koch Institut von 2008 bis 2011 durchgeführten Befragung in Deutschland immer noch 29,7% der 18- bis 79-jährigen Erwachsenen (26,9% der Frauen und 32,6% der Männer)^[10]. Weiterhin bestehen hier unter den Bundesländern erheblich Unterschiede: in Hessen ist mit 18,1% der niedrigste Anteil an Rauchern beschrieben. Im bevölkerungsreichsten Bundesland Nordrhein-Westfalen liegt der Anteil mit 30,3% etwas über dem Bundesdurchschnitt, während der Anteil in Brandenburg mit 42,6% am höchsten ist^[11]. Im europaweiten Durchschnitt liegt der Anteil der Raucher bei 23% (26% der Männer und 21% der Frauen), wobei ein ausgeprägtes Nord-Süd-Gefälle mit deutlich höherem Tabakkonsum in Südeuropa verglichen mit Skandinavien besteht^[12]. Abhängig vom Kulturkreis können weitere Lebensstilfaktoren bedeutsam sein. Beispielsweise ist das Kauen von Betel (*betel quid*: einer Zubereitung aus den Arekanüssen der Betelpalme (*Areca catechu*), anderen Bestandteilen wie gelöschtem Kalk und zum Teil auch Tabak) insbesondere in einigen Regionen Asiens verbreitet und dort mit der Entstehung von Karzinomen der Mundhöhle (*oral cavity*), des Pharynx und Ösophagus assoziiert^[13]. Weitere Risikofaktoren sind natürliche und anthropogene Umwelteinflüsse (z.B. UV- und andere natürliche / künstliche Strahlung, karzinogene (Faser-)Stäube), genetische Prädisposition (z.B. *BRCA1/2* Mutationen bei Familiärem Brust- und Ovarialkrebs), Immunsuppression und ein hohes Lebensalter. Das Alter spielt eine besondere, wenn nicht die bedeutendste Rolle für die Entstehung einer Krebserkrankung im HNO-Bereich - vor allem durch den kumulativen Effekt aller weiteren Risiken. Hiervon ist jedoch der Einfluss des Alters auf die Prognose der Patienten zu unterscheiden. Dabei ist weniger das numerische Alter an sich von Bedeutung als vielmehr die damit einhergehenden Begleiterkrankungen, die sowohl die Wahl der Therapie als auch deren Erfolgsaussichten erheblich beeinflussen.

In zwei eigenen Arbeiten wurde der Einfluss Patienten- und Tumor-spezifischer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben in konsekutiven Kohorten von Patienten mit OPSCC untersucht, die im Zeitraum zwischen 2000 und 2010^[14] bzw. zwischen 2000 und 2017^[15] an der HNO-Klinik in Gießen kurativ behandelt wurden. Zunächst konnte mit Hilfe einer rekursiven Partitionierung ein Risiko-Modell erstellt werden, in dem sich eine HPV-Assoziation der OPSCC (unabhängig vom Therapieregime) als wichtigster Prognosefaktor zeigte. Diesem nachgeordnet, wurde die Größe des Primärtumors (T-Status) in der Gruppe der HPV-assozierten OPSCC und der allgemeine Status der Leistungsfähigkeit (*Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status*, ECOG) bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC als zweitwichtigste prognostische Faktoren identifiziert^[14]. Lediglich bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC, und hier dem Lymphknotenbefall (N-Status) nachgeordnet, konnte ein signifikanter Einfluss des Alters unserer Patienten auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Die Bedeutung der allgemeinen Leistungsfähigkeit (ECOG) konnten wir in einer Studie zum HPV-Status und Risikofaktoren beim CUP (*cancer of unknown primary*)-Syndrom im Kopf-Hals-Bereich bestätigen^[16]. Hierbei wurden Patienten mit Plattenepithelkarzinom-Metastasen in zervikalen (Hals-)Lymphknoten (CUP^{HNSCC}) untersucht, bei denen trotz umfangreicher Diagnostik kein

entsprechender Primarius nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Ableitungswege der Lymphbahnen geht man bei CUP^{HNSCC} jedoch davon aus, dass diese durch ein HNSCC entstanden sind, welches entweder aufgrund der Größe unauffindbar oder im zeitlichen Verlauf untergegangen ist. In einem Risikomodell für CUP^{HNSCC} konnten die Patienten primär anhand des ECOG Status stratifiziert werden. Der HPV-Status (hier durch die Expression von p16^{INK4a} repräsentiert (siehe Abschnitt 1.4.)) war lediglich der zweitwichtigste Faktor. Aufgrund der geringeren Häufigkeit von CUP^{HNSCC} war dieser Kohorte jedoch deutlich kleiner als die der beiden Arbeiten zu OPSCC, und Patienten mit p16^{INK4a}-positivem CUP^{HNSCC} und hohem ECOG Status waren zudem selten^[16], was berücksichtigt werden sollte.

Entgegen der allgemeinen Annahme waren die Patienten mit einem HPV-assoziierten OPSCC in unseren Kohorten nicht jünger, sondern signifikant älter als Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Die multivariaten Analysen dieser Studie deuten außerdem darauf hin, dass das Alter der Patienten einen geringeren Einfluss auf ihre Prognose hat als beispielsweise der HPV- und der T-Status des OPSCC sowie der allgemeine Leistungsstatus der Patienten^[15]. Stratifiziert nach dem HPV-Status zeigt sich in unserer Kohorte von 2000 bis 2010 ein signifikant besseres 5-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC (81,1% vs. 39,7% bei HPV-negativen Fällen). Weiterhin konnten wir zeigen, dass bei fortgeschrittenen Tumorstadien primär chirurgisch behandelte Patienten ein besseres Gesamtüberleben hatten, sowohl in der Gruppe der HPV-assoziierten, als auch in den HPV-negativen OPSCC^[17]. Die Art der Behandlung wird häufig in Arbeiten zu Risikofaktoren oder prognostischen Modellen mit betrachtet. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Behandlungsart und Intensität hochgradig von der Ausprägung der Erkrankung(en) und den körperlichen Einschränkungen des Patienten abhängig ist, sie also grundsätzlich nicht als unabhängiger Faktor betrachtet werden kann.

Die Therapiestrategie für KHK ist grundsätzlich multimodal. Im angloamerikanischen Raum ist die primär radiotherapeutische Herangehensweise vorherrschend. In Deutschland und anderen europäischen Ländern dominiert dagegen ein primär chirurgischer Ansatz, wobei der überwiegende Teil der Patienten auch eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie erhält. Seit 2017 hat mit der Zulassung des ersten Checkpoint-Inhibitors (Nivolumab) für rezidierte bzw. metastasierte HNSCC ebenfalls die Immuntherapie in die HNO-Onkologie in Deutschland Einzug gefunden. Praktische Probleme bei allen Behandlungsoptionen ergeben sich aus der anatomische meist schlechten Zugänglichkeit vieler Lokalisationen, sowie aufgrund der Überschneidung der Luft- und Speisewege im Kopf-Hals-Bereich. Obwohl die Vergleichbarkeit retrospektiver Studien mit vorwiegend chirurgischen oder radiotherapeutischen Behandlungen nicht einfach gegeben ist, bestätigten weitere Risikomodellierungen, dass der HPV-Status unabhängig von der Behandlung der dominanteste Faktor für eine besonders günstige Prognose bei OPSCC ist^[18-22]. Hieraus hat sich die Erkenntnis entwickelt, dass HPV-assoziierte OPSCC eine eigenständige Subgruppe bilden, für die spezifische und ggf. deintensivierte Behandlungsstrategien diskutiert werden müssen (siehe Abschnitte 1.4. u. 2.3.).

1.4. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx

Bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC handelt es sich wie zuvor beschrieben um zwei eigenständige Tumorentitäten. Dies wurde gleichermaßen durch molekularbiologische und epidemiologische Daten bestätigt, so dass der HPV-Status 2017 in der 8. Version der AJCC/UICC-Klassifikation des TNM-Systems integriert wurde^[23]. Mit dieser Überarbeitung wurde der immunhistochemische Nachweis der Überexpression des CDK-Inhibitor 2A (*cyclin*

dependent kinase inhibitor 2A, p16^{INK4a}) als Surrogatmarker für den HPV-Status und als erster molekulare Biomarker überhaupt für die Klassifizierung von KHK eingeführt. Das p16^{INK4a} Protein wird für gewöhnlich in HPV-negativen Karzinomen selten oder gar nicht nachgewiesen. Infolge der HPV-Infektion kommt es jedoch zu einer charakteristischen und in der Regel starken Anreicherung von p16^{INK4a}, ohne dass dieses Tumorsuppressorprotein negative Einflüsse auf das Tumorwachstum zu haben scheint. Obwohl die physiologische Auswirkung auf Tumorzellen noch unklar ist, kann diese Überexpression von p16^{INK4a} als einfacher Marker zur Identifikation HPV-assoziiierter OPSCC genutzt werden. Allerdings zeigen eigene und andere Untersuchungen, dass HPV-DNA in 10-20% der OPSCC-Proben trotz einer Überexpression von p16^{INK4a} nicht nachgewiesen werden kann. Diese Patienten zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben gegenüber den Fällen, bei denen zusätzlich zu p16^{INK4a} auch HPV-DNA nachgewiesen wurde^[15]. In einer Untersuchung der Risikoprofile konnten wir zeigen, dass zweidrittel dieser Patienten ein Risikoprofil aufweisen, vergleichbar dem der Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Angesichts der wesentlich besseren Prognose und der daraus resultierenden aktuellen Diskussionen zu einer möglichen Deeskalation der Therapieintensität für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC, zeigen unsere Ergebnisse jedoch, dass p16^{INK4a} als alleiniger Marker nicht für eine sichere Identifizierung geeigneter Patienten ausreichend ist. Daher sollte der Nachweis der onkogenen Aktivität von HPV über p16^{INK4a} durch den Nachweis des Virus selbst ergänzt werden. Hierzu stehen indirekte und direkte Methoden zur Verfügung, jeweils mit individuellen Limitationen in der praktischen Anwendbarkeit, sowie der Aussagekraft der Ergebnisse. Zu den direkten Methoden zählt der elektronenmikroskopische Nachweis der charakteristischen, durch das virale Hüllprotein L1 gebildeten Capsid-Strukturen. Ebenso kann virale DNA oder mRNA durch Hybridisierung markierter Sonden (fluoreszenz-)mikroskopisch nachgewiesen werden. Der experimentelle Aufwand beider Methoden ist jedoch für diagnostische Zwecke ungeeignet. Dagegen ist der indirekte Nachweis durch PCR-Amplifizierung viraler DNA oder mRNA und deren anschließender Nachweis (z.B. durch Hybridisierung oder Sequenzierung) bereits in vielen Laboren etabliert. Der Nachweis HPV-spezifischer mRNA bietet eine zusätzliche Information über die virale Transkriptionsaktivität. Aufgrund ihrer Instabilität stellen mRNA-Tests jedoch zusätzliche Anforderungen an die Entnahme, den Transport und die Lagerung der Proben, was das Risiko falsch-negativer Tests erhöht. Wird dagegen nur HPV-DNA untersucht, kann nicht unterschieden werden, ob die DNA von infizierten Tumorzellen, einer transienten Infektion oder sogar von HPV-DNA stammt, die im Sinne einer Kontamination frei in dem Bereich vorhanden ist, in dem die Probe genommen wurde. Gegen eine oberflächliche Kontamination durch eine orale HPV-Präsenz spricht allerdings, dass wir in einer eigenen Studie zu CUP^{HNSCC} (mit steril entnommenen Proben) in 2,9 % der Fälle HPV-DNA ohne Nachweis einer p16^{INK4a}-Expression gefunden haben^[16], was nicht bedeutend weniger ist als 5,2 % in der direkt vergleichbaren OPSCC-Kohorte^[15]. Um die Kausalität von HPV im Rahmen der onkologischen Diagnose zu prüfen, erscheint daher zusammenfassend ein kombinierter Nachweis der onkogenen Aktivität anhand der Überexpression von p16^{INK4a}, in Kombination mit dem (indirekten) Nachweis der Anwesenheit viraler DNA (oder mRNA) als die am besten geeignete Strategie.

Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Nutzbarkeit von HPV als Biomarker während der Therapie und der Nachsorge von Tumorerkrankungen. Wie alle Gewebe unterliegen Tumore einem kontinuierlichen Auf- und Abbau von Zellen, beispielsweise wenn Zellen unzureichend mit Sauerstoff oder Nährstoffen versorgt werden, oder wenn sie aus anderen Gründen absterben, etwa nach einem Angriff von Immunzellen. Mit den zellulären

Abbauprodukten gelangt auch DNA in den Blutstrom. Diese zellfreie DNA (*cell free DNA*, cfDNA) ist im Blut zugänglich für extrazelluläre Desoxyribonukleasen wie DNase I, DNase IL3 und andere. Typischerweise verbleiben jedoch relativ kurze Fragmente im Blutkreislauf mit einer Halbwertszeit von 16min bis 2,5h stabil, die mit einer Größe von 160-180 Basenpaaren etwa der Windungslänge von DNA um ein Histon H1 entsprechen (oder einem Mehrfachen davon)^[24]. Der Großteil der cfDNA im Blut entstammt den physiologischen „Umbauprozessen“ gesunder Zellen. Jedoch ist bei Tumorerkrankungen ein Anteil cfDNA auf Tumorzellen zurückzuführen, der proportional zur Gesamtumorlast ist. Tumor-spezifische DNA-Sequenzen, wie somatischen Mutationen oder virale DNA im Falle HPV-assoziiierter OPSCC, können mit entsprechenden Methoden nachgewiesen und mit dem Verlauf von Therapie und Nachsorge korreliert werden. Die Gefahr eines falsch-positiven Test durch HPV-DNA im Sinne einer Kontamination kann hierbei ausgeschlossen werden, da HPV nicht lytisch ist und im natürlichen Replikationszyklus nicht in den Blutstrom gelangt. Mit der gezielten Sequenzierung (*targeted next-generation sequencing*, tNGS) stehen mehrere technische Hochdurchsatz-Lösungen zur Verfügung, mit denen Tumor-spezifische Sequenzen unter einem Überschuss an Sequenzen gesunder Zellen nachgewiesen werden können. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die relevanten Tumor-spezifischen Sequenzen zuvor bekannt sind. Zellen von Tumoren, die ursächlich durch onkogene Viren wie HPV entstanden sind und die auf die onkogene Aktivität der viralen DNA angewiesen sind, enthalten solche Tumor-spezifische (virale) Sequenzen, die in gesunden Zellen nicht vorhanden sind. Diese können im Gegensatz zu Tumor-spezifischen Mutationen auch mit vergleichsweise einfachen, PCR-basierenden Methoden nachgewiesen werden.

In einer eigenen Untersuchung an Blutproben von 50 Patienten mit OPSCC (n=30 mit HPV-assoziierten und n=20 mit HPV-negativen OPSCC) konnten wir virale DNA mit zwei HPV-spezifischen TaqMan-Assay bei 85,7% der Proben mit HPV-Assoziation vor der Therapie nachweisen. Dagegen wurde der Grenzwert für einen positiven Test lediglich bei einer Probe der HPV-negativen OPSCC (als falsch-positives Ergebnis) mit einem der beiden TaqMan-Assays überschritten. In den weiteren Untersuchungen zeigte sich eine Korrelation der Messwerte der HPV-cfDNA und der Tumorlast vor Therapie, sowie eine signifikante und dauerhafte Abnahme der HPV-cfDNA bei den Patienten ohne Hinweis auf ein Rezidiv. In fünf Patienten mit klinisch bekanntem Rezidiv blieb der Messwerte der HPV-cfDNA oberhalb der Nachweisgrenze und entwickelte sich parallel mit klinischem Verlauf der Patienten^[25]. Diese Daten zeigen, dass ein einfacher Biomarker wie HPV-DNA neben der primären Diagnose auch im Verlauf der Tumornachsorge oder während der Therapie eingesetzt werden kann, beispielsweise zur Überprüfung des individuellen Ansprechens eines Patienten in einer deeskalierten Therapie.

1.5. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom

Durch D. Hanahan und R. Weinberg wurden im Jahr 2000 biologische Kennzeichen (*hallmarks of cancer*) formuliert, die während der mehrstufigen Entwicklung einer Tumorerkrankung erworben werden: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstum-hemmenden Signale, Inaktivierung der Apoptose, Aktivierung der Angiogenese, unbegrenztes Wachstumspotential und Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung^[26]. Diese sechs ursprünglichen Kennzeichen wurden 2011 um zwei weitere Kennzeichen (deregulierter Stoffwechsel und Umgehung des Immunsystems) und zwei unterstützende

Merkmale (genetische Instabilität und Entzündungsreaktionen) ergänzt^[27]. Abgesehen von Virus-assoziierten Tumoren ist letztendlich auf molekularer Ebene die Akkumulation einer Reihe von somatischen Mutationen ausschlaggebend für den Erwerb dieser biologischen Kennzeichen und die neoplastische Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle. Diese Mutationen beeinträchtigen beispielsweise Mechanismen, die das Zellwachstum, die Zellteilung und die DNA-Reparatur regulieren. Grundsätzlich erfolgt eine Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Einige besonders grundlegende Mechanismen sind bei vielen Krebsarten in ähnlicher Weise verändert. Beispielsweise treten zentralen Veränderungen in Genen wie *TP53*, die an der Regulierung der Zellteilung und der DNA-Reparatur beteiligt sind, bei zahlreichen humanen Tumoren auf. Ebenso ist das Retinoblastoma(*RB1*)-Gen häufig betroffen, welches mit dem *Retinoblastoma-associated protein* (Rb) ein wesentliches Kontrollprotein des Zellzyklus kodiert. Manche Veränderungen treten dagegen nur bei bestimmten Krebstypen gehäuft auf, wie beispielsweise *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen, die typischerweise das Risiko für Brust- und Ovarialkrebs erhöhen.

Charakteristisch bei HPV-assoziierten Karzinomen ist, dass zwei der wesentlichen onkogenen Prozesse nicht durch somatische Mutationen ausgelöst werden. Dagegen interagieren die viralen Proteine E6 und E7 sowohl mit dem von *TP53* codierten p53, als auch mit dem Zellzyklusregulator Rb. Hierdurch wird die Zellteilung aktiviert und entsprechende Kontrollmechanismen ausgeschaltet. Es zeigte sich weiterhin, dass viele der von Hanahan und Weinberg postulierten Kennzeichen der Karzinogenese auch grundsätzlich „positiv“ auf den natürlichen Replikationszyklus von HPV wirken sollten. Durch die Interaktionen der viralen Proteine mit den zellulären Signalwegen scheinen eine Reihe der erforderlichen onkogenen Mechanismen ausgelöst zu werden, ohne dass somatische Mutationen oder andere genetische Veränderungen hierfür erforderlich wären. Entsprechend seltener sollten genetische Veränderungen bei HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negative Tumoren nachgewiesen werden. In zwei eigenen Veröffentlichungen konnten wir mit einer an HPV-angepassten tNGS Analysen zeigen, dass HPV-assoziierte OPSCC wie erwartet grundsätzlich weniger Mutationen in den untersuchten Genen aufweisen als HPV-negative OPSCC. Ebenso lagen die genannten Gene *RB1* und *TP53* bei HPV-assoziierten OPSCC seltener mutiert vor. Unter Betrachtung ob ein lokales oder entferntes Wiederauftreten (*local/distant recurrence*, LDR) des OPSCC im Verlauf auftrat, zeigten sich bei den HPV-assoziierten OPSCC von Patienten mit LDR mehr Mutationen als bei HPV-assoziierten OPSCC ohne LDR. Interessanterweise zeigen letztere jedoch eine Mutationshäufigkeit ähnlich HPV-negativer OPSCC von Patienten mit LDR. HPV-negative OPSCC von Patienten ohne LDR dagegen zeigten überraschenderweise die höchste Zahl von Mutationen. Wir vermuten daher, dass die Anzahl der Mutationen nicht kausal für das Fortschreiten der Krankheit verantwortlich ist, sondern bestimmte Kombinationen von Mutationen wichtig sein könnten^[28,29].

1.6. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Neben grundlegenden onkogenen Prozessen, wie der Inaktivierung von p53 und Rb, treten eine Reihe sekundärer Veränderungen bei HPV-assoziierten Karzinomen auf, die das Fortschreiten der Karzinogenese begünstigen. Unter anderem betrifft dies den Energiestoffwechsel von Tumorzellen, was im Rahmen zweier eigener Untersuchungen gezeigt werden konnte. Hierbei wurden HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumorzelllinien *in vitro* einer Hypoxie ausgesetzt und molekular- und zellbiologisch untersucht. Die HPV-assoziierten Zelllinien

zeigten unter normalen Sauerstoffkonzentrationen bereits nachweisbare Mengen des HIF-1 α (Hypoxie-induzierten Faktor 1 α) Proteins, was bei HPV-negativen Zelllinien nicht der Fall war. Ebenso stieg die Mengen von HIF-1 α unter Hypoxie bei den HPV-assoziierten wesentlich stärker an als bei den HPV-negativen Zelllinien. *In vitro*-Wundheilungstests zeigten nur bei den HPV-negativen Zelllinien eine Beeinträchtigung der Migration und Proliferation durch die chemische Aktivierung des HIF-1 α -Signalwegs, nicht jedoch bei HPV-positiven Zelllinien. Diese konnten bei HPV-positiven Zelllinien dagegen durch HIF-1 α -spezifische si(*small interferin*)RNA *in vitro* beeinträchtigt werden, nicht jedoch in HPV-negativen. Die Schlussfolgerung unserer Studie ist, dass HPV-positive Tumorzelllinien bereits unter normalen Sauerstoffkonzentrationen eine Aktivierung des HIF-Signalwegs und eine Anpassung an die Hochregulierung von HIF-1 α - zeigen, die den HPV-negativen Zelllinien fehlt^[30]. Diese Ergebnisse werden durch eine *in vivo* Untersuchung an Patienten mit OPSCC bestätigt, bei der wir Daten von ¹⁸F-FDG (¹⁸Fluor-Desoxyglukose) Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie (PET/CT) auswerteten. Hierbei zeigten sich bei HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC geringere Unterschiede der ausgewerteten Parameter zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen individueller Patienten^[31]. Offenbar haben bei HPV-assoziierten OPSCC äußere Faktoren wie die Sauerstoffversorgung im Gewebe einen geringeren Einfluss auf die damit verbundenen Signalwege, da diese Virus-bedingt bereits aktiviert vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass zelluläre Stoffwechselwege im Sinne der viralen Reproduktion durch HPV-Proteine in einer Art und Weise verändert werden, die auch den Prozess der Karzinogenese vorantreibt.

1.7. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Die Umgehung bzw. Überwindung des Immunsystems ist ein fundamentaler Aspekt der Karzinogenese, der zunehmend klinische Bedeutung gewinnt, insbesondere in Form neuer Behandlungsstrategien, die Immun-Checkpoints als therapeutische Zielstrukturen erfassen. HPV-assoziierte Karzinome sind in diesem Zusammenhang besonders interessant, da eine Reihe relevanter Mechanismen bei diesen Tumoren verändert vorliegen, die normalerweise im Replikationszyklus des Virus wirken und in einer onkologischen Situation potenziell therapie-relevant sein könnten.

HPV infiziert ausschließlich Epithelzellen und alle Prozesse der viralen Reproduktion finden oberhalb der Basalmembran statt, in einem Bereich, in dem außer dendritischen-(Langerhans-)Zellen und dendritischen epidermalen T-Zellen (DETCs) nur selten bzw. wenige Immunzellen vorkommen. Weiterhin sind HPV-Infektionen nicht lytisch, sondern virale Partikel werden zusammen mit den abgestorbenen Hautzellen an die Umwelt abgegeben. Das bedeutet, dass Immunzellen nicht mit den immunogenen Hüllproteinen (L1 und L2) in Kontakt kommen, da diese nicht im Körper des Wirts freigesetzt werden. Die regulatorischen Proteine von HPV sind per se nur wenig immunogen. Außerdem interagiert das virale Proteinen E5 mit der schweren Kette des HLA (*human leukocyte antigen*) Klasse I Komplex und bindet diesen im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum. Hierdurch wird die funktionelle Expression von HLA Klasse I auf der Oberfläche infizierter Zellen reduziert und vermutlich ihre Fähigkeit vermindert, immunogene Peptide zu präsentieren^[32]. Dies wird durch eine Studie bestätigt in der gezeigt wurde, dass die E5-induzierte Reduktion von HLA-A2 die Erkennung von E5-exprimierenden Zellen durch HPV-spezifische CD8+ T-Zellen reduziert^[33]. Das Fehlen einer funktionellen HLA Klasse I Expression führt normalerweise zur Aktivierung von

natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) was als *missing-self*-Hypothese bekannt ist. Im natürlichen Replikationszyklus von HPV spielt dies jedoch keine Rolle, da oberhalb der Basalmembran nur selten NK-Zellen zu finden sind. Jedoch ändert sich diese Situation, wenn HPV-infizierte Zellen neoplastisch entarten und durch die Basalmembran hindurch in mesodermale Schichten einwandern, wo NK- und andere Immunzellen häufig vorkommen. Da es dennoch bei HPV-assoziierten Karzinomen zu einem Tumorwachstum gekommen ist, müssen folglich zusätzliche Mechanismen aktiv sein, die eine effektive Zerstörung von Tumorzellen durch NK-Zellen verhindern haben. Tatsächlich fanden wir in Proben HPV-assoziiierter OPSCC signifikant höhere Zahlen CD56-positiver Lymphozyten, bei denen granuläres Granzym B und CD16 immunfluoreszenzmikroskopisch als Hinweis auf zytotoxische NK-Zellen nachgewiesen wurde^[34]. In einer weiteren Arbeit konnten wir zeigen, dass bei HPV-assoziierten OPSCC häufiger ein Verlust funktioneller HLA Klasse I Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen vorliegt, dagegen aber das Transmembranprotein PD-L1 (*programmed cell death protein 1 ligand 1*) signifikant häufiger exprimiert wird. Weiterhin konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die Anwesenheit von CD8+ T-Zellen mit der Expression von PD-L1 und dem Verlust einer funktionellen HLA Klasse I Expression korreliert und dies mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ist^[35]. Andere Arbeiten bestätigen ebenfalls eine Korrelation der Expression von PD-L1 mit einem Verlust der HLA Klasse I Expression in Tumoren^[36,37]. PD-L1 ist als Ligand des Rezeptors PD-1 (*programmed cell death protein 1*) Teil dieses Immun-Checkpoint Signalwegs. Seine Bindung an PD-1 hat inhibierende Wirkung auf den Signalweg und es wurde gezeigt, dass die PD-L1 Expression hemmend auf die Aktivität von NK-Zellen wirkt^[38,39].

Mit der Weiterentwicklung biotechnologischer Herstellungsverfahren sind immunologische Therapiekonzepte zunehmend in den Fokus der onkologischen Forschungen gerückt. Insbesondere die medikamentöse Beeinflussung von PD-1/PD-L1 und anderen Immun-Checkpoint Signalwegen hat aussichtsreiche erste Ergebnisse erbracht, und Antikörperbasierte Therapien sind bereits im klinischen Einsatz. Trotz der komplexen immunonkologischen Zusammenhänge stellen diese neuartigen Ansätze eine vielversprechende Ergänzung dar, deren Potenzial die bestehenden Therapiekonzepte in den kommenden Jahren grundlegend verändern könnte. Die bisherigen Arbeiten zeigen jedoch, dass neben einer vielversprechenden Therapie auch aussagekräftige diagnostische Verfahren erforderlich sind, um geeignete Patienten zu identifizieren, da viele Tumorerkrankungen und Patientenpopulationen weitaus heterogener sind als allgemein angenommen.

2. Diskussion

2.1. Inzidenz HPV-assoziiertes Karzinome des Oropharynx

Bereits fünf Jahre nachdem Harald zur Hausen 1976 HPV als Auslöser des Zervixkarzinom postulierte^[40] wurde HPV erstmals mit neoplastischen Läsionen im Kopf-Hals-Bereich^[41,42] und wenig später mit malignen Tumoren des Oropharynx in Verbindung gebracht^[43]. 2008 wurde ein Anstieg der Inzidenzen des HPV-assoziierten Oropharynxkarzinom in den USA anhand epidemiologischer Daten beobachtet^[44,45], was 2011 erstmalig experimentell belegt wurde^[46]. In der genannten Studie wurden jedoch lediglich n=271 OPSCC untersucht, die zwischen 1984 und 2004 in Hawaii, Iowa und Los Angeles diagnostiziert wurden. Trotz dieser heterogenen Daten wurde von den Autoren prognostiziert, dass innerhalb der nächsten 20 Jahre HPV-assoziierte OPSCC die Mehrzahl aller Kopf-Hals-Tumoren in den USA ausmachen würden. Viele der nachfolgenden Studien zeigen ähnliche Schwächen hinsichtlich der untersuchten Fallzahlen, der Konsistenz der Kohorten oder die Berechnung der Inzidenz-Trends wurden lediglich auf Basis von Studienpopulationen extrapoliert^[47-49]. Ein Anstieg der HPV-Prävalenz wurde beispielsweise auch in den Niederlanden festgestellt (1980-1989: 28%, 1990-1999: 38 % und 2000-2009: 38 %). Jedoch beruhen diese Daten nur auf zufällig ausgewählten Patienten aus den drei untersuchten Zeiträumen^[50]. In Anbetracht der zunächst nicht ganz eindeutigen Datenlage konnten wir dennoch den Anstieg der Inzidenz in einer der wenigen experimentellen Studien mit vergleichsweise hohen Fallzahlen (n=730) bestätigen^[4]. In dieser kontinuierlichen Kohorte von Patienten, die zwischen 2000 und 2017 an der HNO-Klinik in Gießen behandelt wurden, hat sich die HPV-Prävalenz beim OPSCC tatsächlich auch in unserer Region innerhalb von zehn Jahren etwa verdoppelt. Für 2017 wurde von uns für den Raum Gießen eine HPV-Prävalenz beim OPSCC von etwa 40% ermittelt - aktuellere Zahlen unserer Auswertungen sind jedoch noch höher (unveröffentlicht). Die Gesamtprävalenz HPV-assoziiertes OPSCC unserer Kohorte liegt für den Zeitraum 2000-2017 bei 27,1%, was etwa dem für 2012 geschätzten weltweiten Durchschnitt (30,8%) für den Oropharynx entspricht^[2]. Hierbei herrschen jedoch erhebliche geographische Unterschiede, mit über 40% des HPV-zurechenbaren Anteils (HPV *attributable fraction*) in vergleichsweise entwickelten Regionen wie Europa, Nordamerika, Australien, Neuseeland, Japan und der Republik Korea, gegenüber unter 20% in vielen anderen Ländern^[2]. Selbst innerhalb Europa werden stark variierende Zahlen berichtet, die meist im Norden höher als im Süden sind. In der ersten Dekade dieses Jahrhunderts wurden beispielsweise in Nord-Ost-Italien: 27%^[51], in den Niederlanden: 38%^[50], und in Ost-Dänemark: 49%^[52] berichtet. Im nachfolgenden Zeitraum (2011-2014) stieg der Anteil in Ost-Dänemark auf 62%^[52] und 2010-2011 lag der Anteil in Norwegen sogar bei 77%^[53]. Angesichts dieser Zahlen könnte der von uns für den Raum Gießen bestimmte Anteil HPV-assoziiertes OPSCC (mit etwa 40% in 2017) als realistischer Schätzwert für Deutschland angesehen werden. Allerdings zeigen alle Studien, dass regional bedeutende Unterschiede bestehen können, und dass für nationale Abschätzungen großflächigere Stichproben untersucht werden müssen.

Problematisch ist vielfach bei einem Vergleich internationaler Publikationen das Konzept zur Definition der anatomischen Zielregion: der Oropharynx ist eine eigenständige Lokalisation nach ICD10 (C10). Jedoch umfassen Karzinome des Oropharynx weitere Lokalisationen wie die Tonsillen (C09), den Zungengrund (C01), sowie Teilbereiche des Gaumens (C05.1, C05.2) und werden auch im aktuellen TNM-System entsprechend zusammengefasst^[23]. Neben der

problematischen Kodierung nach ICD10 ergeben sich praktische Probleme, z.B. im Grenzbereich oder bei Überschneidungen mehrerer Lokalisationen, wodurch ein eindeutiger Ursprung der Karzinogenese oft nicht bestimmt werden kann. Dementsprechend ist die Lokalisation des Oropharynx in der Literatur nicht immer einheitlich definiert oder eindeutig beschrieben, was die Vergleichbarkeit zwischen Studien erschwert.

Der in den ersten Studien berichtete Inzidenzanstieg HPV-assoziiertes OPSCC wurde zunächst vielfach angezweifelt mit dem Argument, dass bei retrospektiven Untersuchungen der Anteil falsch-negativer Tests aufgrund der Alterung des archivierten Probenmaterials zunimmt und der Anteil HPV-assoziiertes OPSCC in früheren Jahren somit unterrepräsentiert sei. Der zuverlässige immunhistochemische Nachweis von p16^{INK4a} und dessen hohe Korrelationsrate mit dem empfindlichen PCR-basierten HPV-DNA Nachweis spricht jedoch gegen diese Annahme. Außerdem gehört inzwischen die Untersuchung der HPV-Assoziation vielerorts zur Routinediagnostik bei OPSCC und die so prospektiv gewonnenen Ergebnisse belegen zweifelsfrei den Inzidenzanstieg. Die Gründe dafür sind jedoch bei weitem nicht vollständig verstanden. Da HPV-Infektionen zu den häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen gehören, könnten Veränderungen der Sexualpraktiken in Verbindung mit dem Inzidenzanstieg stehen. Beim Zervixkarzinom werden 10 bis über 30 Jahre für die Zeitspanne geschätzt, die zwischen der Entstehung einer hochgradigen Dysplasie und einem daraus hervorgehenden invasiven, HPV-assoziierten Tumor vergeht. Entsprechende Zahlen für persistierende HPV-Infektionen im Kopf-Hals-Bereich fehlen. Jedoch deutet das mittlere Alter der Patienten von etwa 60 Jahren auf eine vergleichbare Zeitspanne hin. Dieser lange Zeitraum zwischen der Infektion und einer Krebserkrankung erklärt die Schwierigkeiten entsprechender repräsentativer Studien, mit denen die Gründe des Inzidenzanstieges aufgeklärt werden könnten, oder welchen Einfluss die HPV-Vakzinierung haben könnte. Zweifelsfrei schützen die beiden derzeit in Deutschland zugelassenen HPV-Impfstoffe zu fast 100% vor einer Infektion mit den erfassten HPV-Typen und letztendlich auch vor den entsprechenden HPV-assoziierten Tumorerkrankungen. Allerdings wird die Impfung erst seit Juni 2018 auch für Jungen in Deutschland empfohlen. Seit der Erstzulassung eines Impfstoffs 2006 haben mehrere Länder HPV-Impfprogramme für Mädchen und Frauen eingeführt. Beispielsweise gibt es in Australien seit 2007 ein Programm in Schulen für Mädchen (im Alter von 12-13 Jahren), das 2013 auch auf Jungen im gleichen Alter ausgeweitet wurde. Eine Metaanalyse von 60 Millionen Personen mit bis zu 8 Jahren Nachbeobachtung zeigt bereits überzeugende Belege für erhebliche positive Auswirkung von HPV-Impfprogrammen auf Infektionsraten und die Entwicklung von CIN2+ (cervikale intraepitheliale Neoplasien, Schweregrad 2+) Krebsvorstufe am Gebärmutterhals, sowie auf die Diagnose von Anogenitalwarzen. Allerdings zeigt die Studie auch eine größere direkte Wirkung und Herdeneffekte bei Programmen mit Multikohorten-Impfung und hoher Durchimpfungsrate^[54]. Demgegenüber lag 2015 die Quote der vollständigen Impfungen gegen HPV bei 15-jährigen in Deutschland mit 31.3% „auf niedrigem Niveau“^[55] und es bleibt fraglich ob dies in absehbarer Zeit zu sinkenden Inzidenzen HPV-assoziiertes OPSCC in Deutschland führen wird.

2.2. Risikofaktoren und prognostische Modelle

Die Gründe für die Entstehung einer individuellen Krebserkrankung sind aufgrund der Überlagerung von Einflüssen und der Dauer des Prozesses für gewöhnlich nicht eindeutig bestimmbar. Aufgrund wissenschaftlicher Arbeiten konnten inzwischen diverse Faktoren

identifiziert werden, die das Risiko einer Krebserkrankung erhöhen. Je nach Entität können einzelne Risikofaktoren oder unterschiedliche Kombinationen mehr oder weniger bedeutsam sein. Auch können für bestimmte Krebserkrankungen protektive Faktoren beschrieben werden, die das Krebsrisiko im Vergleich zur Bezugspopulation herabsetzen (z.B. der Konsum von Obst, Gemüse, Ballaststoffen, Kaffee und teils auch Milch und Milchprodukten^[56]). Risikofaktoren fallen in der Regel unter eine der folgenden Gruppen: Umwelteinflüsse, Verhaltensmuster (*behaviorale dispositionen*) oder demographische / genetische Dispositionen. Durch den kumulativen Effekt aller Risiken spielt das ansteigende Lebensalter eine der bedeutendsten Rollen für die Entstehung einer Krebserkrankung. Jedoch trifft dies nicht auf Krebserkrankungen zu, die mit jungem Lebensalter assoziiert sind wie das Neuroblastom, Retinoblastom, Rhabdomyosarkom oder Wilms-Tumor.

Für KHK sind die wichtigsten Risikofaktoren hohes Alter, männliches Geschlecht, sowie Nikotin- und Alkoholkonsum. Bei einigen Sublokalisationen spielen bestimmten Faktoren eine besondere Rolle wie beispielsweise die Exposition mit UV-Strahlung bei Karzinomen der Lippe oder das Kauen von Betel beim Mundhöhlen-, Pharynx- und Ösophaguskarzinom. Ein Risikofaktor kann jedoch in der Regel nicht konkret als Ursache oder kausal mit der Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht werden. Ebenfalls besteht meist keine klassische Dosis-Wirkung Beziehung. Vielmehr erhöht das Vorhandensein eines Risikofaktors lediglich das individuelle Risiko für eine Krebserkrankung. Ein typisches Beispiel hierfür ist das Rauchen von Tabak. Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung und der Dauer und Menge des Rauchens. Der Begriff des „*pack years*“ steht hierbei für das Rauchen einer Packung (à 20) Zigaretten an jedem Tag eines Jahres und beschreibt diesen Risikofaktor quantitativ. Prinzipiell kann jedoch kein sicheres Maß für den Tabakkonsum bestimmt werden und der negative Einfluss entfällt auch nicht instantan mit dem Beenden des Rauchens. Lediglich das individuelle Risiko nimmt als Funktion der Zeit exponentiell ab. In einer neueren Metaanalyse wurde gezeigt, dass sich das Restrisiko für Lungenkrebs bei ehemaligen Rauchern erst nach 40 Jahre Abstinenz auf den Ausgangswert normalisiert^[57]. Entgegen dem wissenschaftlichen Konsens werden die Folgen des Rauchens in der Bevölkerung jedoch immer noch häufig ignoriert oder verharmlost, etwa durch das Anführen einzelner Beispiele starker Raucher mit hohem Lebensalter (wie z.B. der „Altbundeskanzler“ Helmut Schmidt).

Wie beim Rauchen sind die Auswirkungen vieler Risikofaktoren mannigfaltig und können sowohl kurzfristig als auch langanhaltend sein. In der Regel akkumulieren die Wirkungen einzelner Faktoren additiv über die Zeit. Jedoch können auch synergistische Effekte bestehen, indem sich einzelne Faktoren in ihrer Summe verstärken, wie dies beim Rauchen in Kombination mit Alkoholkonsum der Fall ist. Eine gängige Annahme hierbei ist, dass Alkohol als organisches Lösungsmittel den Eintrag von schwer wasserlöslichen kanzerogenen Substanzen aus dem Tabakrauch verstärk^[58]. Neueren Daten zufolge gewinnt jedoch Acetaldehyd zunehmend an Bedeutung. Acetaldehyd ist ein Abbauprodukt von Ethanol und wird hauptsächlich in der Leber gebildet, wo es zu Acetat umgewandelt wird. Acetaldehyd induziert verschiedene Formen von DNA-Schäden, die zur Krebsentwicklung führen. Beim Genuss von Alkohol entsteht auch im oberen Verdauungstrakt in nicht unerheblichem Maße Acetaldehyd (im Wesentlichen durch mikrobielle Abbauprozesse) und ist im Speichel bereits kurz nach der Alkoholaufnahme nachweisbar. Weiterhin ist Acetaldehyd in Tabakrauch vorhanden, aus dem es sich ebenfalls im Speichel löst. Rauchen und Alkoholkonsum zusammen führen zu einem bis zu siebenfachen Anstieg des Acetaldehyds im Speichel im Vergleich zum Alkoholkonsum

allein^[59]. Dies könnte die synergistische Wirkung beider Faktoren erklären, die über den lokalen Einfluss der einzelnen Karzinogene hinausgeht.

In vielen westlichen Ländern wie den USA^[9] ist der Tabakkonsum kontinuierlich rückläufig. Auch in Deutschland ist nach Daten der Steuereinnahmen die Gesamtmenge verkaufter (und besteufter) Zigaretten seit einem Höchststand 2002 bis heute um etwa 55% zurückgegangen^[3] (siehe Anhang 1). Demgegenüber stehen insgesamt weitgehend konstante Fallzahlen von KHK und sogar ansteigende Inzidenzen beim Oropharynxkarzinom, sowohl in Deutschland^[4], als auch in den USA^[46]. Inzwischen belegen diverse Studien, dass dies auf eine Zunahme von HPV-assoziierten Fällen zurückzuführen ist^[44-50,52]. Im Gegensatz zu anderen Risikofaktoren kann bei diesen Fällen mit einer großen Sicherheit von einem kausalen Zusammenhang einer früheren HPV-Infektion und der Entstehung eines HPV-getriebenen OPSCC ausgegangen werden. Ein wichtiges Argument hierfür ist, dass sich die Risikoprofile der Patienten deutlich unterscheiden: Insbesondere ist bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC Tabak und Alkoholkonsum signifikant geringer ausgeprägt als bei Patienten mit HPV-negativen Tumoren und in der Regel haben diese Patienten auch weniger Komorbiditäten^[14,15,18-22,60-62]. Letzteres wird in entsprechenden Publikationen häufig damit erklärt, dass Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC auch ein niedrigeres Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnose haben als Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Unsere eigenen Daten bestätigen dies jedoch nicht und auch in der Literatur finden sich zunehmend Hinweise, dass das Patientenalter im Bezug zum HPV-Status auch von geographischen Faktoren abhängig sein könnte. So zeigte sich in einer 2019 veröffentlichten epidemiologischen Studie, dass die unimodale Altersverteilung der Patienten mit HPV-positivem OPSCC in den USA ihren Höhepunkt im Alter von 60-64 Jahren hat^[63]. Dies ist vergleichbar mit dem Durchschnittsalter von 62,4 Jahren dieser Patienten in unserer Studie^[15] und nicht jünger als das der Patienten mit HPV-negativem OPSCC. Weiterhin verläuft die Karzinogenese bei HPV-assoziierten OPSCC mit einer früher einsetzenden und/oder stärker ausgeprägten lymphogenen Metastasierung. Der initiale Grund für die Suche nach einem KHK ist hier häufig eine Schwellung von zervikalen Lymphknoten und seltener als bei HPV-negativen Tumoren ein konkreter Verdacht im Mund-/Rachenraum. Dennoch ist das Therapieansprechen und die Prognose der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC wesentlich besser. Unter anderem weisen genetische Untersuchungen darauf hin, dass zelluläre Signalwege (insbesondere der p53- und Rb-Signalweg), die für die Wirksamkeit der Radio- und Chemotherapie wichtig sind, bei HPV-assoziierten OPSCC im Gegensatz zu Mutations-bedingten Karzinomen nicht irreversibel inaktiviert sind. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Mechanismen der Karzinogenese hin und *in vitro* Experimente legen nahe, dass die onkogene Aktivität der viralen Proteine E6 und E7 für diese Tumore essenziell ist^[64-68].

Entscheidend für einen kausalen Zusammenhang einer früheren HPV-Infektion und der Entstehung eines HPV-getriebenen OPSCC ist jedoch der natürliche Replikationszyklus von HPV, der kein lytisches Stadium aufweist. Da reproduktive HPV-Infektionen den Stratifizierungsprozess der oberen Schichten von Haut- oder Schleimhäuten benötigen, werden keine viralen Partikel in untere Schichten oder in das Blut abgegeben. Das bedeutet, dass die Aufnahme von HPV-DNA in eine Krebszelle nicht "nachträglich", unterhalb der Basallamina infolge einer Infektion an einer anderen Körperstelle erfolgen kann. Vielmehr ist die Aufnahme viraler DNA in eine gesunde Basalzelle einer der ersten Schritte in der Karzinogenese dieser Epithelzelle.

Trotz unterschiedlicher Entstehungsprozesse ist bei allen Krebsarten die Summe aller Risikofaktoren ausschlaggebend für die Wahrscheinlichkeit, ob ein Ereignis oder eine Entwicklung in der Karzinogenese eintritt oder nicht. Aufgrund der Komplexität der Onkologie kann ein individuelles Risiko letztlich nur mit Hilfe von epidemiologischen Daten abgeschätzt werden. Die systematische Erhebung und Speicherung relevanter Daten im Rahmen von Krebsregistern ist jedoch nicht in allen Ländern gleichgut organisiert. Das 1942 gegründete dänische Krebsregister gilt als erstes nationales Register und ist bis heute kontinuierlich aktiv. Dagegen trat in Deutschland erst 2013 das Bundeskrebsregisterdatengesetz (BKRG) in Kraft, nach dem durch die Bundesländer klinische Krebsregister flächendeckend einzurichten sind. Zuvor wurden Daten lediglich in einzelnen Bundesländern systematisch erfasst. Wenn auch inzwischen die Vollständigkeit der Erkrankungsmeldungen in den Landeskrebsregistern als sehr hoch angesehen werden kann, so fehlt bisher in Deutschland oftmals die Datengrundlage um longitudinale Entwicklungen untersuchen zu können. Gleichsam können neue Erkenntnisse wie bislang unbekannte Risikofaktoren oder neue Biomarker nur nach und nach in die Register aufgenommen werden, so dass der potenzielle Nutzen von Registerdaten für eine individuelle Risikoabschätzung bisher nicht umfassend ausgeschöpft werden kann. Der größere Nutzen der Daten liegt derzeit in der Erstellung von prognostischen Modellen, in denen die Patienten anhand von Faktoren wie dem Alter, Geschlecht, persönliche und familiäre Krankheitsgeschichte, Lebensstil und andere in Risikogruppen eingeteilt werden. Risikogruppen können rein informativ verwendet werden, z.B. um die Heilungschancen des Patienten oder die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Krankheit zu beschreiben. Allerdings kann auch eine Risikogruppe von Patienten mit den potenziellen Behandlungsmöglichkeiten in Verbindung gebracht werden.

Nomogramme gehören zu den frühesten Methoden, um komplexe Zusammenhänge zwischen mehreren Faktoren zu erfassen und z.B. die Prognose multifaktoriell abzuschätzen. Informationen zu den Grundlagen der Methode sind in Anhang 3 näher beschrieben. Im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Christian Kraus haben wir das Nomogramm als Software-Anwendung zur Vorhersage des 5- und 10-Jahres-Gesamtüberlebens bei Parotiskarzinomen verwendet. Neben den Variablen für das TNM-Stadium und dem Alter wurde hierbei die histologische Klassifizierung der Tumore eingeschlossen. Es zeigte sich interessanterweise anhand der Skalen dieses Parameters, dass die Histologie des Adenoid-zystisches Karzinoms den geringsten und die des Plattenepithelkarzinoms den höchsten Beitrag zum Risiko von Patienten ausmacht. Die Histologien Azinuszell-, Adeno und Mukoepidermoidkarzinom leisten dagegen lediglich einen miteinander vergleichbaren mittleren Beitrag zum Gesamtmodell. Die Punktzahl, die in diesem Nomogramm über die Histologie erreicht werden kann, entspricht hierbei der Punktzahl, die für das T-Stadium erreicht werden kann. Somit können neben dem individuellen Risiko mit einem Nomogramm indirekt auch Aussagen über die Bedeutung einzelner Faktoren im Vergleich zu Anderen gemacht werden.

Zum konkreten Vergleich der Bedeutung verschiedener Faktoren haben sich jedoch eigene statistische Methoden etabliert. Unter diesen ist die 1972 vorgestellte multivariate Cox Regression^[69] (*Cox proportional hazards model*) am gebräuchlichsten zur Modellierung von zeitbasierten Informationen, wie der Überlebenszeit oder dem Eintreten eines Krankheitsbezogenen Ereignissen. Unter der Annahme, dass die Faktoren bzw. Kovariaten im Modell multiplikativ mit dem Risiko verbunden sind, kann der Einfluss der unabhängigen Variablen als Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Ereignissen in Bezug auf alle Fälle geschätzt werden. Dieser Einfluss wird als Hazardrate (englisch *hazard ratio*, kurz: HR) angegeben und

beschreibt das Risiko des Eintretens des untersuchten Ereignisses im Vergleich zu einem als gleich angenommenen Basiswert. Hieraus lässt sich die Wahrscheinlichkeit ermitteln, mit der das Ereignis (z.B. Tod des Patienten oder Wiederauftreten der Erkrankung) zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. In unseren Arbeiten konnten wir mit Hilfe der multivariaten Cox Regression zeigen, dass unter allen Faktoren, die univariat einen bedeutsamen Einfluss zeigten, lediglich der HPV-Status, das T-Stadium, Komorbiditäten, sowie das Alter bei Diagnose als unabhängige Einflussfaktoren auf das Überleben von Patienten mit OPSCC angesehen werden können. Mit einer 3,2-fachen Verringerung des Sterberisikos im Vergleich zu HPV-negativem OPSCC wurde ein positiver HPV-Status als der stärkste Einflussfaktor auf das Überleben der Patienten bestätigt^[15]. Im Gegensatz zur Erwartung und den Ergebnissen anderer Studien^[18] zeigte sich hierbei für die Faktoren Tabak- und Alkoholkonsum, dass diese nicht als unabhängige Einflussfaktoren auf das Überleben von Patienten angesehen werden können - höchstwahrscheinlich weil beide Faktoren invers mit dem HPV-Status verbunden sind. In einer weiteren Studie konnten wir ebenso bestätigen, dass Tabak- und Alkoholkonsum für die Überlebensvorhersage bei den von uns untersuchten Patienten weniger bedeutsam waren^[14]. Allerdings ist die Häufigkeit der Raucher in unserer Studienpopulation und besonders bei HPV-negativen OPSCC, wie auch allgemein in Deutschland, höher als in anderen Studien^[18]. Dies könnte einen Überlagerungseffekt der Faktoren in der Cox Regression hervorgerufen haben und die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Jedoch haben auch andere Studien gezeigt, dass HPV-Positivität bei OPSCC unabhängig vom Rauchen ein wichtiger prognostischer Faktor ist^[70]. In einer HPV-stratifizierten Untersuchung konnten wir in der Kohorte mit HPV-assoziierten OPSCC lediglich jüngeres Alter als unabhängigen Einflussfaktor in der multivariate Cox Regression identifizieren. Dagegen waren in der Kohorte der HPV-negativen Fälle weiterhin Alter, Komorbidität, N-Stadium und Therapieform als unabhängige Einflussfaktoren bestimmbar^[17]. Interessanterweise spielt das Alter der Patienten bei Diagnosestellung in unseren Untersuchungen zur Prognose bei OPSCC^[14,15] (und auch bei CUP^{HNSCC}^[16]) eine geringere Rolle als angenommen. Dies ist überraschend, da in der Regel mit zunehmendem Alter die Anzahl und der Schweregrad der Begleiterkrankungen zunehmen und der allgemeine Leistungsstatus abnimmt. Dies sollte sich sowohl auf die Wahl der Behandlung als auch auf den Therapieerfolg auswirken^[71]. Es scheint, dass der allgemeine Leistungsstatus wichtiger ist als das physische Alter des Patienten. Daher wurde bereits vorgeschlagen, dass nicht nur das chronologische, sondern auch das biologische Alter und der allgemeine Leistungsstatus (und wahrscheinlich weitere Faktoren) bei der Wahl der optimalen Therapie in der onkologischen Versorgung berücksichtigt werden sollten ^[72-74].

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse, dass unterschiedliche Kombinationen von Risikofaktoren bei HPV-bedingten und HPV-negativen OPSCC eine Rolle spielen und dass letztlich beide als eigenständige Krankheitsformen angesehen werden müssen. Im gewissem Rahmen gilt dies ebenfalls für CUP^{HNSCC}, was sich daran zeigt, dass auch hier p16^{INK4a} als Marker in die 8. Auflage des *AJCC Cancer Staging Manual*^[23] aufgenommen wurde und da man davon ausgeht, dass unauffindbare HNSCC für CUP^{HNSCC} ursächlich sind.

Die digitalen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte haben die Erstellung von Statistiken und Risikomodellen erheblich erleichtert, so dass es heute viele unterschiedliche Methoden gibt, mit denen das Risiko verschiedener Personengruppen beschrieben werden kann. Mit Hilfe der rekursiven Partitionierung (*recursive partitioning analysis*, RPA) konnten wir die bisherigen Ergebnisse bestätigen und zeigen, dass der HPV-Status den größten Einfluss hat, um Patienten mit OPSCC in Bezug auf ihr Überleben zu klassifizieren. In absteigender

Reihenfolge folgt auf diesen Faktor das T-Stadium, auf gleicher Ebene mit der Komorbidität und nachgeordnet das N-Stadium, sowie das Alter der Patienten. Während mit Hilfe der multivariaten Cox Regression der Einfluss eines Faktors auf das zeitabhängige Eintreten eines Ereignisses (*time-to-event analysis*) in Relation zu weiteren beteiligten Faktoren untersucht werden kann, findet die RPA meist Anwendung in der Klassifizierung von Kohorten. Nähere Informationen zu den Grundlagen der RPA, sowie der nachfolgend beschriebenen Hauptkomponentenanalyse sind in Anhang 3 beschrieben.

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) ist eine weitere multivariate Methode, um die wichtigsten Aspekte von mehrdimensionalen Datensätzen zu erfassen. Mit Hilfe der PCA konnten wir an unserer OPSCC Kohorte aus 2010 bis 2017 bestätigen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Korrelation des Nachweis von HPV₁₆-DNA und der Expression von p16^{INK4a} besteht, und dass diese negativ mit dem Rauchen und dem Konsum von Alkohol korreliert sind^[15]. Die genannten Faktoren fanden sich annähernd perfekt entlang der ersten Hauptkomponente der PCA angeordnet. Dies kann insofern interpretiert werden, dass Faktoren, die allgemein den HPV-Status von OPSCC beschreiben, für den größten Teil der Varianz im Datensatz verantwortlich sind und entsprechend diese ersten Hauptkomponente ausmachen. Senkrecht hierzu fanden sich die Variablen des T- und N-Stadiums und des allgemeinen Leistungszustands (ECOG) entlang der zweiten Hauptkomponente orientiert^[15]. Dies bedeutet einerseits, dass diese Faktoren weniger Bedeutend für die Varianz der Daten sind als der HPV-Status, und andererseits, dass eine Korrelation mit dem HPV-Status unwahrscheinlich ist. Insgesamt passt diese hier beobachtete Anordnung der Faktoren sehr gut zu den bisher veröffentlichten Risikomodellen für OPSCC^[14,18,21] in der Hinsicht, dass der HPV-Status bei OPSCC der wichtigste Einflussfaktor ist, gefolgt von ECOG und dem T- und N-Stadium. In den Risikomodellen stehen Rauchen und Alkoholkonsum oft nicht an den wichtigsten Positionen der Modelle, möglicherweise, weil ihre Assoziation mit dem HPV-Status ihren eigenen Einfluss überdeckt, was auch durch die Ergebnisse unserer PCA bestätigt wird.

Grundsätzlich kann man sagen, dass es nicht „die eine“ statistische Methode oder Herangehensweise für eine bestimmte biologische/medizinische Fragestellung gibt. Vielmehr eignen sich bestimmte Methoden mehr oder weniger gut, um komplexe Zusammenhänge zu umschreiben. Dennoch bestätigen alle bisher veröffentlichten Arbeiten, darunter auch unsere eigenen Daten, dass es sich beim OPSCC um (mindestens) zwei Entitäten handelt, die Anhand des HPV-Status der Tumore unterschieden werden können. Die Patienten zeichnen sich durch andersgeartete Risikoprofile aus und die Prognose der Erkrankungen unterscheidet sich signifikant. Auch wenn hier noch weiterer Forschungsbedarf besteht, ist davon auszugehen, dass neben der aktuellen Tumorklassifikation nach TNM/UICC weitere molekulare bzw. tumorspezifische Merkmale und individuelle Risikofaktoren in die Klassifikation der Patienten einfließen müssen. Dies erfordert die Weiterentwicklung von diagnostischen Methoden, mit denen sich Untergruppen sowohl im Rahmen klinischer Studien als auch für künftige angepasste Therapieansätze möglichst eindeutig definieren lassen.

2.3. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinom des Oropharynx

Die Keratinisierung ist das wichtigste der klassisch histologisch/morphologischen Merkmale zur Differenzierung von Plattenepithelkarzinomen. Es bezeichnet den Prozess der Umwandlung bzw. Reifung lebender Epithelzellen, ausgehend von tiefliegenden Stammzellen des

Stratum basale (Basalzellschicht) hin zu toten Korneozyten, welche die obere Hornschicht der Haut aber auch Haare und Nägel ausmachen. Hierbei wird das Cytoplasma umgebildet, die Zellkerne aufgelöst und in zunehmenden Maße die namensgebenden, faserartige Keratinproteine gebildet. Der Differenzierungsprozess in Plattenepithelien ist durch die Expression einer Reihe von Keratinproteinen gekennzeichnet. Diese werden auch als Cytokeratine (CK) bezeichnet und gehören zu den Intermediärfilamentproteinen (IF), der größten Familie der Zytoskelettproteine. Die Expression einzelner IF hängt vom biologischen Kontext ab und ist spezifisch für bestimmte Zelltypen, die Art des Gewebes und dessen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien (zusammengefasst in ^[75]). Ein Gewebe-typisches Expressionsmuster von CK wird in gewissem Rahmen während der malignen Transformation von den resultierenden Tumorzellen beibehalten und kann somit als Marker für Plattenepithelkarzinome verwendet werden. Jedoch sind Veränderungen im Expressionsmuster dieser Strukturproteine auch kennzeichnend für die Tumorprogression. So steht die Expression der hochmolekularen CK-8 und CK-18 mit dem Grad der Dysplasie von Tumorvorläuferläsionen und einer ungünstigen Prognose für Patienten mit HNSCC in Verbindung^[76,77]. Während in Epithelien Zell-Zell-Kontakte und die Integrität des Zytoskellets in Bezug auf Polarität und die Gewebearchitektur hauptsächlich durch die CK bestimmt wird, fehlen entsprechende Anforderungen weitgehend in mesenchymalen Zellen. Hier erfolgt die Stabilisierung des Zytoplasmas und eine mechanische Verbindung mit der extrazellulären Matrix über ein zytoplasmatisches Netzwerk aus Vimentin, das von der Zellmembran bis zur Kernmembran reicht. Vimentin wird von Epithelzellen normalerweise nicht gebildet. Während des Prozess der Metastasierung erfolgt jedoch ein Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften in ursprünglich epithelialen Tumorzellen, was durch die Expression von Vimentin gekennzeichnet ist. Parallel gehen epitheliale Marker verloren, weshalb dieser Prozess als epitheliale-mesenchymale Transition (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) bezeichnet wird. Physiologisch ist das EMT Programm in der embryonalen Entwicklung und während der Wundheilung wichtig, jedoch fördert seine Aktivierung in Krebszellen die Invasivität, sowie die Ausbildung bestimmter Eigenschaften von Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs; zusammengefasst in ^[78]).

Der histopathologische Differenzierungsgrad charakterisiert das Ausmaß, in dem die neoplastisch transformierten Zellen Merkmale der natürlichen Differenzierung des Gewebes aufweisen. Entsprechend der WHO-Klassifikation für KHK wird dieser Grad in ansteigenden Kategorien von G1 bis G4 angegeben. G1 entspricht hierbei dem niedrigsten Malignitätsgrad, bei dem Tumorzellen eine gute Differenzierung aufweisen, also hier den Plattenepithelzellen noch weitgehend ähneln. Der höchste Malignitätsgrad weist die geringste Differenzierung auf und entspricht somit morphologisch den Stammzellen der Basalzellschicht. Invers zur abnehmenden Differenzierung verläuft also ein zunehmender Malignitätsgrad, was mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert ist. Interessanterweise trifft dies jedoch nicht auf eine Gruppe von OPSCC zu, die durch eine „atypische, nicht-keratinisierende (basaloide) Differenzierung“ gekennzeichnet ist^[79-81]. Inzwischen ist bekannt, dass ein Großteil dieser Karzinome kausal mit HPV assoziiert ist und die zugrundeliegenden Mechanismen der Karzinogenese, i.d.R. in Kombination mit einem günstigeren Risikoprofil, für die bemerkenswert bessere Prognose dieser Patienten verantwortlich ist. In der Praxis zeigen sich jedoch häufig fließende Übergänge und/oder Kombinationen der vier histologischen Grade innerhalb eines Präparates, sodass allein anhand der Differenzierung, und besonders bei Lokalisationen im Grenzbereich oder außerhalb des Oropharynx, keine individuelle Zuordnung in Bezug zum HPV-Status gemacht werden kann. Insgesamt korreliert jedoch im Oropharynx

der HPV-Status weitgehend mit einer schlechten histologischen Differenzierung und mit einer guten Prognose der Patienten. Dies steht im Gegensatz zu anderen KHK und erklärt die vergleichsweise schlechte prognostische Aussagekraft der histopathologischen Differenzierungsgrade bei HNSCC^[82-84].

Tumorsuppressorproteine wie Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, p53, sowie Onkoproteine der Cyclin-Familie, der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR und die Ras-Proteine spielen ebenfalls eine Rolle bei KHK. Viele dieser Proteine sind allerdings von grundlegender Bedeutung für die Onkogenese, so dass aberrante Expressionsmuster ebenfalls bei anderen Tumorentitäten auftreten. Als spezifische diagnostische Marker für KHK können diese Marker daher nur eingeschränkt Anwendung finden. Jedoch ist ihre Beteiligung in der Karzinogenese für potentielle therapeutische Interventionen relevant. Beispielsweise ist EGFR bei 80-90% der HNSCC überexprimiert und mit schlechtem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben assoziiert^[85,86]. Inzwischen sind monoklonale Antikörper die an EGFR binden, wie „Cetuximab“, eine von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Strategie zur Hemmung von EGFR-abhängigen Signalwegen bei HNSCC.

Wie bei anderen Krebserkrankungen ist auch bei KHK das Konzept der Tumorstammzellen (CSC) von Bedeutung. Hierbei wird von normalen adulten Stamm- oder Vorläuferzellen ausgegangen, die nach einer onkogenen Transformation zu CSC werden. Durch Zellteilungen gehen aus diesen CSCs weitere Krebszellen hervor, die jedoch nicht über die vollständigen Eigenschaften wie die Selbsterneuerung und Pluripotenz der CSCs verfügen. Eine Reihe von Biomarkern sind für CSCs beschrieben, wobei CD44^[87,88] (ein Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure und Matrix-Metalloproteasen), CD133^[89] (ein transmembranes Glykoprotein mit potenzieller Rolle in Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose) und ALDH1^[88,90,91] (ein intrazelluläres Enzym beteiligt im Retinolstoffwechsel) die für KHK am umfassendsten validierten CSC-Marker sind. In zwei unserer eigenen Arbeiten konnten wir einen negativen prognostischen Einfluss ALDH1-positiver CSCs bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem, metastasiertem HNSCC^[90] und einer Anreicherung dieser Zellen in Lymphknotenmetastasen bei OPSCC unabhängig von HPV^[91] nachweisen. Allgemein sind CSC vergleichsweise selten, es bestehen allerdings große Unterschiede zwischen verschiedenen Tumortypen. Hierbei variiert der Gehalt an CSC zwischen 0,02% und 25%, wobei typischerweise höhere Häufigkeiten in Leukämien und Lymphomen (sowie in Mausmodellen) als bei soliden Tumoren berichtet werden (zusammengefasst in ^[92,93]). Aufgrund dieser heterogenen und teilweise auch sehr geringen Häufigkeit sind CSC-Marker bislang von untergeordneter diagnostischer Bedeutung im Sinne klassischer immunhistologischer Untersuchungen. Im Gegensatz dazu, insbesondere durch die Fortschritte der Sequenzierungstechniken, werden somatische Mutationen bei CSC interessant für eine prognostische Beurteilung. Hieraus könnten sich ebenso potenzielle Zielstrukturen für spezifische Therapieansätze ergeben, sowie für neue Konzepte in der Nachsorge von Tumorpatienten (siehe auch Seite 23, *liquid biopsy*).

Seit den Pionierarbeiten von Harald zur Hausen (1974) gilt HPV als kausal für die Onkogenese und inzwischen als etablierter Risikofaktor bei mehreren Tumorentitäten. Infolgedessen wurde HPV von der IARC 2007 offiziell als onkogen für diese Entitäten eingestuft^[94]. Wie bereits beschrieben, unterscheidet sich die kausal mit HPV-assoziierte und die Noxen-assoziierte Karzinogenese grundlegend: die Interaktionen der viralen Proteine E6 und E7, sowohl mit p53 als auch mit Rb, lösen die wesentlichen onkogenen Prozesse aus, wogegen dies bei Noxen-assoziierten Karzinomen durch eine Reihe somatischer Mutationen bedingt ist. Hieraus ergeben sich markante Unterschiede in den Mutationsprofilen, was im nachfolgenden

Abschnitt genauer behandelt wird. In diesem Zusammenhang steht auch das als „Wächter des Genoms“ bezeichnete p53. Es gilt als wichtigstes humanes Tumorsuppressorprotein und somatische Mutationen im kodierenden *TP53* sind die am häufigsten beschriebenen genetischen Veränderungen in unterschiedlichen Tumortypen^[95,96], darunter auch HNSCC. Aufgrund zweier Promotoren von *TP53*, alternativem mRNA-spleißen und internen Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) existieren multiple Isoformen von p53 mit unterschiedlichen Funktionen, deren Aktivitäten durch posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Methylierung, Neddylierung, Glykosylierung und Sumoylierung reguliert werden^[97]. Diese enorme Variabilität ermöglicht die zentrale Beteiligung von p53 an diversen Signalwegen - die wichtigsten hiervon sind Zellzyklus-Arrest, Seneszenz, DNA-Reparatur und Apoptose. Aber auch Signalwege in Verbindung mit oxidativem Stress, Autophagie und dem Metabolismus werden unter Beteiligung von p53 reguliert. Naheliegende ist daher auch eine zentrale Bedeutung von p53 an der Onkogenese. In der Tat liegen in mehr als 50% aller Tumore somatische Mutationen in *TP53* vor und die übrigen weisen i.d.R. Inaktivierungen von p53-nachgeordneten Signalwegen auf^[98]. Mutationen können die Funktion von p53 in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Neben *loss-of-function* (LOF) Mutation treten sowohl *dominant-negative* (DN) als auch *gain-of-function* (GOF) Mutationen auf, wogegen p53-verkürzende Mutationen (*truncations*) selten sind. Immunhistologisch lässt sich in vielen Tumoren eine Überexpression von p53 nachweisen, was 1979 zunächst zu einer Einstufung als Onkogen bei der ersten Beschreibung von *TP53* führte^[99,100]. Die beobachtete Überexpression beruht jedoch auf der Akkumulation von Mutations-bedingt inaktiviertem p53 und ist zurückzuführen auf zelluläre Kompensationsmechanismen, die eine gesteigerte Expression von *TP53* bewirken. Weitere Mutationen kommen z.B. in Proteinen wie MDM2 vor, was sich stabilisierend auf mutiertes p53 auswirkt^[101,102]. Daher kann in vielen Tumorzellen eine stark erhöhte Menge an p53 nachgewiesen werden, was bei gesunden Zellen nicht der Fall ist, und somit zur Differenzierung entarteter Zellen bzw. Zellverbänden genutzt werden kann.

Ähnlich zum histopathologischen Differenzierungsgrad fallen HPV-getriebene Karzinome auch in Bezug auf p53 im Vergleich zu Noxen-assoziierten Karzinomen auf, da hier p53 vergleichsweise selten oder gar nicht überexprimiert wird. Inzwischen haben genetische Untersuchungen bestätigt, dass *TP53* entsprechend selten mutiert vorliegt (siehe Abschnitt 2.4.). Grund hierfür ist eine Interaktion des viralen Onkoprotein E6 mit der zellulären Ubiquitin-Protein Ligase E3A, wodurch letztendlich p53 ubiquitiniert und für den Abbau im 26S-Proteasom markiert wird. E3A wird daher auch als „*Human papillomavirus E6-associated protein*“ oder „*oncogenic protein-associated protein E6-AP*“ bezeichnet. Mit der Degradation von p53 entfällt dessen Tumor-suppressive Wirkung, insbesondere aufgrund der fehlenden Aktivierung des durch DNA-Schäden ausgelösten Zellzyklus-Arrest, der Seneszenz, sowie DNA-Reparatur und Apoptose. Daneben bestehen diverse weitere Interaktion zwischen E6 und zellulären Proteinen, unter anderen mit NFX1, einem Inhibitor der humanen Telomerase (hTERT)^[103,104]. Die Aktivierung von hTERT, bzw. deren ausbleibende Inhibition, ist ein Kennzeichen der onkogenen Transformation und Voraussetzung für die unbegrenzte Zellteilung. Insgesamt führt die Aktivität von E6 zur Verminderung oder Aufhebung von Zellzyklus-Kontrollmechanismen, nicht jedoch zu dessen Voranschreiten und Induktion der Zellteilung. Für diesen weiteren Kernpunkt der onkogenen Transformation sorgt das virale E7 Onkoprotein, welches die Dissoziation von E2F Transkriptionsfaktoren (E2F1 bis E2F5) aus einem Komplex mit Rb induziert. Vereinfacht wird durch diese Freisetzung von E2F der Zellzyklus eingeleitet indem der Zellzyklus-Kontrollpunkt zwischen der G₀- und der S-Phase

überwunden wird. Früheren Annahmen zufolge führt die Aktivierung von E2F2 zur Expression des *CDKN2A* Gens, welches das Tumorsuppressorprotein p16^{INK4a} kodiert. In vielen Tumoren liegen inaktivierende Mutationen in *CDKN2A* vor, da die Expression von p16^{INK4a} hemmend auf die Proliferation wirkt. Dies ist jedoch in HPV-positiven Tumorzellen nicht der Fall, trotz dass hier große Mengen des unveränderten (Wildtyp) von p16^{INK4a} gebildet werden. p16^{INK4a} interagiert mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, wodurch die Cyclin D abhängige Phosphorylierung von Rb gehemmt wird. Entsprechend hypophosphoryliertes Rb bindet E2F, wodurch wiederum der Zellzyklus gehemmt wird. Da jedoch in HPV-infizierten Tumorzellen durch E7 die Freisetzung von E2F aus diesem Komplex erfolgt, läuft die Tumorsupprimierende Aktivität von p16^{INK4a} sozusagen ins Leere, obwohl die Aktivität der viralen Onkogene selbst eine starke Expression des *CDKN2A* Gens auslöst. Es wurde jedoch ebenfalls gezeigt, dass E7 eine direkte Aktivierung der zellulären Seneszenz bewirkt. Hierdurch wird die für das Histon H3K27 spezifische Lysin-Demethylase 6B (KDM6B), und mit ihr die Expression ihrer Downstream-Zielgene wie *CDKN2A* ausgelöst, was zur Überexpression von p16^{INK4a} in HPV-getriebenen Tumoren führt^[105]. Einige Studien deuten auch darauf hin, dass diese Überexpression von p16^{INK4a} per se die Proliferation von Tumorzellen im Rahmen der HPV-getriebenen Karzinogenese fördert^[105,106] und erste Studien zeigen, dass p16^{INK4a} selbst unabhängig von HPV als Onkoprotein wirken kann^[107], was jedoch noch nicht abschließend diskutiert wurde.

Die häufige Inaktivierung des *CDKN2A* Gens in HPV-negativen und die Überexpression von p16^{INK4a} in HPV-positiven Tumorzellen ist ein spezifisches molekulares Unterscheidungsmerkmal dieser beiden grundsätzlich verschiedenen Mechanismen der Karzinogenese. Daher gilt der immunhistochemische Nachweis der Überexpression von p16^{INK4a} (in der überwiegenden Zahl der Tumorzellen) als Surrogatmarker der „klassisch“ HPV-getriebenen Karzinogenese. Dies führte schließlich zur Novellierung der Klassifikation von OPSCC, bei der erstmals in der 8. Auflage des *AJCC Cancer Staging Manual* von 2017 zwischen p16^{INK4a}-negativen und -positiven OPSCC unterschieden wird^[23]. Interessanterweise wird hierbei auf einen zwingenden Nachweis von HPV selbst (in Form von DNA oder RNA) verzichtet und weitere Sublokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches (abgesehen von zervikale Karzinometastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP^{HNSCC})) wurden nicht in diese neue Klassifizierung einbezogen. Dies spiegelt die relative gute Korrelation der Expression von p16^{INK4a} mit dem Vorhandensein von HPV im Oropharynx wider, die jedoch in anderen Sublokalisationen nicht gegeben ist. In der Tat tritt in gesundem Gewebe, aber auch in einem kleineren Prozentsatz in Tumoren eine Überexpression von p16^{INK4a} auf, ohne dass HPV kausal daran beteiligt ist^[108-115]. Eigene Arbeiten zeigen, dass dies auch bei etwa 5,5% der OPSCC^[15,116] und 13,6% der CUP^{HNSCC}^[16] der Fall ist, ohne dass die Gründe hierfür bisher verstanden sind. Die physiologische Expression von p16^{INK4a} äußert sich in einem „fleckigen“ oder „diffusen“ Expressionsmuster einzelner, oder kleinerer Bereiche von Zellen, die im Gegensatz zu p16^{INK4a}-positiven Tumorzellen in der Regel immunhistochemisch nicht besonders stark angefärbt sind. Dieses Muster wird als „fokal“ bezeichnet und steht im Zusammenhang mit der physiologischen Rolle von p16^{INK4a} als zentralem Vermittler der zellulären Seneszenz. Diese Funktion ist jedoch mit einem irreversiblen Stillstand des Zellzyklus und einem Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen verbunden^[117,118], die normalerweise nicht mit einer onkogenen Transformation vereinbar ist. Im Kontext einer HPV-Assoziation konnte jedoch in einer eigenen Studie gezeigt werden, dass die starke und den Tumor großflächig (diffuse Expression) ausfüllende Expression von p16^{INK4a} mit einer simultanen Expression von Ki67 verbunden ist^[116]. Der Proliferationsmarker Ki67 wird in seneszenten Zellen normalerweise nicht gebildet, so dass eine simultane Expression von

Ki67 und p16^{INK4a} transformierte Zellen spezifisch anzeigt. Entsprechende ist daher nur das fokale Expressionsmuster von p16^{INK4a} kennzeichnend für seneszente Zellen und dagegen eine großflächige Überexpression mit der HPV-bedingten Karzinogenese assoziiert^[119].

Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC sprechen insgesamt besser auf eine Behandlung an und weisen eine wesentlich bessere Prognose auf als Patienten mit HPV-negativen OPSCC^[18]. Daher ist die Bestimmung des HPV-Status von klinischer Relevanz, was die Klassifizierung der Erkrankung, sowie die Planung ihrer Behandlung angeht. Entsprechend wird derzeit diskutiert und in diversen klinischen Studien für OPSCC geprüft, ob bei Fällen mit guter Prognose die Behandlungsintensität deeskaliert werden kann, um die funktionellen Ergebnisse zu verbessern^[120,121]. Auf der anderen Seite wird ebenfalls darüber nachgedacht, ob die Intensität der Therapie für bestimmte Gruppen erhöht werden sollte, um das Überleben der Patienten mit schlechter Prognose zu verbessern. Die theoretischen Grundlagen und die prognostische Bedeutung einer HPV-getriebenen Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich sind hinreichend und spätestens seit der Aktualisierung des *AJCC Cancer Staging Manual*^[23] 2017 bekannt (siehe Abschnitt 1.4.). Nichtsdestotrotz bestehen weiterhin Herausforderungen bei der diagnostischen Bestimmung des HPV-Status, die sich aus den methodischen Anforderungen und den praktischen Gegebenheiten im klinischen Ablauf ergeben. Der Nachweis von HPV in einer Tumorprobe kann entweder „direkt“ über mikroskopische Techniken erfolgen, oder indirekt nach einer PCR-Amplifikation des viralen Erbguts und dessen anschließenden Nachweis, z.B. mit Hilfe der Sequenzierung oder Hybridisierungstechniken. Direkte Nachweise werden meist nur in der Forschung angewendet, da sie aufgrund ihres technischen Aufwands i.d.R. zu zeit- und kostenintensiv sind, um in der klinischen Routine nutzbar zu sein. Dagegen bergen indirekte Techniken aufgrund der extrem hohen Empfindlichkeit PCR-basierender Methoden und der ubiquitären Verbreitung von HPV eine gewisse Unsicherheit, insbesondere eine Anfälligkeit gegenüber falsch-positiven Testergebnissen. Interessanterweise lag der Anteil dieser potenziell falsch-positiven Ergebnisse (HPV-DNA positiv bei Negativität für p16^{INK4a}) in einer eigenen Studie zum CUP^{HNSCC} mit 2,9%^[16] etwas geringer gegenüber 5,2% bei dem direkt vergleichbaren OPSCC-Kollektiv^[15]. Dies könnte dafürsprechen, dass eine Kontamination durch eine oberflächliche orale Präsenz von HPV bei den steril entnommenen CUP^{HNSCC} seltener ist. Allerdings sind die Fallzahlen der Studie zum CUP^{HNSCC} und die Unterschiede zu OPSCC relativ gering, um dies mit Sicherheit sagen zu können. Wenn man andererseits davon ausgeht, dass positive HPV-DNA Testergebnisse bei einem negativen Ergebnis für p16^{INK4a} ausschließlich auf einer Kontamination beruhen würden, ist es bemerkenswert, dass diese Fälle überhaupt auftreten. Zu beachten ist jedoch, dass in der Karzinogenese viele Prozesse parallel ablaufen. Bei einzelnen (untypischen) Fällen, deren Karzinome initial durch HPV ausgelöst wurden, könnten es zu einem bestimmten Punkt der Karzinogenese zu Selektionsprozessen gekommen sein, wodurch die charakteristische Expression von p16^{INK4a} verloren gegangen sein könnte. Bei der Mehrzahl der „klassischen“ HPV-positiven Karzinome ist die Überexpression von p16^{INK4a} jedoch spezifisch und kausal mit der onkogenen Aktivität von HPV assoziiert. Der immunhistochemische Nachweis dieses zellulären Markers ist daher eine geeignete Lösung, die auch für den klinischen Ablauf und mit einfachen Techniken in vielen Laboren praktikabel ist. Das *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) und die *Union for International Cancer Control* (UICC) haben daher den Nachweis von p16^{INK4a} als bevorzugten Test für die TNM Klassifizierung (8. Auflage) von HPV-vermittelten und HPV-negativen Tumorerkrankungen im Oropharynx anerkannt^[23]. Nichtsdestotrotz stimmt in der Praxis der Nachweis von p16^{INK4a} in bis zu 20% der Fälle nicht

überein mit dem Nachweis von HPV-DNA oder -RNA in den entsprechenden Tumorproben^[122,123]. In einer eigenen Studie an OPSCC von 709 Patienten konnten wir eine Diskrepanz von insgesamt 11% feststellen, wobei beide Varianten (HPV-Nachweis ohne p16^{INK4a} Expression und p16^{INK4a} Positivität in Abwesenheit von HPV) zu etwa gleichen Teilen auftraten^[15]. Verglichen mit anderen Studien, in denen der Anteil dieser Fälle mit diskordanter HPV-Diagnostik meist zwischen 5% und etwa 22% angegeben wird^[122-126], liegt der Wert aus unserer Studie im mittleren Bereich. Indessen wurde kürzlich ein Wert von 9,2% für eine Gesamtkohorte von 7654 Fällen in einer internationalen Kooperation mit unserer Beteiligung bestätigt (3,8% p16^{INK4a}-negativ, aber HPV-positiv und 5,4% p16^{INK4a}-positiv, aber HPV-negativ)^[62].

Die Diskrepanz zwischen dem HPV- und p16^{INK4a}-Status könnte neben einer biologischen Ursache auch durch technisch/methodische Probleme verursacht sein. Einerseits kann nicht exakt die gleiche Probe für beide Untersuchungen verwendet werden, weil diese für die Extraktion der DNA oder RNA „verbraucht“ wird. Im ungünstigsten Falle könnten somit in beiden Tests Bereiche mit und ohne HPV-assoziierten Tumorzellen untersucht werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Alterung der Proben bei retrospektiven Untersuchungen, oder Unterschiede der Empfindlichkeit und Nachweisreagenzien von Reagenzien (Antikörper, Primer etc.) Einfluss auf die Ergebnisse haben. Gegen ein Problem mit gealterten Proben spricht, dass die Diskrepanz auch bei Kohorten beobachtet wird, bei denen die Analysen im Rahmen der klinischen Diagnostik prospektiv durchgeführt wurden. Bei Verwendung entsprechend validierter Antikörper und Reagenzien können technische Probleme in diesem Bezug ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden.

Für eine biologische Ursache spricht, dass die Diskrepanz zwischen dem HPV- und p16^{INK4a}-Status bei Kohorten aus dem Oropharynx konsistent gering ist, jedoch bei Proben außerhalb des Oropharynx eine hohe Inkonsistenz berichtet wird^[127-129], bis hin zum gänzlichen Fehlen eines Nachweis von HPV-DNA bei p16^{INK4a}-positiven oralen Plattenepithelkarzinomen^[130]. Dieses für bestimmte Sublokalisationen an KHK spezifische Muster deutet darauf hin, dass es sich kaum um technische Probleme der Analyse handeln dürfte, da sowohl die Probennahme, ihre Aufarbeitung und Untersuchung unabhängig von den Sublokalisationen weitgehend vergleichbar sein sollte. Möglicherweise hat die biologische Aktivität von HPV in anderen Sublokalisationen eine andere Auswirkung als die der klassischen Überexpression von p16^{INK4a} bei HPV-assoziierten OPSCC. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Überexpression von p16^{INK4a} auf andere, bisher unbekannte HPV-Typen oder gänzlich andere Pathogene zurückzuführen ist, die mit den heutigen Testmethoden bisher nicht erfasst wurden. Ebenso könnten Gewebe-spezifische Prozesse der Differenzierung oder deregulierte Signalwege eine Rolle spielen, bei denen eine Überexpression von p16^{INK4a} indirekt Tumorzellen Vorteile bringt, obwohl die primäre Funktion von p16^{INK4a} als Aktivator der Seneszenz hinderlich sein sollte. Hierfür sprechen die bereits genannten Studien, die eine Proliferations-fördernde Wirkung in HPV-assoziierten Tumorzellen^[105,106] oder sogar eine HPV-unabhängige onkogene Aktivität von p16^{INK4a} zeigen^[107].

Ferner ist unklar, inwieweit diagnostische Antikörper zwischen der Wildtyp und (allen) potenziell dominant negativ wirkenden Varianten von p16^{INK4a} unterscheiden können. Ein „p16^{INK4a}-Signal“ könnte entsprechend in Abhängigkeit vom jeweiligen Kontext, mit unterschiedlichen biologischen Bedeutungen assoziiert sein. Eine der wahrscheinlichsten Erklärungen könnte jedoch im biologischen Prozess der Karzinogenese liegen, der sowohl

zeitlich als auch räumlich uneinheitlich verläuft. In den über Jahre andauernden Selektionsprozessen können sich Zellpopulationen herausbilden, bei denen onkogene Ereignisse unterschiedliche Bedeutungen und Ausprägungen haben können (z.B. *driver* und *passenger* Mutationen). Die klonale Zusammensetzung dieser heterogenen Zellpopulationen beeinflusst die Tumorevolution, insbesondere im Kontext einer Therapie, und somit auch die Prognose der Patienten^[131-133]. Dies wird durch die unterschiedliche Prognose von Patienten mit nicht übereinstimmender HPV- und p16^{INK4a}-Analyse in unseren Daten^[15] und anderen Veröffentlichungen^[134] veranschaulicht, die im Allgemeinen zwischen der guten Prognose der doppelt positiven und der schlechten Prognose der doppelt negativen Fälle liegt. In der Praxis ist dieser Prozess weder kontrollier- noch nachvollziehbar, da eine unüberschaubare und sich überlagernde Zahl äußerer Faktoren, insbesondere des Lebensstiles der Patienten von Relevanz ist. In Summe führt vermutlich der Prozess der Tumorevolution in Kombination mit äußeren Faktoren dazu, dass sich Tumore etablieren können, die nicht mehr in allen biologischen Eigenschaften mit ihrem jeweiligen „Tumor-Prototyp“ (ausgehend vom Ursprungsgewebe und den zugrundeliegenden onkogenen Prozessen wie Virus- oder Noxen-induzierter Karzinogenese) übereinstimmen. Hinweise hierauf konnten wir nach einer *Principal Component Analysis* (PCA) an unseren eigenen Daten zeigen: anhand der Auswertung von Patienten- und Tumorspezifischer Risikofaktoren konnte die Gruppe der OPSCC mit Überexpression von p16^{INK4a} aber fehlendem Nachweis von HPV-DNA in Gruppen mit niedrigem und hohem Risiko eingeteilt werden. Das bessere bzw. schlechte Gesamtüberleben dieser Gruppen unterschied sich dann nicht mehr von dem der Fälle mit doppelt positiven bzw. negativen Nachweisen^[15].

Im Zusammenhang mit diagnostischen Markern bei OPSCC oder bei Tumorerkrankungen allgemein ist insbesondere die *liquid biopsy* zu erwähnen, wobei es sich hierbei genauer genommen nicht um einen Marker handelt, sondern um einen methodischen Ansatz, mit dessen Hilfe Tumor-Marker in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Im Kopf-Hals Bereich bezieht sich die *liquid biopsy* meist auf Blut- oder Speichelproben, worin CTCs, zellfreie DNA oder exosomale miRNAs von Tumorzellen nachgewiesen werden können. Die „wenig“ oder „gering“ invasive *liquid biopsy* ist eine Alternative zur Entnahme von Gewebeproben und kann zur Früherkennung einer Tumorerkrankung und in der Nachsorge eingesetzt werden^[135,136]. Aber auch relativ kurzfristige Veränderungen spezifischer Marker in der *liquid biopsy* während der Therapie können genutzt werden, um das Ansprechen auf die Behandlung zu überwachen und diese ggf. direkt anzupassen. Von besonderer Bedeutung ist dies im Zusammenhang mit einer deeskalierten Therapie, wie sie aktuell für OPSCC diskutiert wird. Hierdurch können Patienten frühzeitig identifiziert werden, für die dieses Konzept ungeeignet ist.

Als Marker in der *liquid biopsy* können theoretisch alle Molekülklassen dienen, die spezifisch für eine Tumorerkrankung sind, vor allem aber genetische Veränderungen (siehe Abschnitt 2.4.), oder die Tumorzellen selbst in Form von CTCs. CTCs können aus Blutproben mit Hilfe ihrer physikalischen Eigenschaften (z.B. Zellgröße), der Expression von Biomarkern oder anderer funktioneller Merkmale angereichert bzw. isoliert werden. Inzwischen gibt es eine Reihe methodischer Ansätzen zur Isolierung von CTCs und auch zu deren Bedeutung bei KHK (zusammengefasst in ^[137]). In der Regel erfolgt nach einer Anreicherung der kernhaltigen Zellen aus peripheren Blut (PBMCs) mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation eine positive Selektion von CTCs auf Grundlage von Antikörpern gegen Tumor-spezifische Oberflächenmarker wie beispielsweise EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*). Alternativ können mit entsprechenden Antikörpern auch Immunzellen aus einer Probe angereichert

werden. Nachteilig für die Nutzung von CTCs ist in gewisser Weise die Spezifität der Antigen-Antikörper Bindung, da die Oberflächenmarker von Tumorzellen Veränderungen unterliegen können und somit Zellpopulationen potenziell unerfasst bleiben könnten. Zusätzlich zu dem relativen methodischen Aufwand der Isolierung von CTCs, müssen diese anschließend, z.B. durch Genotypisierung charakterisiert werden. Mit dem CellSearch® System (Veridex, Huntington Valley, PA 19006, USA) ist jedoch inzwischen ein erster CTC-Test als Surrogatmarker für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben bei einigen Krebsarten wie Brust, Prostata- und Darmkrebs von der FDA zugelassen worden^[137,138].

Die kosteneffektive Weiterentwicklung und hohe Empfindlichkeit heutiger *next-generation* Sequenzierungstechniken (NGS) eröffnen Alternativen zur Untersuchung von CTCs in *liquid biopsies*, in dem vom Tumor ausgehende DNA oder RNA mehr oder weniger direkt in der Probe nachgewiesen werden kann. Hier können entweder gezielte (*targeted*, tNGS) oder ungezielt (*untargeted*) Herangehensweisen gewählt werden. Mit Hilfe des tNGS können bekannte Einzelnukleotid-Veränderungen in Genabschnitten (begrenzten Umfangs) mit erhöhtem Mutationspotential (Hotspots) nachgewiesen werden, wie beispielsweise in *BRAF*, *KRAS* und *EGFR*. Einzelne Mutationen oder Hotspots sind teilweise spezifisch für bestimmte Tumorentitäten, wogegen sehr bedeutsame Mutationen wie in *TP53* allgemein universell auftreten. Nachteilig bei tNGS ist, dass die zu untersuchenden Gene/Hotspots zuvor bekannt sein müssen. Dagegen können mit ungezielten NGS Methoden wie dem *whole exome* (WES) oder *whole genome sequencing* (WGS), neben bisher unbekannte Mutationen auch andere genetische Veränderungen wie größere Insertionen und Deletionen, sowie aberrante Methylierungsmuster erfasst werden. Durch Kombinationen unterschiedlicher NGS-Techniken hat sich inzwischen eine Reihe hochempfindlicher Methoden zur Untersuchung von *liquid biopsies* entwickelt, von denen viele das Potenzial einer künftigen klinischen Anwendung haben (zusammengefasst in ^[139]). Dem vergleichsweise geringen methodischen Aufwand NGS basierter Methoden stehen allerdings die nicht unerheblichen Anforderungen an die Verarbeitung der Daten gegenüber, die zum größten Teil nur noch von speziell geschultem Personal mit bioinformatischen Kenntnissen zu bewältigen ist.

Gemeinsam ist allen in Kombination mit der *liquid biopsy* anwendbaren Methoden, dass spezifische Marker für Tumorzellen in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können, was alleine aufgrund der geringen Invasivität vorteilhaft gegenüber der klassischen Biopsie ist. Weiterhin sorgt ein „Mischungs-Effekt“ dafür, dass bei einer *liquid biopsy* praktisch keine Gefahr besteht, die Probe „an einer falschen Stelle“ zu entnehmen und es ist weitgehend problemlos möglich einen zeitlichen Verlauf durch sequenzielle Proben zu untersuchen. Die Arbeiten anderer und unsere eigenen Ergebnisse zum Nachweis von HPV-DNA in *liquid biopsies*^[25] sind in sofern ein Sonderfall, da mit der HPV-DNA ein bekannter und vergleichsweise stabiler Tumormarker vorliegt, der auch ohne NGS für diagnostische Zwecke und in der Nachsorge eine Rolle spielen kann. Letztendlich kann dies als eine Art *proof of concept* für Tumortypen gesehen werden, bei denen genetische Veränderungen die wesentliche Rolle spielen. Die methodischen Fortschritte der *droplet digital PCR* (ddPCR) bietet eine weitere Möglichkeit, mit der in Kombination mit NGS-basierten Daten in naher Zukunft *liquid biopsies* in der routinemäßigen Nachsorge von Tumorpatienten effizient analysiert werden könnten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings nicht hinreichend geklärt, wie groß beispielsweise das Volumen einer *liquid biopsy* sein sollte bzw. welche Grenzwerte für eine Bewertung verwendet werden sollten, da einerseits die Sensitivität mit dem Probenvolumen ansteigt, jedoch damit ebenfalls die Invasivität der Probennahme zusammenhängt.

In Zusammenfassung sind diagnostische Marker von immenser Bedeutung für die Klassifizierung einer Tumorerkrankung in Bezug auf eine Prognoseabschätzung, aber auch für die Planung der Therapiemodalitäten und für die Tumornachsorge. Klassische Marker wie die der Gewearchitektur und Differenzierung werden zunehmend durch neue(re) Analysemethoden (wie p16^{INK4a} Immunhistochemie oder HPV-DNA Testung) und „automatisierbare“ Abläufe (z.B. NGS) ergänzt. Der Zugewinn an Erkenntnissen zur Tumorevolution und der beteiligten Regulationsmechanismen macht deutlich, dass die Klassifizierung von Tumoren in Zukunft weitaus diverser sein wird als es bisher der Fall ist - vermutlich bis hin zu spezifischen Mustern bzw. „individuellen Signaturen“ einzelner Tumore, oder therapeutisch relevanter Subpopulationen von Tumorzellen. Die Kombination aus NGS und der *liquid biopsy* eröffnet vielversprechende neue Möglichkeiten, was sowohl die Planung und Verlaufskontrolle der Therapie, als auch die Nachsorge der Tumorerkrankung betrifft.

2.4. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom

Abgesehen von der Virus-induzierten Karzinogenese sind für die neoplastische Transformation einer gesunden Zelle im Allgemeinen somatischen Mutationen ausschlaggebend. Diese werden im karzinogenen Entwicklungsprozess erworben und mit jeder Zellteilung weitergegeben. Selektionsprozesse führen letztendlich zur Akkumulation maligner Eigenschaften von Zellklonen, bis hin zu vollständig unkontrolliert wachsenden Tumorzellen. Zu erwähnen ist, dass neben den „klassischen“ genetischen auch zunehmend epigenetische Veränderungen an Bedeutung gewinnen, allen voran die Dysregulierung der DNA-Methylierung. Diese grundsätzlich reversiblen Veränderungen können beispielsweise Tumorsuppressoren deaktivieren oder die Expression von Onkogenen aktivieren und in unterschiedlichem Maße beitragen zur Entwicklung von Krankheiten, einschließlich Krebs. Inzwischen ist klar, dass sich genetische und epigenetische Veränderungen gegenseitig beeinflussen und bei der Onkogenese zusammenwirken. So wurde in WES-Studien gezeigt, dass häufige und wiederkehrende somatische Mutationen in Mediatoren der DNA-Methylierung, bzw. allgemein in Genen die das Epigenom kontrollieren, einer dysregulierten DNA-Methylierung zugrunde liegen^[140,141].

Zu unterscheiden sind somatische Mutationen von Keimbahnmutationen (gametischen / konstitutiven Mutationen). Letztere entstehen i.d.R. als Fehler bei der Meiose und betreffen folglich keine einzelnen Zellen bzw. Zellpopulationen, sondern alle Zellen eines Individuums. Daher sind Keimbahnmutationen im Zusammenhang mit der zuvor behandelten *liquid biopsy* ungeeignet, um als Marker im Rahmen der routinemäßigen Nachsorge für den individuellen Krankheitsverlauf zu dienen. Keimbahnmutationen können eine erbliche Erkrankung bedingen, in Kombination mit zusätzlich erworbenen somatischen Mutationen jedoch auch kausal mit Krebserkrankungen in Zusammenhang stehen.

Herausragende Arbeiten der letzten Jahre zum Verständnis von KHK basieren auf umfangreichen genetischen, aber inzwischen auch weitergehenden Untersuchungen im Rahmen des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) Programms des US-amerikanischen *National Cancer Institute* (NCI). Seit Beginn des Programms (2006) liegen in dieser öffentlich zugänglichen Datenbank genetische und molekulare Informationen zu mehr als 20.000 Primärtumoren (gepaart mit entsprechendem gesundem Kontrollgewebe) aus 33 Typen von Krebserkrankungen vor. Klinische Daten sowie diverse Software-Lösungen ergänzen inzwischen die Datenbank und unterstützen die Nutzer bei ihrer Auswertung und der graphischen Darstellung

der Ergebnisse. Entsprechend zahlreich wurden inzwischen Publikationen mit Daten aus TCGA ergänzt oder beruhen gänzlich auf ihnen.

Unter erstmaliger Berücksichtigung des HPV-Status wurden 2011 durch Stransky *et al.*^[142] und Agrawal *et al.*^[143] die ersten bahnbrechenden Arbeiten über WES Daten von 74 bzw. 32 Primärtumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich publiziert. 2013 (Lechner *et al.*^[144]) und 2015 (Seiwert *et al.*^[145]) folgten zwei weitere Publikationen, in denen bekannte *hot-spot* Mutationen mit Hilfe von tNGS untersucht wurden, bevor ebenfalls 2015 die erste umfassende genomische Charakterisierung von HNSCC mit Hilfe der TCGA Datenbank publiziert wurde^[146]. Das in diesen ersten Veröffentlichungen beschriebene Mutationsmuster bei HNSCC ist inzwischen durch etliche weitere Arbeiten grundsätzlich bestätigt worden. Wie bei vielen anderen Tumoren erfolgt in der Regel eine Aktivierung von Onkogenen, sowie eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgen. Abgesehen von Mutationen können auch Amplifikationen (z.B. die des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*EGFR*)) oder homo- und heterozygote Deletionen (z.B. von *CDKN2A*), sowie epigenetische Veränderungen in gleicher Weise zur Onkogenese beitragen. Der Einfachheit halber wird im Folgenden „genetische Veränderungen“ verwendet, sofern nicht eine bestimmte Art von Veränderung gemeint ist.

Am häufigsten bei HNSCC sind Veränderungen in *TP53*, dessen Genprodukt(e) an einer Reihe von Kontrollmechanismen der Zellteilung und der Initiierung der DNA-Reparatur beteiligt sind (siehe Abschnitt 2.3., Seite 19). Diese Kontrollmechanismen verhindern die Teilung normaler Zellen, sofern irreparable Schäden im Erbgut vorliegen bzw. solange deren Reparatur noch unvollständig ist. Wäre dies nicht der Fall, würden sich Schäden im Erbgut der Tochterzellen manifestieren oder eine fehlerhaft verlaufende DNA-Replikation weitere, größere Schäden hervorrufen. Da diese Kontrollmechanismen der „Weiterentwicklung“ von Tumorzellen in der onkogenen Entwicklung entgegenstehen ist naheliegend, dass Veränderungen in den Komponenten dieser Signalwege gehäuft auftreten. Allerdings kann häufig nicht klar unterschieden werden, ob entsprechende Veränderungen der Grund oder die Folge der onkogenen Entwicklung sind. Auch das *RB1*-Gen ist häufig von genetischen Veränderungen betroffen. Im Gegensatz zu *TP53*, das als „Bremspedal“ der onkogenen Entwicklung gesehen werden kann, wirken Veränderungen im Rb-Signalweg häufig als Aktivierung des Zellzyklus und als Beschleuniger des Zellwachstums, indem Kontroll- bzw. Haltepunkte des Zellzyklus übersprungen werden. Dies führt zum unkontrollierten Zellwachstum, einem der wichtigsten Kennzeichen der onkogenen Transformation.

Im Wesentlichen basierend auf der 2015 veröffentlichten Auswertung der TCGA Datenbank^[146] wurden 2018 in einer Übersichtsarbeit von Leemanns *et al.* die häufigsten genetischen Veränderungen bei HNSCC diskutiert^[147]. Nach *TP53* (72%) lag *FAT1* mit 23% am häufigsten mutiert vor. Dessen Genprodukt (Protocadherin *FAT1*) ist im WNT-Signalweg z.B. an der Embryonalentwicklung beteiligt und als Tumorsuppressor klassifiziert. Ein weiterer Bestandteil dieses Signalwegs ist das Tumorsuppressorprotein *NOTCH1*, dessen Gen (*NOTCH1*) mit 18% ebenfalls sehr häufig mutiert ist. Mit 22% als dritthäufigstes Gen wird *CDKN2A* (p16^{INK4A}) genannt. Wie p53 und Rb spielt p16^{INK4A} eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus und interessanterweise zeigt *CDKN2A* mit 32% die bei HNSCC größte Häufigkeit von Veränderungen der Kopienzahl (*copy number alteration frequency*). Ebenfalls mit hoher Mutationsrate (18%) und häufigen Veränderungen der Kopienzahl (21%) lag das Onkogen *PIK3CA* verändert vor, welches die katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase (PI3K) kodiert. In *PIK3CA* sind drei prominente Aminosäurepositionen (GLU542, GLU545, und HIS1047) als Hotspots bekannt, die besonders häufig von Mutationen

betroffen sind. Neben HNSCC werden *PIK3CA* Mutationen z.B. auch häufig bei Zervixkarzinomen und Brustkrebs nachgewiesen. Mit 16% lag *KMT2D* ebenfalls häufig mutiert vor. Dieses Gen kodiert die Histon-Lysin-N-Methyltransferase KMT2D. KMT2D ist essentiell für die frühe Embryonalentwicklung. Es spielt eine Rolle bei der epigenetischen Regulierung von Entwicklungsprozessen, Differenzierung und Stoffwechsel und wurde als Tumorsuppressor beschrieben. Mutationen in *KMT2D* werden häufig bei Entwicklungskrankheiten, angeborenen Herzkrankheiten, sowie bei verschiedenen Krebsarten gefunden^[148].

Bei HPV-assoziierten HNSCC sind prinzipiell die gleichen, für die Karzinogenese essenziellen, zellulären Signalwege betroffen, die auch bei HPV-negativen HNSCC verändert sind. Jedoch basieren diese Veränderungen wie bereits zuvor beschrieben primär auf Interaktionen der viralen Onkoproteine mit den zellulären Komponenten dieser Signalwege. Charakteristisch ist, dass bei den HPV-assoziierten HNSCC die Gene, deren Funktionen von viralen Onkoproteinen beeinflusst werden, deutlich seltener von genetischen Veränderungen betroffen sind, als dies bei HPV-negativen HNSCC der Fall ist. Alles in Allem scheint die Aktivität der viralen Onkoproteine einen Großteil der genetischen Veränderungen zu kompensieren, die für die onkogene Transformation bei HPV-negativem HNSCC erforderlich sind. Dennoch treten *in vivo* zusätzliche genetischen Veränderungen auf und lediglich *in vitro* reicht das onkogene Potenzial der viralen Proteine E6 und E7 von HR-HPV Typen alleine aus, um Zellkulturen dauerhaft zu immortalisieren^[149-151]. Insbesondere durch die bereits angesprochenen WES-^[142,143] und tNGS-Studien^[144,145] sind HPV-spezifische Mutationsmuster in Signalwegen des Zellzyklus (*RB*, *MET*, *CCND1*, *CDKN2A/CDKN2B*) und Zellüberlebens (*PIK3CA-AKT1-MTOR-PTEN*, *EGFR* und *MET*), sowie der Tumordifferenzierung (*NOTCH1*) identifiziert worden, die neben den viralen Onkoproteinen bei HPV-assoziierten HNSCC für die Karzinogenese von Bedeutung sind^[152].

In zwei unserer eigenen Arbeiten zu OPSCC wurden die häufigsten der bei HNSCC zu diesem Zeitpunkt bekannten Mutationen mit einem an HPV-angepassten tNGS-Panel untersucht^[28,29]. Wir konnten bestätigen, dass die untersuchten Gene bei HPV-assoziierten seltener von Mutationen betroffen waren als bei HPV-negativen OPSCC. Speziell in *RB1* und *TP53* konnten wir signifikant seltener Mutationen als bei HPV-negativen OPSCC nachweisen, was den Erwartungen entspricht^[29]. Weiterhin fanden wir bei HPV-negativen OPSCC signifikant häufiger Mutationen in *FAT1*, *KRAS*, *NRAS* und *NOTCH1*. Mutationen in *FAT1* und *NOTCH1* werden bei etwa 19% bzw. 20% aller HNSCC gefunden und gehören somit zu den Top-20 der mutierten Gene in dieser Entität (Abfrage der Datenbank: „COSMIC – the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ am 21.09.2023). Dagegen sind Mutationen in *KRAS* (1,1%) und *NRAS* (0,5%) bislang vergleichsweise selten beschrieben (Datenabfrage wie zuvor). Bei unseren Untersuchungen handelte es sich jedoch um sogenannte Matched-Pairs-Analysen, speziell um Mutationen in Bezug auf das Auftreten lokaler oder entfernter Rezidive zu betrachten. Bedingt hierdurch war die Gesamtzahl der Proben (n=56) vergleichsweise gering und die Selektion der Patienten könnte die im Vergleich zur Literatur relativ hohen Mutationsraten in *KRAS* und *NRAS* hervorgerufen haben. Ein interessantes Ergebnis unserer Studien ist, dass zwar wie erwartet bei HPV-negativen mehr Mutationen als bei HPV-assoziierten OPSCC zu finden waren, dass aber innerhalb der HPV-negativen OPSCC mehr Mutationen bei Fällen nachgewiesen wurden, die keine lokalen oder entfernten Rezidive während des Beobachtungszeitraums entwickelt hatten. Hier traten besonders häufig Mutationen in *RB1*, *FAT1*, *PIK3R1*, *NOTCH1* und *TP63* auf. Im Gegensatz dazu waren in HPV-assoziierten OPSCC der Patienten, die kein lokales oder entferntes Rezidiv entwickelten, wie erwartet seltener Mutationen in den

untersuchten Genen nachweisbar als bei den entsprechenden Patienten mit Rezidiven. Hierbei war besonders häufig *HRAS*, aber auch *TP63* betroffen. Insgesamt über alle vier Gruppen betrachtet traten die niedrigsten Mutationsraten bei Fällen mit HPV-assoziierten OPSCC auf, die keine Rezidive entwickelten. Dies spricht dafür, dass die Karzinogenese in dieser Subgruppe weitgehend durch HPV-bedingte onkogene Prozesse getrieben sein könnte, und dass diese OPSCC am besten bzw. vollständigsten auf die Therapie ansprechen. Die weiteren Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass nicht unbedingt die Anzahl der Mutationen kausal für die Entwicklung der Krankheit relevant ist. Vielmehr scheinen bestimmte Kombinationen von Mutationen wichtig zu sein und bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC könnten unterschiedliche Prozesse für die Entwicklung eines lokalen oder entfernten Rezidivs wichtig sind. Eine Überlagerung durch zusätzliche Effekte, etwa durch Rauchen oder Alkoholkonsum, konnte in diesen Studien durch das Matched-Pairs Design weitgehend minimiert werden^[29].

Im Allgemeinen korreliert die Mutationsrate mit der Anzahl potenzieller Neoantigene, d. h. tumorspezifischer Antigene, die aufgrund genetischer Veränderungen exprimiert werden und Tumorzellen im Prinzip angreifbar für das Immunsystem machen. In der Regel wurden die von uns retrospektiv untersuchten Fällen nicht mit Immuntherapien, sondern der konventionellen Therapie (chirurgischen Resektion mit oder ohne Strahlentherapie / Chemotherapie mit konventionellen Zytostatika) behandelt. Dennoch könnte auch die konventionelle Therapie eine Verschiebung des Gleichgewichts der Immunreaktionen zu Ungunsten der Immunflucht (*immune escape*, siehe Abschnitt 2.6.) bewirkt haben. Dies könnte eine verstärkte Elimination von (nach der konventionellen Therapie verbliebenen) Neoantigen-positiven Tumorzellen verursachen und Grund für das Ausbleiben von Rezidiven bei diesen Patienten sein. Möglicherweise sind dagegen Mutationen in den HPV-negativen OPSCC der Patienten mit Rezidiven in geringerem Umfang für eine Produktion von Neoantigenen verantwortlich oder es spielen hierbei weitere Faktoren eine Rolle, wie ein generell geschwächtes Immunsystem oder stärkere/andere Mechanismen der Immunevasion. Prinzipiell könnte ebenfalls eine besonders schlechte Konstellation von wenigen, individuellen Mutationen, also eher die Qualität als die Quantität der Mutationen, hier eine Rolle spielen.

Ein Erklärungsversuch für die unterschiedlichen Mutationsraten in Bezug auf lokale oder entfernte Rezidive bei HPV-assoziierten OPSCC könnte sein, dass in dieser Subgruppe mit einer weitgehend HPV-getriebenen Onkogenese, Tumorzellen zu einem frühen Entwicklungsstadium (durch die Wirkung viraler Onkoproteine) *immune-escape* Eigenschaften erworben haben, die zum Auswachsen der Tumore führen. In diesem frühen Entwicklungsstadium könnten die Tumorzellen noch vergleichsweise wenige zusätzliche Mutationen akkumuliert haben. Somit könnten die Tumore „homogener“ sein und ein geringes klonales Potenzial besitzen. In Konsequenz ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass resistente Tumorzellen nach einer systemischen Therapie als Quelle für ein Rezidiv übrigbleiben. Die klinischen Daten sprechen für diese Möglichkeit, da das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC sehr viel besser und die Rate lokoregionärer Rezidive mit 15,1% vs. 28,0% in dem von uns untersuchten Kollektiv^[29] und 9-15% gegenüber 26-35% in anderen Arbeiten^[153,154] weitaus geringer ist.

2.5. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Die zuvor beschriebenen genetischen und/oder epigenetischen Veränderungen sind in der Regel der primäre Auslöser karzinogener Prozesse, jedoch für sich betrachtet meist ohne konkrete physiologische Effekte. Vielmehr führen diese Veränderungen üblicherweise erst nach ihrer Translation zu *loss-* oder *gain of function* Veränderungen der kodierten Proteine, woraus wiederum Fehlfunktionen bei einzelnen biochemischen Prozessen, oder weitreichende Dysregulierungen komplexer Signalwege resultieren. Ein verbreitetes Merkmal in diesem Zusammenhang sind Veränderungen des Stoffwechsels, insbesondere in der Glykolyse und der Glutaminolyse. Beide dienen der Bereitstellung von Zwischenprodukten und Reduktionsäquivalenten, die während des Zellwachstums benötigt werden zur Aufrechterhaltung der Aminosäuresynthese, des Pentosephosphatweges und der Lipidproduktion. Diese sogenannte metabolische Reprogrammierung in Tumorzellen wurde erstmals 1924 von Otto Warburg beschrieben. Der nach ihm benannte Warburg-Effekt beschreibt das Phänomen, dass auch in Anwesenheit von Sauerstoff in Tumorzellen Glukose lediglich zu Laktat verstoffwechselt und ausgeschieden wird, anstelle, dass die Produkte der Glykolyse über den Citratzyklus in den Mitochondrien vollständig oxidiert werden. Die Energiegewinnung verläuft bei dieser „aeroben Glykolyse“ ineffizient, da pro Molekül Glucose lediglich zwei Moleküle ATP und Laktat entstehen (gegenüber 34 Molekülen ATP bei der vollständigen, aeroben Verstoffwechslung). Für Tumorzellen vorteilhaft ist jedoch, dass glykolytische Intermediate wie Glucose-6-phosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat in den Pentosephosphatweg und die Nukleotidsynthese umgelenkt werden können, um anabole Prozesse aufrecht zu erhalten bzw. zu fördern^[155]. Zur Kompensation der geringeren Energieausbeute der aeroben Glykolyse (oder zur verstärkten Produktion glykolytischer Intermediate) liegt in vielen soliden Tumoren eine erhöhte Aufnahmerate von Glucose vor. Dies kann über den Nachweis von radioaktiv markierter Glucose (¹⁸Fluor-Desoxyglukose, ¹⁸F-FDG) mit Hilfe des PET/CT diagnostisch genutzt werden, meist zum Nachweis makroskopisch unauffälliger Metastasen.

Mit Hilfe der PET/CT Technik konnten wir Unterschiede im Verlauf der Metastasierung bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC aufzeigen. Es stellte sich heraus, dass Primärtumore und Lymphknotenmetastasen von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC geringere individuelle Unterschiede der ausgewerteten ¹⁸F-FDG PET/CT Parameter aufwiesen, als dies bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC der Fall war^[31]. Allgemein korrelieren bei KHK steigende ¹⁸F-FDG PET/CT-Parameter mit zunehmender Größe der Primärtumore (T-Stadium)^[156]. Dies konnten wir in eigenen Untersuchung bestätigen, jedoch nicht für HPV-assoziierte OPSCC, bei denen keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumoren verschiedener T-Stadien feststellbar waren^[31]. Wir vermuten, dass in HPV-negativen OPSCC, wie auch bei anderen soliden Tumoren, weiterhin die gleichen äußeren Faktoren (z.B. lokale Sauerstoffversorgung im Gewebe), oder Mutations-bedingte intrinsische Veränderungen der zellulären Stoffwechselwege vorliegen. Die Vielzahl der potenziellen Veränderungen könnte hierbei vergleichsweise starke individuelle Schwankungen hervorrufen. Bedingt durch die in allen Tumorzellen gleichermaßen vorhandene Aktivität der viralen Onkoproteine, scheinen diese Stoffwechselwege in HPV-assoziierten OPSCC dagegen in homogenerer Weise verändert vorzuliegen. Dies wird durch eine unserer *in vitro* Untersuchungen bestätigt, die zeigte, dass HIF-1 α bei HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumorzelllinien, im Gegensatz zu HPV-negativen Zelllinien, unabhängig von einer Hypoxie bereits unter normalen Sauerstoffkonzentrationen nachweisbar ist^[30]. Dies würde bedeuten, dass hier bereits eine Aktivierung des HIF-Signalwegs unter normalen Sauerstoffkonzentrationen vorliegt.

HIF-1 α bildet zusammen mit einer β -Untereinheit (HIF-1 β) den heterodimeren Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor), der als zentrale Komponente an der Regulation von mehr als einhundert Genen, sowie der Reprogrammierung des Energiestoffwechsels in Tumorzellen beteiligt ist^[157]. Seine Aktivität wird bei ausreichender Sauerstoffversorgung effektiv durch eine Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung der α -Untereinheit reprimiert. Dieser folgt eine Ubiquitinierung durch das Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein und der darauffolgende proteasomale Abbau von HIF. Unter den „onkologisch“ wichtigen HIF-regulierten Signalwegen sind die folgenden besonders hervorzuheben: 1. Förderung der Angiogenese über Interaktion mit dem *vascular endothelial growth factor* VEGF^[158,159]; 2. Stimulation der Migration und Wundheilung^[160]; 3. Induktion der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen^[157].

Literaturdaten bestätigen, dass virale Onkoproteine eine Reihe zellulärer Regulatoren im Sinne einer metabolischen Remodellierung beeinflussen^[161]. Insbesondere können Onkoproteine von HPV mit HIF-1 α interagieren^[162-164]. Evolutionär hat sich möglicherweise diese Interaktion entwickelt, da über diesen zentralen Transkriptionsfaktor in einem Schritt eine Reihe von zellulären Funktionen beeinflusst werden können, wie es für die virale Reproduktion förderlich ist. Der augenfälligste Aspekt ist dabei die erhöhte Zufuhr von Baustoffen für die Synthese von viraler DNA und Kapsidproteinen durch die Induktion der aeroben Glykolyse. Daneben erhöht zum Beispiel die Stimulation der Migration und Wundheilung im natürlichen Replikationszyklus von HPV die Chance einer persistierenden Infektion, da infizierte epitheliale Basalzellen nicht nur zur vertikalen, sondern auch zur horizontalen Zellteilung angeregt werden. Durch Veränderungen in der Regulation von Adhäsionsmolekülen und der terminalen Differenzierung von Keratinozyten durch HIF^[165] wird weiterhin der Zellverband in den Warzenstrukturen benigner HPV-assoziiierter Läsionen aufgelockert und die Abschilferung infizierter Hautzellen und somit die Freisetzung der Viruspartikel erleichtert^[166]. Insbesondere der Verlust von E-Cadherin (E-Cadherin *shedding*) ist hier im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Immunevasion bei HPV-assoziierten OPSCC bedeutsam. Darüber hinaus ist der Verlust von E-Cadherin Teil der Prozesse, die bei der Umwandlung von Epithelzellen in Tumorzellen eine Rolle spielen. Hierbei gehen epitheliale Eigenschaften verloren bzw. werden von mesenchymalen Merkmalen ersetzt. Diese epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist durch einen Wechsel der Adhäsionsmoleküle gekennzeichnet (*cadherin switching*), bei dem das epitheliale E-Cadherin typischerweise verschwinden, dagegen das mesenchymale (neuronale-) N-Cadherin exprimiert wird^[167]. Die Aktivierung von HIF, sowohl durch echte Hypoxie z.B. in anwachsenden Tumorzellmassen, als auch durch karzinogene Dysregulationen, kann zur Hochregulierung von Transkriptionseffektoren wie Snail, Twist, ZEB1 und ZEB2 führen. Diese wiederum unterdrücken unter anderem die Expression von E-Cadherin und induzieren somit EMT. Hierbei schient HIF, über funktionelle Hypoxie-Reaktions-Elemente (*hypoxia response elements*, HREs) innerhalb regulatorischer Bereiche der Gene ZEB1, Snail und Twist, direkt an deren Regulation beteiligt zu sein^[168-170]. Eine indirekte Begünstigung der EMT über die Vernetzung des HIF-Signalweg mit anderen Signalwegen wie z.B. Notch^[171,172], TGF- β ^[173] und Wnt^[174] ist ebenso bekannt.

Im Kontext der HPV-induzierten Karzinogenese führen die Interaktionen der viralen Onkoproteine mit HIF sozusagen zur Förderung mehrerer onkogener Prozesse, die in der klassischen, Mutations-bedingten Karzinogenese Schritt für Schritt erworben werden^[175]. Dies könnte erklären, warum sichtbare Zwischenformen wie Leukoplakien oder makroskopisch unsichtbare Vorläuferläsionen, wie sie bei der Feldkanzerisierung HPV-negativer KHK

beschrieben werden, bei HPV-assoziierten OPSCC praktisch unbekannt sind. Die Feldkanzerisierung beschreibt das Konzept multifokaler Felder prämaligener Mukosa im Bereich eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich. Diese entstehen durch die langjährige Einwirkung chemischer Karzinogene und werden als potenzielle Ursache für das Entstehen syn- oder metachroner Zweitkarzinome und lokaler Rezidive angesehen^[175,176].

Zwei weitere klinische Aspekte bei OPSCC könnten mit der Beeinflussung HIF-regulierter Signalwege und metabolischer Veränderungen durch HPV in Zusammenhang stehen. Einerseits weisen HPV-assoziierte OPSCC bei vergleichsweise kleinen Primärtumoren häufig bereits eine ausgeprägte lymphogene Metastasierung (hohe N-Stadien) auf. Andererseits zeigen Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC, trotz des negativen prognostischen Einfluss eines hohen N-Stadiums, ein außergewöhnlich gutes Gesamtüberleben und in der Regel ein besonders gutes Ansprechen auf eine Strahlentherapie^[177-179].

Die lymphogene Metastasierung scheint bei HPV-assoziierten OPSCC entweder früher in der Karzinogenese oder durch andere Mechanismen als bei HPV-negativen OPSCC induziert zu werden. Die Schwächung von Zell-Zell-Kontakten, wie sie im natürlichen Replikationszyklus von HPV in der terminalen Differenzierung von epithelialen Keratinozyten induziert wird, sowie der Verlust von E-Cadherin und anderen Adhäsionsmolekülen scheint die zelluläre Mobilität von HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negativen Tumorzellen zu erhöhen, was eine frühzeitigere lymphogene Metastasierung bedingen könnte. Bei metastasierenden Tumoren wird eine reduzierte Expression von E-Cadherin häufig beobachtet^[180-182] und im Tumormodell der Maus wurde gezeigt, dass der kombinierte Verlust von E-Cadherin und p53 zu einer beschleunigten Entwicklung von invasiven und metastasierenden Mammakarzinomen führt^[183]. Die Aktivierung von HIF scheint bei diversen Zelltypen ausreichend zu sein, um EMT und die Tumordinvasion zu induzieren^[184-187]. Im normalen Replikationszyklus von HPV hat die Beeinflussung des HIF-Signalweg durch die viralen Onkoproteine möglicherweise den Zweck die Freisetzung infizierter Zellen und die Verbreitung der Viruspartikel zu erleichtern. Im Kontext der Karzinogenese könnten dagegen dieselben Prozesse zu einer Erhöhung des Metastasierungspotenzials von HPV-assoziierten Tumorzellen führen.

Auch in Bezug auf das besonders gute Ansprechen HPV-assoziiierter OPSCC auf eine Bestrahlung könnte die HPV-induzierte Aktivierung von HIF wichtig sein. Bis zu einem gewissen Grad unabhängig von der Sauerstoffversorgung scheint der Hypoxie-Signalweg und damit die Glykolyse in HPV-assoziierten OPSCC aktiviert zu werden. Bei gleichen Messwerten im ¹⁸F-FDG PET/CT könnte somit effektiv mehr Sauerstoff im Tumor verfügbar sein, was eine höhere Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine entsprechend höhere Effektivität der Strahlentherapie bedingen könnte. Weiterhin konnten wir in eigenen Untersuchungen an bestrahlten HNSCC-Tumorzelllinien zeigen, dass HPV-positive gegenüber HPV-negativen Tumorzelllinien ein signifikant vermindertes klonogenes Überleben aufweisen^[188,189]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben^[190,191]. Diese auf Zell- und Gewebekulturen beruhenden Ergebnisse lassen vermuten, dass Defekte im Reparatursystem von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) für die erhöhte *in vitro*-Radiosensitivität verantwortlich sind. Jedoch existieren vergleichsweise wenige (n=6) etablierte HPV-positive HNSCC-Tumorzelllinien. Daher werden Literaturdaten kontrovers diskutiert, die primär Defekte in der homologen Rekombination und eine gestörte Expression von DSB-Reparaturproteinen als zugrundeliegende Mechanismen vorschlagen^[192]. Weiterhin sind die *in vivo* Bedingungen in Bezug auf die Hypoxie in vielen Experimenten nur unzureichend abgebildet, denn Standard-Zellkulturexperimente werden i.d.R. bei Sauerstoffkonzentrationen der Umgebungsluft

durchgeführt. Im Vergleich zur normalen Sättigung im Gewebe oder sogar hypoxischen Bedingungen (wie im Zentrum großer Tumore) ist diese Konzentration unphysiologisch hoch^[193]. Natürliche Effekte, die durch Sauerstoffmangel hervorgerufen werden und auf einer Aktivierung des HIF-Signalweges beruhen, können hier also zumeist nicht erfasst werden. Obwohl die aktuellen *in vitro*-Daten HIF-unabhängige Gründen für ein besseres Ansprechen auf die Strahlentherapie von HPV-positivem OPSCC unterstützen, schließt dies allerdings eine Beteiligung des HIF-Signalwegs *in vivo* nicht aus. Wie meist bei komplexen biologischen Systemen ist es insofern wahrscheinlich, dass mehrere Faktoren für ein Erscheinungsbild bzw. eine Merkmalsausprägung verantwortlich sind und sowohl Dysregulation der HIF-Signalwegs, als auch Veränderungen im DSB-Reparatursystem für die erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei HPV-positivem OPSCC ursächlich sind. Ob und was von beidem kausal oder eine Folge ist, kann hier nicht beantwortet werden.

Ein weiterer Aspekt der HPV-induzierten Aktivierung von HIF im Zusammenhang mit dem besonders guten Ansprechen auf eine Bestrahlung betrifft die Klonalität der Tumore. Sowohl die zuvor beschriebenen genetischen, als auch metabolischen Veränderungen scheinen insgesamt bei HPV-assoziierten OPSCC homogener als bei HPV-negativen Tumoren zu sein. Dies könnte bedeuten, dass die Gesamtzahl unterschiedlicher Tumorzellklone signifikant geringer ist. Folglich wäre auch die Wahrscheinlichkeit der Reetablierung resistenter Zellklone nach einer Therapie geringer und die Chance einer vollständigen Eliminierung von Tumorzellen entsprechend höher. Dies könnte sich in der wesentlich besseren Gesamtüberlebensrate von Patienten mit HPV-assoziiertem OPSCC widerspiegeln, wenngleich diese Patientengruppe auch durch andere, in der Regel mildere Risikoprofile gekennzeichnet ist. Obwohl die karzinogenen Veränderungen bei HPV-assoziierten OPSCC homogener als bei anderen Tumoren zu sein scheinen, zeigt die Forschung zunehmend, dass Tumorzellen individuelle metabolische, genetische und epigenetische Eigenschaften besitzen. Diese wiederum wirken sich je nach ihrem Mikromilieu unterschiedlich aus was die Progression bzw. das Therapieansprechen der Tumore betrifft.

Metabolische Veränderungen sind als potenzielle onkologische Therapieziele seit langem bekannt. Erste Erfolge wurden bereits 1948 in der Behandlung akuter Leukämie bei Kindern durch den Folsäure-Antagonisten Aminopterin (4'-Desoxy-4'-aminofolsäure) publiziert^[194]. Die Tatsache, dass metabolische Veränderungen für die Onkogenese von Bedeutung sind und sogar für das Überleben mancher Tumorzellen essenziell sein können, macht entsprechende biochemische Reaktionswege zu einem attraktiven therapeutischen Ziel. Allerdings sind diese Stoffwechselwege allgemein von grundlegender Bedeutung und werden auch von proliferierenden, nicht-transformierten Zellen (zum Teil auch von nicht-proliferierende Zellen) genutzt, so dass nicht jede metabolische Veränderung als Therapieziel in Frage kommt^[195]. In Zukunft werden die Fortschritte in der individualisierten Tumordiagnostik wahrscheinlich neue Möglichkeiten bieten, Veränderungen des Stoffwechsels bei Tumorerkrankungen gezielt therapeutisch zu nutzen, möglicherweise in Kombination mit anderen Behandlungsstrategien. HPV-assoziierte OPSCC könnte aufgrund der "weniger komplexen" Karzinogenese in der Entwicklung als Testsystem dienen, und möglicherweise die Patienten dementsprechend früher als bei anderen Tumorerkrankung von neuen Konzepten profitieren.

2.6. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Innerhalb und in der näheren Umgebung der meisten Tumore findet sich eine große Vielfalt von Immunzellen. Zu den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) gehören T- und B-Zellen, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Daneben kommen Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen als Vertreter der myeloischen Linie vor. Die Häufigkeit und Verteilung von Immunzelltypen unterscheidet sich stark zwischen Tumoren, die dementsprechend eingeteilt werden können in entzündliche („heiße“ / *hot*), nicht entzündliche („kalte“ / *cold*) und in solche Tumore bei denen Immunzellen ausgeschlossen werden (*immune excluded*). Allgemein sind KHK eher den „heißen“ Tumoren zuzuordnen, wobei das *immune excluded* Muster ebenfalls vorkommt^[196]. HNSCC sprechen wie Melanome und Plattenepithel- sowie Adenokarzinome der Lunge zu einem gewissen Grad auf aktuell zugelassene Immuntherapien an und es ist auffällig, dass bei diesen Entitäten ein großer Anteil an Tumoren gefunden wurde, die „heiß“ in Bezug auf Immunzellmarker wie CD3, CD8 und PD1 waren. Allerdings wurden bei HNSCC ebenso besonders häufig FoxP3 (*Forkhead box protein P3*)-positive regulatorische T-Zellen (Tregs) gefunden^[196]. FoxP3 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Fehlfunktionen mit neurologischen Entwicklungsstörungen und immunologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Obwohl die Rolle von FoxP3 nicht vollständig klar ist, scheint seine Aktivität mit immunsuppressiven Eigenschaften verbunden zu sein und die periphere Immuntoleranz sowohl gegenüber Selbst-, als auch gegenüber Fremdanigenen zu vermitteln^[197]. Dies korreliert mit der bei vielen Krebsarten bekannten Beobachtung, dass eine hohe Zahl an Tregs im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Bei HNSCC wurden jedoch auch Hinweise auf positive Auswirkungen der Präsenz von Tregs und FoxP3-positiver Zellen gefunden, wie z.B. eine bessere lokoregionäre Kontrolle und ein besseres Gesamtüberleben^[198-200]. Insbesondere FoxP3-positive Tregs wurden in einer Studie signifikant häufiger in der Invasionsfront HPV-positiver HNSCC gefunden. Die Anwesenheit FoxP3-positiver Zellen (im Tumor und der Invasionsfront) korrelierte mit besserem krankheitspezifischem Überleben^[200], unabhängig vom HPV-Status und im Gegensatz zur allgemeinen Assoziation von Tregs mit schlechter Prognose. Hieran lässt sich die Komplexität immunologischer Aspekte erkennen und wenn auch allgemein „viele“ Immunzellen in einer Tumorentität (wie HNSCC) gefunden werden, so bestehen dennoch große Unterschiede innerhalb einer Tumorentität. Dies hat sich bei HNSCC bestätigt, zumal aufgrund von prognostischen, klinischen und molekularen Unterschieden bereits mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC zwei Unterklassen definiert wurden.

Solide Tumore bestehen in der Regel nicht nur aus Tumorzellen, sondern zusätzlich aus einer komplexen Mischung gesunder Stromazellen. Die Gesamtheit aus Tumor- und Stromazellen, der extrazellulären Matrix (ECM) und den darin enthaltenen (immunologischen) Faktoren wird als Tumormikroumgebung (*tumor microenvironment*, TME) bezeichnet. Endothelzellen, Krebs-assoziierte Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts*, CAFs) und Immunzellen sind die häufigsten Stromazellen, jedoch können auch weitere Zelltypen auftreten. So wurden bei HNSCC innervierende Neuronen aus dem peripheren Nervensystem und adrenerge Neuronen nachgewiesen. Letztere können das Tumorstadium fördern, was im Zusammenhang mit einem Verlust von *TP53* bzw. Funktionsverlust von p53 zu stehen scheint^[201]. Sowohl Tumorzellen als auch CAFs können Wachstumsfaktoren wie VEGF produzieren^[202,203] und somit Endothelzellen rekrutieren. Dies wiederum verbessert die Vaskularisation, sowie die damit verbundene Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Endothelzellen können weiterhin das Überleben und die Selbsterneuerung von Tumorstammzellen (CSCs) fördern^[204].

Die Bedeutung der CAFs bei der Karzinogenese von KHK ist in den letzten Jahren zunehmend anerkannt worden. CAFs entstehen aus normalen Fibroblasten, unterscheiden sich aber von diesen durch die Expression eines für glatte Muskulatur typischen Aktins (α -smooth muscle actin, α SMA) und durch einen dauerhaft anhaltenden Aktivierungszustand. Dieser ist vergleichbar mit dem Zustand bei der Wundheilung, der mit einer induzierten schnellen Proliferation von Zellen einhergeht, die sich normalerweise selten teilen. Weiterhin wird hierdurch das Einwandern von Epithel- und Stromazellen in die ECM und in Bindegewebe, sowie die Bildung neuer Blutgefäße gefördert, was ein günstiges Milieu für das Fortschreiten von Karzinogenese bietet^[205]. Sowohl das Ausgangsgewebe eines Tumors, als auch Tumor-spezifische Faktoren beeinflussen den Phänotyp von CAFs. Dies bedingt eine insgesamt sehr heterogene Population von Zellen, wobei einige Subtypen anhand spezifischer Expressionsmuster definiert werden können^[206]. Neben VEGF können CAFs eine Reihe von Faktoren produzieren und abgeben, die das Wachstum von Tumorzellen, die Angiogenese und die Rekrutierung von immunsuppressiven Immunzellen (z.B. durch IL-6) fördern. Zu diesen Faktoren gehören auch Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die an der Degradation der ECM und ihrer Umstrukturierung während der Karzinogenese beteiligt sind. Die Eigenschaften der ECM beeinflussen die Mobilität von Zellen grundlegend, was in Kombination mit EMT bei der Metastasierung von Tumoren relevant ist^[207]. Beispielsweise bildet das Transmembranprotein E-Cadherin zusammen mit Catenin-Molekülen die Zell-Zell Kontakte (*adherens junction*) zwischen benachbarten Zellen, was deren Mobilität, sowie Wachstumsfaktor-induzierte Zellteilungen verhindert (*contact inhibition of growth*)^[208]. Eine Reihe von MMPs (und anderen Proteasen) können E-Cadherin an der Zellmembran in ein N-terminales extrazelluläres (80 kDa) und ein intrazelluläres C-terminales (38 kDa) Fragment spalten, wodurch die physikalischen Zellkontakte gelöst und die Mobilität der Zellen erhöht werden^[209]. Zusätzlich haben sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin das Potenzial, mit weiteren Faktoren wie EGFR zu interagieren^[210] und die Karzinogenese zu beeinflussen^[209]. Zunächst wurde vermutet^[211] und später an einem Keratinozyten-Modellsystem gezeigt, dass die durch E-Cadherin aufgebauten Zellkontakte von Langerhans-Zellen mit Keratinozyten für deren Lokalisation in der Epidermis notwendig sind^[212]. Interessanterweise wurden dies mit Hilfe des HPV₁₆ E6 Proteins nachgewiesen, denn die Expression von E6 genügte in diesem Keratinozyten-Modell, um E-Cadherin an deren Zelloberfläche zu reduzieren und so die Interaktion mit Langerhans-Zellen zu stören. Die Autoren vermuten, dass dies die Präsentation viraler Antigene durch Langerhans-Zellen *in vivo* einschränke, eine zellvermittelte Immunantwort verhindere und so die Persistenz von HPV in infizierten Zellen gefördert würde^[212]. Unsere eigenen Arbeiten an HPV-positiven HNSCC Zelllinien betätigen eine verminderte Expression von E-Cadherin gegenüber HPV-negativen Zelllinien und wir vermuten, dass dies durch eine HPV-induzierte Beeinflussung des HIF-Signalwegs erfolgt^[30]. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben könnte dies im normalen Replikationszyklus von HPV (durch die Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte) die Freisetzung infizierter Zellen und im Kontext der Karzinogenese das Metastasierungspotenzial dieser Tumore begünstigen^[31]. Mit der Funktion der Langerhans-Zellen wird darüber hinaus eine wichtige Komponente des Immunsystems beeinflusst. Als eine der wenigen Immunzellen der oberen Hautschichten sind Langerhans-Zellen die Hauptgegenspieler im natürlichen Infektionsweg von HPV. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Langerhans-Zellen zwar genauso wie dendritische Zellen in der Lage sind, Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs, bestehend aus den beiden Capsidproteine L1 und L2 von HPV₁₆) aufzunehmen, sie hierdurch jedoch nicht aktiviert werden. Auch nach Inkubation mit VLPs, die zusätzlich das immunogene E7-Onkoprotein enthielten, waren Langerhans-Zellen nicht in der Lage, eine

T-Zellantwort auszulösen. Dagegen wurde mit dem gleichen Versuchsansatz in dendritischen Zellen eine HLA-vermittelte, E7-spezifische T-Zellantwort ausgelöst^[213]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Langerhans-Zellen weder phänotypisch noch funktionell ausreifen, wenn sie VLPs exponiert werdend die das L2 Capsidprotein beinhalten. Dies war nicht der Falle wenn die VLPs lediglich aus L1 bestehen^[214]. Interessanterweise scheint dieser durch HPV induzierte *immune-escape* Mechanismus bei Langerhans-Zellen durch eine Aktivierung des PI3-K-Signalwegs hervorgerufen zu werden^[215]. In diesem Signalweg liegen bei HPV-positiven HNSCC ebenfalls überdurchschnittlich häufig aktivierende genetische Veränderungen vor^[147], was die Bedeutung dieses *immune-escape* Mechanismus zusätzlich unterstreicht. Beim Zervixkarzinom wurde immunhistochemisch gezeigt, dass Immunzellen, insbesondere Langerhans-Zellen, aber auch stromale Keratinozyten und Makrophagen, im Rahmen einer HPV-Infektion zur Produktion von Interleukin-10 (IL-10) angeregt werden. IL-10 wird allgemein als immunsuppressives Zytokin angesehen und wirkt hemmend auf Entzündungsreaktionen, die Reifung Antigen-präsentierender Zellen, sowie die Proliferation von T-Zellen^[216]. Außerdem ist eine Herunterregulierung der klassischen HLA Klasse I und Klasse II Moleküle durch IL-10 bekannt - abgesehen von HLA-G, dessen Expression von IL-10 gefördert wird^[217]. Im Rahmen einer HPV-Infektion der Zervix scheint sich ein positiver Feedback-Mechanismus zwischen der Expression viraler Onkoproteine (E2, E6 und E7) und IL-10 einzustellen, was ein kontinuierlich immunsuppressives TME begünstigt^[218]. Demgegenüber steht die Fähigkeit von IL-10, Immunreaktionen durch die effektive Aktivierung von NK-Zellen zu fördern^[216]. Im natürlichen Replikationszyklus spielt dieser aktivierende Effekt jedoch keine (negative) Rolle für HPV, da NK-Zellen im Epithel oberhalb der Basalmembran üblicherweise fehlen.

Ein weiterer *immune-escape* Mechanismus bei HPV-infizierten Zellen ist die verminderte Expression von HLA Klasse I auf der Zelloberfläche. Damit verbunden ist eine verminderte Fähigkeit antigene Peptide zu präsentieren^[32] und somit auch die Wahrscheinlichkeit von HPV-spezifischen CD8+ T-Zellen erkannt zu werden^[33]. Nach der *missing-self*-Hypothese führt dieses Fehlen von HLA Klasse I (ebenso wie IL-10) jedoch zur Aktivierung von NK-Zellen^[37] und wir konnten in einer eigenen Arbeit zeigen, dass bei HPV-assoziierten OPSCC höhere Zahlen CD56-positiver Lymphozyten zu finden waren, bei denen granuläres Granzym B und CD16 als Marker zytotoxischer NK-Zellen nachgewiesen wurde^[34]. Ebenfalls konnten wir bestätigen, dass bei HPV-assoziierten OPSCC häufiger der Verlust einer funktioneller HLA Klasse I Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen vorliegt^[35]. Es ist zunächst nicht plausibel, warum zytotoxische NK-Zellen in HPV-assoziierten Tumoren vorhanden sind, obwohl diese Tumore vergleichsweise aggressiv wachsen und metastasieren. Hierfür müssen weitere Faktoren verantwortlich sein, die die Aktivität vorhandene NK- oder andere Immunzellen hemmen, so dass die Karzinogenese fortschreiten kann. Ein potenzieller Kandidat hierfür ist HLA-G, ein nicht-klassisches humanes Leukozytenantigen der Klasse I. Im Unterschied zu den klassischen HLA Klasse I Molekülen ist der Polymorphismus von HLA-G begrenzt und seine Expression vergleichsweise gewebspezifisch. HLA-G gehört zu den Immun-Checkpoint Molekülen und bremst allgemein Immunreaktionen. Die Hauptfunktion von HLA-G besteht darin, während der Schwangerschaft eine Immuntoleranz des maternalen Immunsystems gegenüber dem Embryo zu bewirken. Daher tritt eine membranständige HLA-G Expression vor allem bei Trophoblastenzellen in der Plazenta auf, aber z.B. auch bei einigen immunologisch besonders „beanspruchten“ Geweben (Thymusepithelzellen, Hornhaut, mesenchymale Stammzellen etc.)^[219,220]. HLA-G interagiert mit dem hemmenden Rezeptor

KIR2DL4 auf NK-Zellen und schützt so vor deren Angriff^[220]. Daneben besitzt HLA-G weitere immunsuppressive Eigenschaften wie die Hemmung von T- und B-Zellen, Hemmung der Proliferation und der zytotoxischen Aktivierung von T- und NK-Zellen, sowie die Blockierung der Funktionen von dendritischen Zellen und Neutrophilen. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β , ein positiver Rückkopplungsmechanismus mit der Expression von HLA-G nachgewiesen, was im Gegensatz zur üblicherweise durch IL-10 induzierten Herunterregulation von HLA Klasse I Molekülen steht (siehe Seite 35)^[217]. Somit könnte insgesamt ein effektiv immunsupprimiertes TME durch die Expression von HLA-G entstehen, wodurch die Progression der Karzinogenese gefördert wird. Inzwischen ist eine Tumor-assoziierte Expression von HLA-G bei HNSCC und vielen anderen Tumortypen nachgewiesen worden^[200,219]. Eine weitere Rolle von HLA-G wird beim Zervixkarzinom diskutiert, wo es Hinweise gibt, dass genetische Polymorphismen von HLA-G relevant sind für die Anfälligkeit für eine HPV-Infektion und deren Persistenz^[221]. Die Rolle von HLA-G bei der Karzinogenese der Zervix im Zusammenhang mit HPV ist abgesehen von der Infektion nicht gut verstanden, da in verschiedenen Studien sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte oder fehlende Expression von HLA-G in Läsionen im Frühstadium festgestellt wurde^[222]. Weitaus schwächer ist die aktuelle Datenlage zudem bei HNSCC. Eine Literatursuche (PubMed am 16.10.2023 mit dem Suchterm: „HLA-G“ and „HPV“ and „head neck“) ergab lediglich zwei Originalarbeiten mit insgesamt n=24 HPV-positiven Fällen, bei denen HLA-G immunhistochemisch untersucht wurde. Hierbei waren die Ergebnisse widersprüchlich in Bezug auf die Häufigkeit der HLA-G Expression bei HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen HNSCC^[200,223].

Weitaus besser bei HNSCC untersucht als HLA-G sind die sogenannten Immun-Checkpoint Marker. In einer eigenen Arbeit konnten wir zeigen, dass im Gegensatz zu HLA Klasse I, PD-L1 bei HPV-assoziierten OPSCC signifikant häufiger exprimiert ist^[35]. Der konkrete Zusammenhang zwischen dem Verlust von HLA Klasse I (HLA I *loss*) und der verstärkten PD-L1 Expression (PD-L1 *high*) ist noch unklar. Dennoch scheinen beides wichtige Wege zur Umgehung des adaptiven Tumormunnsystems zu sein, die häufig nebeneinander vorkommen und zur Resistenz gegen eine Anti-Tumor-Immunität beitragen^[36,37,224,225]. Immun-Checkpoint Signalwege sind unter physiologischen Bedingungen zur Dämpfung einer Überreaktion von Immunzellen gegenüber körpereigenen Antigenen zuständig und hierbei besonders wichtig während der Schwangerschaft, um den Fetus vor den Immunzellen der Mutter zu schützen. Immun-Checkpoint Signalwege bestehen aus hemmenden Rezeptoren auf Immunzellen und entsprechenden Liganden auf den Zellen, die vor einem Angriff der Immunzellen geschützt werden sollen. Die bekanntesten Immun-Checkpoint-Rezeptoren sind PD-1, CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte protein 4*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3 protein*) und TIM-3 (*hepatitis A virus cellular receptor 2 alias T-cell immunoglobulin mucin family member 3*). Entsprechende Liganden werden häufig auch von Tumorzellen über-exprimiert, um so der Aktivität der Rezeptor-tragenden Immunzellen zu entgehen.

PD-L1 ist neben PD-L2 einer der inhibierenden Liganden des PD-1 Immun-Checkpoint Signalwegs und es ist gezeigt worden, dass die PD-L1 Expression inhibierend auf die Aktivität von NK-Zellen wirkt^[38,39]. Entsprechend scheint das Expressionsmuster HLA I *loss* / PD-L1 *high* aus immunologischer Sicht allgemein aggressiver und möglicherweise für die Resistenz gegen die Immun-Checkpoint-Therapie bei Patienten mit hoher PD-L1-Expression im Tumor verantwortlich zu sein^[36,226,227]. Allerdings sind die Zusammenhänge komplex und teilweise kontrovers. So wurde berichtet, dass die Expression von HLA I als alleiniger Marker bei Lungen- und

Brustkrebs sowohl mit einer besseren als auch mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden ist^[228-230]. In unseren Untersuchungen korrelierte die Expression von PD-L1 mit dem Verlust einer funktionellen HLA Klasse I Expression und der Anwesenheit von CD8+ T-Zellen. Dies war mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert und insgesamt fand sich der HLA I *loss* / PD-L1 *high* Phänotyp häufiger bei HPV-assoziierten OPSCC^[35]. Innerhalb dieser Patientengruppe konnten wir jedoch keinen Zusammenhang im Bezug zum Gesamtüberleben feststellen – mit großer Wahrscheinlichkeit, weil der HPV-Status alleine bereits einen sehr starken positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben ausübt und kaum Ereignisse (Todesfälle) im Beobachtungszeitraum auftraten. In dieser Patientengruppe ist in unserer Untersuchung dennoch ein interessanter Unterschied erkennbar, denn die Anwesenheit von CD8+ T-Zellen war unabhängig von PD-L1 mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert^[35]. Die anwesenden Tumorzellen, seien es zytotoxische T- oder Granzym B haltige NK-Zellen, befinden sich offensichtlich in einem (gedämpften) Aktivitätszustand, der das Tumorwachstum weiterhin ermöglicht. Nahezu alle Patienten in den untersuchten Stichproben erhielten eine konventionelle Therapie, in der Regel in Form einer Resektion mit anschließender Bestrahlung. Dies könnte zu Veränderungen im Immungleichgewicht beigetragen haben und die passiven Immunzellen in den Fällen reaktiviert haben, in denen die Tumore nicht völlig frei von Immunzellen waren, und so zu dem besseren Ansprechen auf die Behandlung beigetragen haben. Im Gegensatz dazu ist dieser Effekt bei Tumoren nicht vorhanden, wenn Immunzellen fehlen oder ihre Aktivität durch zusätzliche/andere Mechanismen kompensiert wird.

Tumorzellen können einer Immunreaktion entgehen, indem die Expression tumorspezifischer Antigene oder die entsprechenden Rezeptoren für deren Präsentation reduziert wird. Weiterhin kann die Reaktion von Immunzellen abgeschwächt werden, indem zum Beispiel hemmende Rezeptoren von Immun-Checkpoint Signalwegen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden. Weiterhin kann durch Veränderungen der Tumor-Mikroumgebung die Rekrutierung von Immunzellen verringert werden. Zu beachten ist bei der Betrachtung der karzinogenen Prozesse, dass keine der genannten Möglichkeiten spezifisch aktiviert wird. Vielmehr führen Selektionsprozesse dazu, dass unter einer Gesamtheit an Zellklonen sich diejenigen durchsetzen, in denen die für eine Mikroumgebung vorteilhaftesten Veränderungen vorliegen. Dies bedingt eine zeitliche und räumliche Heterogenität von Tumoren, was von Bedeutung für Behandlung ist. Die Folgen und Auswirkungen eines aktivierten Immunsystems können beträchtlich sein. Daher sind die genannten Prozesse der Immunkontrolle bzw. der Immunevasion essentieller Bestandteil jeder Karzinogenese und äußerst vielversprechende Ziele für immunologische Therapiekonzepte. Der Vorteil gegenüber konventionellen Konzepten liegt in der systemischen Wirksamkeit und den (vergleichsweise) geringen Nebenwirkungen im Vergleich zur Chemotherapie. Der Schlüssel einer erfolgreichen Immuntherapie liegt in der gezielten und dosierten (Re-)Aktivierung von Immunzellen und der Enttarnung von Tumorzellen. 2016 wurden von der US-amerikanischen FDA mit Pembrolizumab und Nivolumab zwei humanisierte bzw. humane monoklonale Antikörper als Immun-Checkpoint-Inhibitoren zugelassen, zunächst als Option zur Zweitlinienbehandlung von Platin-resistenten, rezidivierenden oder metastasierenden HNSCC. Beide Immuntherapeutika binden an PD-1 und verhindern so eine Dämpfung der Immunreaktion durch die Aktivierung des Signalwegs über die auf Tumorzellen exprimierten Liganden PD-L1 und PD-L2. Für HNSCC mit einer hinreichenden PD-L1 Expression (CPS ≥ 1 (kombinierter positiver Score, errechnet aus der Expression auf T- und Tumorzellen) wurde 2019 die

Zulassung von Pembrolizumab auf die Erstlinienbehandlung als Monotherapie durch die FDA ausgeweitet^[231].

Problematisch an einer Immuntherapie ist, wie bei vielen anderen systemisch wirkenden Ansätzen, dass die meisten Signalwege (in unterschiedlichem Umfang und zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten) auch in gesunden Zellen existieren und hierdurch unerwünschte Effekte auftreten können. Weiterhin sind in einer Patientenpopulation relativ wenige spezifische Antigene von Tumoren stabil genug, um für alle Patienten das „eine“ passende Immuntherapeutika bereitstellen zu können. Abgesehen von Virus-assoziierten Tumoren (mit homogener Karzinogenese) werden in den meisten Tumortypen individuelle genetische Veränderungen und entsprechende Neoantigene eine Vielzahl heterogener Tumor-spezifischer Antigene bedingen. Dies macht die Entwicklung erfolgreicher Immuntherapeutika anspruchsvoll, möglicherweise in Zukunft jedoch lösbar, in Anbetracht der heutigen Entwicklungssprünge was Sequenzierungs- und Computertechnologien („künstliche Intelligenz“) angeht. Die Möglichkeiten der Editierung des Genoms mit Hilfe neuer gentechnischer Methoden (wie CRISPR/Cas) eröffnet eine weitere Vielfalt therapeutischer Anwendungen, beispielsweise basierend auf Immunzellen, die durch gentechnische Modifizierungen in die Lage versetzt werden Tumorzellen effektiv zu erkennen und zu bekämpfen. Die Komplexität biologischer Systeme, die Mechanismen der Karzinogenese und ihr Zusammenspiel mit dem Immunsystem erfordern jedoch weitere Forschungsanstrengungen, die ebenfalls individuelle Risikoprofile von Patienten einbeziehen. Nichtsdestotrotz wird die Immuntherapie derzeitige Konzepte der Behandlung in naher Zukunft sicherlich grundlegend verändern. HPV-assoziierte OPSCC könnten sich aufgrund des Mechanismus ihrer Karzinogenese und vergleichsweise homogener Veränderungen besonders gut für die erfolgreiche Anwendung neuer Therapiekonzepte eignen.

3. Zusammenfassende Darstellung

In dieser kumulativen Habilitationsschrift wird die Bedeutung humaner Papillomviren (HPV) in der Kopf-Hals-Onkologie anhand eigener Veröffentlichungen zum Thema und deren wissenschaftlichen Einordnung diskutiert. Dieses Thema ist von allgemeinem Interesse, da die Zahl der Neuerkrankungen an Kopf-Hals-Karzinomen sowohl in Deutschland als auch in vielen anderen Ländern weitgehend konstant bleibt, obwohl der Tabakkonsum als wesentlicher Risikofaktor allgemein rückläufig ist. Lediglich bei einzelnen Sublokalisationen wie dem Larynxkarzinom ist ein Rückgang der Inzidenz nachweisbar. Dieser wird jedoch insgesamt durch eine signifikante Zunahme HPV-assoziiertes Oropharynxkarzinome kompensiert, was anhand eigener Arbeiten auf nationaler Ebene sowie für das regionale Einzugsgebiet der HNO-Klinik Gießen bestätigt werden konnte.

Von den über 200 bekannten HPV-Typen sind aktuell zwölf als karzinogen eingestuft und als kausal für humane Plattenepithelkarzinome wie die der Zervix- und des Oropharynx (OPSCC) anerkannt. Allgemein sind die klassischen Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC geringer ausgeprägt. Weiterhin haben diese Patienten einen besseren allgemeinen Leistungszustand und sind jünger. Allerdings zeigen verschiedenste Studien sowie unsere eigenen Arbeiten, dass Überlagerungen von Risikofaktoren und geographische Unterschiede bestehen. Beispielsweise lag in unseren Untersuchungen das Alter der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC signifikant über dem der Patienten mit HPV-negativen OPSCC, was im Gegensatz zur allgemeinen Erwartung steht. Häufig sind HPV-assoziierte OPSCC charakterisiert durch kleinere Primärtumore, aber eine weiter vorgeschrittene lymphogene Metastasierung. Dennoch ist die Prognose dieser Patienten weitaus besser als bei einem HPV-negativen OPSCC, was wir im Rahmen prognostischer Modellierungen ebenfalls bestätigen konnten.

Mit dem zellulären p16^{INK4a} Protein steht ein zuverlässiger immunhistochemischer Nachweis für HPV-assoziierte OPSCC zur Verfügung, da dieser Tumorsuppressor in HPV-negativen Tumoren üblicherweise nicht nachweisbar ist. Als erster molekularer Marker wurde die p16^{INK4a} Expression in der 8. Version der AJCC/UICC-Klassifikation für OPSCC und CUP^{HNSCC} als Surrogat einer HPV-Assoziation eingeführt. Dennoch zeigen eigene und andere Studien, dass nur unter Einbeziehung eines Nachweises von HPV selbst, beispielsweise der HPV-DNA, eine sichere Unterscheidung von OPSCC-Subgruppen möglich ist, so wie es für die aktuell diskutierte deintensivierte Therapie oder zukünftige individualisierte(re) Konzepte erforderlich ist.

Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 lösen einer Reihe molekularer Veränderungen aus, die in HPV-negativen Tumoren gewöhnlich durch genetische Veränderungen hervorgerufen werden. Das Mutationsprofil von HPV-assoziierten OPSCC kennzeichnet sich entsprechend durch weniger Mutationen, insbesondere von *TP53* und *RB1*, was wir bestätigt konnten. Dennoch sind bei HPV-assoziierten OPSCC manche Signalwege (Zellzyklus, Zellüberleben und Zelldifferenzierung) gehäuft von Mutationen betroffen wie z.B. der *PI3K/AKT/mTOR*-Signalweg. Zusätzlich scheinen metabolische Veränderungen durch virale Onkoproteine hervorgerufen zu werden, die im normalen Replikationszyklus von HPV auftreten aber auch die Karzinogenese begünstigen, beispielsweise die Aktivierung der Glykolyse (Warburg-Effekt) über den HIF-Signalweg, was durch unsere und andere Daten nahegelegt wird.

Mit der Aktivierung der Glykolyse können weitere Dysregulationen wie die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bei HPV-assoziierten OPSCC verbunden sein. Dies könnte der Grund für die in der Regel kleineren Tumoren sein, die im PET-CT zwar klinisch gut erkennbar sind, dennoch aber bereits die typische lymphogene Metastasierung entwickelt haben. Daneben könnte die geringere Größe dieser Tumore eine bessere Oxygenierung bedingen. Dies wiederum verbessert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während einer Strahlentherapie, was ein Grund für das besonders gute Ansprechen HPV-assoziierten OPSCC auf diese Behandlung sein könnte.

Sowohl genetische als auch metabolische Veränderungen können bei HPV-assoziierten OPSCC von diagnostischer und therapeutischer Bedeutung sein. Genetische Veränderungen, insbesondere virale DNA, können im Blut von Tumorpatienten (*liquid biopsy*) nachgewiesen werden, was wir und andere inzwischen belegen konnten. Die Häufigkeit dieser tumorspezifischen DNA in Flüssigbiopsien korreliert mit dem Krankheitsverlauf und kann sowohl in der Nachsorge als auch während der Therapie zur Überwachung des Ansprechens auf die Behandlung genutzt werden. Dieser Aspekt ist vor allem im Hinblick auf die zunehmende Personalisierung der Medizin wichtig, da so auch akute Komplikationen frühzeitig erkannt werden können.

Virale Onkoproteine, insbesondere E5, induzieren bei HPV-assoziierten OPSCC *immune-escape* Mechanismen, wie die Herunterregulierung einer funktionellen HLA Klasse I Expression oder die vermehrte Expression inhibierend wirkender Liganden (wie PD-L1) von Immun-Checkpoint Signalwegen. Dennoch sind HPV-assoziierte OPSCC durch eine Präsenz von Immunzellen gekennzeichnet, insbesondere von NK-Zellen, wie unsere Daten zeigen. Eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts durch die konventionelle Therapie könnte eine systemische anti-Tumor Immunantwort auslösen, die für das wesentlich bessere Gesamtüberleben dieser Patienten mitverantwortlich sein könnte.

Die in dieser Habilitationsschrift diskutierten eigenen Arbeiten zeigen neben einer Reihe weiterer Publikationen der letzten Jahre, dass HPV-assoziierte OPSCC sich grundlegend von den klassischen, Noxen-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen unterscheiden und eine eigenständige Tumorentität darstellen. Angesichts der hier beschriebenen Bedeutung humaner Papillomviren in der Kopf-Hals-Onkologie erscheinen HPV-assoziierte OPSCC aufgrund des spezifischen Mechanismus ihrer Karzinogenese, der vergleichsweise homogenen molekularen Veränderungen und des meist mildereren klinischen Verlaufs besonders prädestiniert zu sein um neue, immunologische Therapiekonzepte zu entwickeln. Die besonderen immunologischen Aspekte der Karzinogenese dieser Tumore und die Tatsache, dass bereits klinische Studien zur deintensivierten Therapie bei HPV-assoziierten OPSCC durchgeführt werden deutet darauf hin, dass diese Patientengruppe mutmaßlich auch als erste von derartigen Therapiekonzepten profitieren könnten.

4. Literaturverzeichnis

1. Erdmann, F.; Spix, C.; Katalinic, A.; Christ, M.; Folkerts, J.; Hansmann, J.; Kranzhöfer, K.; Kunz, B.; Manegold, K.; Penzkofer, A.; et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. *Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)* **2021**, 13. Ausgabe, doi:10.25646/835.
2. de Martel, C.; Plummer, M.; Vignat, J.; Franceschi, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* **2017**, 141, 664-670, doi:10.1002/ijc.30716.
3. Bundesamt, S. *Average consumption of (taxed) cigarettes per day in Germany from 1991 to 2022 (in millions)*; Statistisches Bundesamt: Statista Inc., Accessed November 08, 2023 2023.
4. Wittekindt, C.; Wagner, S.; Bushnak, A.; Prigge, E.S.; von Knebel Doeberitz, M.; Wurdemann, N.; Bernhardt, K.; Pons-Kuhnemann, J.; Maulbecker-Armstrong, C.; Klussmann, J.P. Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prev Res (Phila)* **2019**, 12, 375-382, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098.
5. Haley, C.T.; Mui, U.N.; Vangipuram, R.; Rady, P.L.; Tying, S.K. Human oncoviruses: Mucocutaneous manifestations, pathogenesis, therapeutics, and prevention: Papillomaviruses and Merkel cell polyomavirus. *J Am Acad Dermatol* **2019**, 81, 1-21, doi:10.1016/j.jaad.2018.09.062.
6. Saraiya, M.; Unger, E.R.; Thompson, T.D.; Lynch, C.F.; Hernandez, B.Y.; Lyu, C.W.; Steinau, M.; Watson, M.; Wilkinson, E.J.; Hopenhayn, C.; et al. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst* **2015**, 107, djv086, doi:10.1093/jnci/djv086.
7. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Biological Agents* **2012**, Volume 100B, 255-296.
8. Gupta, B.; Johnson, N.W.; Kumar, N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* **2016**, 91, 13-23, doi:10.1159/000446117.
9. Jamal, A.; King, B.A.; Neff, L.J.; Whitmill, J.; Babb, S.D.; Graffunder, C.M. Current Cigarette Smoking Among Adults - United States, 2005-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2016**, 65, 1205-1211, doi:10.15585/mmwr.mm6544a2.
10. Lampert, T.; von der Lippe, E.; Muters, S. [Prevalence of smoking in the adult population of Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **2013**, 56, 802-808, doi:10.1007/s00103-013-1698-1.
11. Kotz, D.; Bockmann, M.; Kastaun, S. The Use of Tobacco, E-Cigarettes, and Methods to Quit Smoking in Germany. *Dtsch Arztebl Int* **2018**, 115, 235-242, doi:10.3238/arztebl.2018.0235.
12. Commission, E.; Communication, D.-G.f.; Health, D.-G.f.; Safety, F. *Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes – Report*; European Commission: 2021.
13. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. Personal habits and indoor combustions. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **2012**, 100, 1-538.
14. Wagner, S.; Wittekindt, C.; Sharma, S.J.; Wuerdemann, N.; Juttner, T.; Reuschenbach, M.; Prigge, E.S.; von Knebel Doeberitz, M.; Gattenlohner, S.; Burkhardt, E.; Pons-Kuhnemann, J.; Klussmann, J.P. Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* **2017**, 116, 1604-1611, doi:10.1038/bjc.2017.132.
15. Wagner, S.; Prigge, E.S.; Wuerdemann, N.; Reder, H.; Bushnak, A.; Sharma, S.J.; Obermueller, T.; von Knebel Doeberitz, M.; Dreyer, T.; Gattenlohner, S.; Wolf, G.; Pons-Kuhnemann, J.; Wittekindt, C.; Klussmann, J.P. Evaluation of p16(INK4a) expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *Br J Cancer* **2020**, 123, 1114-1122, doi:10.1038/s41416-020-0964-x.
16. Wagner, S.; Langer, C.; Wuerdemann, N.; Reiser, S.; Abing, H.; Pons-Kuhnemann, J.; Prigge, E.S.; von Knebel Doeberitz, M.; Gattenlohner, S.; Waterboer, T.; Schroeder, L.; Arens, C.; Klussmann, J.P.; Wittekindt, C. Predictors for Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck Region. *Cancers (Basel)* **2023**, 15, doi:10.3390/cancers15072167.
17. Wuerdemann, N.; Wittekindt, C.; Sharma, S.J.; Prigge, E.S.; Reuschenbach, M.; Gattenlohner, S.; Klussmann, J.P.; Wagner, S. Risk Factors for Overall Survival Outcome in Surgically Treated Human Papillomavirus-Negative and Positive Patients with Oropharyngeal Cancer. *Oncol Res Treat* **2017**, 40, 320-327, doi:10.1159/000477097.
18. Ang, K.K.; Harris, J.; Wheeler, R.; Weber, R.; Rosenthal, D.I.; Nguyen-Tan, P.F.; Westra, W.H.; Chung, C.H.; Jordan, R.C.; Lu, C.; et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **2010**, 363, 24-35, doi:10.1056/NEJMoa0912217.
19. Rietbergen, M.M.; Witte, B.I.; Velazquez, E.R.; Snijders, P.J.; Bloemena, E.; Speel, E.J.; Brakenhoff, R.H.; Kremer, B.; Lambin, P.; Leemans, C.R. Different prognostic models for different patient populations: validation of a new prognostic model for patients with oropharyngeal cancer in Western Europe. *Br J Cancer* **2015**, 112, 1733-1736, doi:10.1038/bjc.2015.139.
20. Granata, R.; Miceli, R.; Orlandi, E.; Perrone, F.; Cortelazzi, B.; Franceschini, M.; Locati, L.D.; Bossi, P.; Bergamini, C.; Mirabile, A.; et al. Tumor stage, human papillomavirus and smoking status affect the survival of patients with oropharyngeal cancer: an Italian validation study. *Ann Oncol* **2012**, 23, 1832-1837, doi:10.1093/annonc/mdr544.
21. Rietbergen, M.M.; Brakenhoff, R.H.; Bloemena, E.; Witte, B.I.; Snijders, P.J.; Heideman, D.A.; Boon, D.; Koljenovic, S.; Baatenburg-de Jong, R.J.; Leemans, C.R. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol* **2013**, 24, 2740-2745, doi:10.1093/annonc/mdt319.

22. Rios Velazquez, E.; Hoebbers, F.; Aerts, H.J.; Rietbergen, M.M.; Brakenhoff, R.H.; Leemans, R.C.; Speel, E.J.; Straetmans, J.; Kremer, B.; Lambin, P. Externally validated HPV-based prognostic nomogram for oropharyngeal carcinoma patients yields more accurate predictions than TNM staging. *Radiother Oncol* **2014**, *113*, 324-330, doi:10.1016/j.radonc.2014.09.005.
23. American Joint Committee on, C. *AJCC cancer staging manual*, Eighth edition, corrected at 3rd printing ed.; Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Eds.; AJCC, American Joint Committee on Cancer: Chicago, IL, 2017.
24. Bronkhorst, A.J.; Ungerer, V.; Holdenrieder, S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* **2019**, *17*, 100087, doi:10.1016/j.bdq.2019.100087.
25. Reder, H.; Taferner, V.F.; Wittekindt, C.; Brauning, A.; Speel, E.M.; Gattenlohner, S.; Wolf, G.; Klussmann, J.P.; Wuerdemann, N.; Wagner, S. Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Mol Diagn* **2020**, *22*, 1333-1343, doi:10.1016/j.jmoldx.2020.08.002.
26. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
27. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
28. Reder, H.; Wagner, S.; Gamerding, U.; Sandmann, S.; Wuerdemann, N.; Braeuninger, A.; Dugas, M.; Gattenlohner, S.; Klussmann, J.P.; Wittekindt, C. Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure. *Oral Oncol* **2019**, *93*, 59-65, doi:10.1016/j.oraloncology.2019.04.013.
29. Reder, H.; Wagner, S.; Wuerdemann, N.; Langer, C.; Sandmann, S.; Braeuninger, A.; Dugas, M.; Gattenlohner, S.; Wittekindt, C.; Klussmann, J.P. Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status. *Cancer Med* **2021**, *10*, 1347-1356, doi:10.1002/cam4.3741.
30. Knuth, J.; Sharma, S.J.; Wurdemann, N.; Holler, C.; Garvalov, B.K.; Acker, T.; Wittekindt, C.; Wagner, S.; Klussmann, J.P. Hypoxia-inducible factor-1alpha activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncotarget* **2017**, *8*, 89681-89691, doi:10.18632/oncotarget.20813.
31. Sharma, S.J.; Wittekindt, C.; Knuth, J.; Steiner, D.; Wuerdemann, N.; Laur, M.; Kroll, T.; Wagner, S.; Klussmann, J.P. Intraindividual homogeneity of (18)F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. *Oral Oncol* **2017**, *73*, 166-171, doi:10.1016/j.oraloncology.2017.08.019.
32. Ashrafi, G.H.; Haghshenas, M.; Marchetti, B.; Campo, M.S. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* **2006**, *119*, 2105-2112, doi:10.1002/ijc.22089.
33. Campo, M.S.; Graham, S.V.; Cortese, M.S.; Ashrafi, G.H.; Araibi, E.H.; Dornan, E.S.; Miners, K.; Nunes, C.; Man, S. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* **2010**, *407*, 137-142, doi:10.1016/j.virol.2010.07.044.
34. Wagner, S.; Wittekindt, C.; Reuschenbach, M.; Hennig, B.; Thevarajah, M.; Wurdemann, N.; Prigge, E.S.; von Knebel Doeberitz, M.; Dreyer, T.; Gattenlohner, S.; Klussmann, J.P. CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **2016**, *138*, 2263-2273, doi:10.1002/ijc.29962.
35. Wuerdemann, N.; Gultekin, S.E.; Putz, K.; Wittekindt, C.; Huebbers, C.U.; Sharma, S.J.; Eckel, H.; Schubotz, A.B.; Gattenlohner, S.; Buttner, R.; Speel, E.J.; Klussmann, J.P.; Wagner, S.; Quaas, A. PD-L1 Expression and a High Tumor Infiltrate of CD8+ Lymphocytes Predict Outcome in Patients with Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21155228.
36. Yoo, S.H.; Keam, B.; Ock, C.Y.; Kim, S.; Han, B.; Kim, J.W.; Lee, K.W.; Jeon, Y.K.; Jung, K.C.; Chung, E.J.; Kwon, S.K.; Ahn, S.H.; Sung, M.W.; Heo, D.S. Prognostic value of the association between MHC class I downregulation and PD-L1 upregulation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* **2019**, *9*, 7680, doi:10.1038/s41598-019-44206-2.
37. Sottile, R.; Pangigadde, P.N.; Tan, T.; Anichini, A.; Sabbatino, F.; Trecroci, F.; Favoino, E.; Orgiano, L.; Roberts, J.; Ferrone, S.; Karre, K.; Colucci, F.; Carbone, E. HLA class I downregulation is associated with enhanced NK-cell killing of melanoma cells with acquired drug resistance to BRAF inhibitors. *Eur J Immunol* **2016**, *46*, 409-419, doi:10.1002/eji.201445289.
38. Bellucci, R.; Martin, A.; Bommarito, D.; Wang, K.; Hansen, S.H.; Freeman, G.J.; Ritz, J. Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e1008824, doi:10.1080/2162402X.2015.1008824.
39. Lee, Y.S.; Heo, W.; Choi, H.J.; Cho, H.R.; Nam, J.H.; Ki, Y.G.; Lee, H.R.; Son, W.C.; Park, Y.S.; Kang, C.D.; Bae, J. An inhibitor of programmed death ligand 1 enhances natural killer cell-mediated immunity against malignant melanoma cells. *PLoS One* **2021**, *16*, e0248870, doi:10.1371/journal.pone.0248870.
40. zur Hausen, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **1976**, *36*, 794.
41. Syrjanen, K.J.; Syrjanen, S.M. Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **1981**, *43*, 181-194, doi:10.1159/000275538.
42. Syrjanen, K.; Pyrhonen, S.; Aukee, S.; Koskela, E. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV). *Diagn Histopathol* **1982**, *5*, 291-296.
43. Arndt, O.; Bauer, I.; Brock, J. [Use of the Dot-Blot technique in the detection of human papillomavirus(HPV) deoxyribonucleic acid (DNA) in malignant tumors of the oropharynx]. *Laryngorhinootologie* **1991**, *70*, 441-444, doi:10.1055/s-2007-998072.

44. Chaturvedi, A.K.; Engels, E.A.; Anderson, W.F.; Gillison, M.L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 612-619, doi:10.1200/JCO.2007.14.1713.
45. Ryerson, A.B.; Peters, E.S.; Coughlin, S.S.; Chen, V.W.; Gillison, M.L.; Reichman, M.E.; Wu, X.; Chaturvedi, A.K.; Kawaoka, K. Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998-2003. *Cancer* **2008**, *113*, 2901-2909, doi:10.1002/cncr.23745.
46. Chaturvedi, A.K.; Engels, E.A.; Pfeiffer, R.M.; Hernandez, B.Y.; Xiao, W.; Kim, E.; Jiang, B.; Goodman, M.T.; Sibug-Saber, M.; Cozen, W.; et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 4294-4301, doi:10.1200/JCO.2011.36.4596.
47. Kuhdari, P.; Previato, S.; Giordani, M.; Biavati, P.; Ferretti, S.; Gabutti, G. The burden of HPV-related diseases in Italy, 2001-12. *J Public Health (Oxf)* **2017**, *39*, 730-737, doi:10.1093/pubmed/fox025.
48. Jansen, L.; Buttman-Schweiger, N.; Listl, S.; Ressing, M.; Hollecsek, B.; Katalinic, A.; Luttmann, S.; Kraywinkel, K.; Brenner, H.; Group, G.C.S.W. Differences in incidence and survival of oral cavity and pharyngeal cancers between Germany and the United States depend on the HPV-association of the cancer site. *Oral Oncol* **2018**, *76*, 8-15, doi:10.1016/j.oraloncology.2017.11.015.
49. Owosho, A.A.; Wiley, R.; Stansbury, T.; Gbadamosi, S.O.; Ryder, J.S. Trends in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Incidence, Vermont 1999-2013. *J Community Health* **2018**, *43*, 731-737, doi:10.1007/s10900-018-0477-1.
50. Henneman, R.; Van Monsjou, H.S.; Verhagen, C.V.; Van Velthuysen, M.L.; Ter Haar, N.T.; Osse, E.M.; Lopez-Yurda, M.I.; Balm, A.J.; Van Den Brekel, M.W. Incidence Changes of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma and Effects on Survival in the Netherlands Cancer Institute, 1980-2009. *Anticancer Res* **2015**, *35*, 4015-4022.
51. Baboci, L.; Holzinger, D.; Boscolo-Rizzo, P.; Tirelli, G.; Spinato, R.; Lupato, V.; Fuson, R.; Schmitt, M.; Michel, A.; Halec, G.; Da Mosto, M.C.; Pawlita, M.; Del Mistro, A. Low prevalence of HPV-driven head and neck squamous cell carcinoma in North-East Italy. *Papillomavirus Res* **2016**, *2*, 133-140, doi:10.1016/j.pvr.2016.07.002.
52. Carlander, A.F.; Gronhoj Larsen, C.; Jensen, D.H.; Garnaes, E.; Kiss, K.; Andersen, L.; Olsen, C.H.; Franzmann, M.; Hogdall, E.; Kjaer, S.K.; et al. Continuing rise in oropharyngeal cancer in a high HPV prevalence area: A Danish population-based study from 2011 to 2014. *Eur J Cancer* **2017**, *70*, 75-82, doi:10.1016/j.ejca.2016.10.015.
53. Fossum, G.H.; Lie, A.K.; Jepsen, P.; Sandlie, L.E.; Mork, J. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma in South-Eastern Norway: prevalence, genotype, and survival. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **2017**, *274*, 4003-4010, doi:10.1007/s00405-017-4748-8.
54. Drolet, M.; Benard, E.; Perez, N.; Brisson, M.; Group, H.P.V.V.I.S. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2019**, *394*, 497-509, doi:10.1016/S0140-6736(19)30298-3.
55. Rieck, T.; Feig, M.; Siedler, A.; Wichmann, O. Aktuelles aus der KV-Impfsurveillance – Impfquoten ausgewählter Schutzimpfungen in Deutschland. **2018**, doi:10.17886/EpiBull-2018-001.3.
56. Rohrmann, S.; Hermann, S. Onkologische Prävention – inwiefern ist die Ernährung entscheidend? *Der Onkologe* **2021**, *27*, 100-107, doi:10.1007/s00761-020-00894-4.
57. Reitsma, M.; Kendrick, P.; Anderson, J.; Arian, N.; Feldman, R.; Gakidou, E.; Gupta, V. Reexamining Rates of Decline in Lung Cancer Risk after Smoking Cessation. A Meta-analysis. *Ann Am Thorac Soc* **2020**, *17*, 1126-1132, doi:10.1513/AnnalsATS.201909-659OC.
58. Feller, L.; Chandran, R.; Khammissa, R.A.; Meyerov, R.; Lemmer, J. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ* **2013**, *68*, 176-180.
59. Salaspuro, M. Local Acetaldehyde: Its Key Role in Alcohol-Related Oropharyngeal Cancer. *Visc Med* **2020**, *36*, 167-173, doi:10.1159/000507234.
60. Amini, A.; Jasem, J.; Jones, B.L.; Robin, T.P.; McDermott, J.D.; Bhatia, S.; Raben, D.; Jimeno, A.; Bowles, D.W.; Karam, S.D. Predictors of overall survival in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using the National Cancer Data Base. *Oral Oncol* **2016**, *56*, 1-7, doi:10.1016/j.oraloncology.2016.02.011.
61. O'Sullivan, B.; Huang, S.H.; Siu, L.L.; Waldron, J.; Zhao, H.; Perez-Ordóñez, B.; Weinreb, I.; Kim, J.; Ringash, J.; Bayley, A.; et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 543-550, doi:10.1200/JCO.2012.44.0164.
62. Mehanna, H.; Taberna, M.; von Buchwald, C.; Tous, S.; Brooks, J.; Mena, M.; Morey, F.; Gronhoj, C.; Rasmussen, J.H.; Garset-Zamani, M.; et al. Prognostic implications of p16 and HPV discordance in oropharyngeal cancer (HNCIG-EPIC-OPC): a multicentre, multinational, individual patient data analysis. *Lancet Oncol* **2023**, *24*, 239-251, doi:10.1016/S1470-2045(23)00013-X.
63. Mahal, B.A.; Catalano, P.J.; Haddad, R.I.; Hanna, G.J.; Kass, J.I.; Schoenfeld, J.D.; Tishler, R.B.; Margalit, D.N. Incidence and Demographic Burden of HPV-Associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2019**, *28*, 1660-1667, doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0038.
64. Isaacson Wechsler, E.; Wang, Q.; Roberts, I.; Pagliarulo, E.; Jackson, D.; Untersperger, C.; Coleman, N.; Griffin, H.; Doorbar, J. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J Virol* **2012**, *86*, 6358-6364, doi:10.1128/JVI.07069-11.
65. Alvarez-Salas, L.M.; Cullinan, A.E.; Siwkowski, A.; Hampel, A.; DiPaolo, J.A. Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 1189-1194, doi:10.1073/pnas.95.3.1189.

66. DiPaolo, J.A.; Popescu, N.C.; Alvarez, L.; Woodworth, C.D. Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev Oncog* **1993**, *4*, 337-360.
67. Hawley-Nelson, P.; Vousden, K.H.; Hubbert, N.L.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* **1989**, *8*, 3905-3910, doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x.
68. von Knebel Doeberitz, M.; Oltersdorf, T.; Schwarz, E.; Gissmann, L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* **1988**, *48*, 3780-3786.
69. Cox, D.R. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **1972**, *34*, 187-202, doi:<https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x>.
70. Broglie, M.A.; Stoeckli, S.J.; Sauter, R.; Pasche, P.; Reinhard, A.; de Leval, L.; Huber, G.F.; Pezier, T.F.; Soltermann, A.; Giger, R.; et al. Impact of human papillomavirus on outcome in patients with oropharyngeal cancer treated with primary surgery. *Head Neck* **2017**, *39*, 2004-2015, doi:10.1002/hed.24865.
71. George, M.; Smith, A.; Sabesan, S.; Ranmuthugala, G. Physical Comorbidities and Their Relationship with Cancer Treatment and Its Outcomes in Older Adult Populations: Systematic Review. *JMIR Cancer* **2021**, *7*, e26425, doi:10.2196/26425.
72. Maltoni, R.; Ravaoli, S.; Bronte, G.; Mazza, M.; Cerchione, C.; Massa, I.; Balzi, W.; Cortesi, M.; Zanoni, M.; Bravaccini, S. Chronological age or biological age: What drives the choice of adjuvant treatment in elderly breast cancer patients? *Transl Oncol* **2022**, *15*, 101300, doi:10.1016/j.tranon.2021.101300.
73. Amr, S.; Ioffe, D.; Suzuki, I.; Mehra, R.; Cullen, K.; Goloubeva, O. Treatment modalities, adverse events, and survival outcomes in older patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **2021**, *43*, 3935-3945, doi:10.1002/hed.26893.
74. O'Connor, T.L.; Edge, S.B.; Kossoff, E.B.; Groman, A.; Wilding, G.E.; Ademuyiwa, F.O.; Levine, E.G.; Watroba, N.; Ngamphaiboon, N. Factors affecting the delivery of adjuvant/neoadjuvant chemotherapy in older women with breast cancer. *Journal of Geriatric Oncology* **2012**, *3*, 320-328, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgo.2012.06.006>.
75. Sharma, P.; Alsharif, S.; Fallatah, A.; Chung, B.M. Intermediate Filaments as Effectors of Cancer Development and Metastasis: A Focus on Keratins, Vimentin, and Nestin. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8050497.
76. Fillies, T.; Werkmeister, R.; Packeisen, J.; Brandt, B.; Morin, P.; Weingart, D.; Joos, U.; Buerger, H. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 10, doi:10.1186/1471-2407-6-10.
77. Gires, O.; Mack, B.; Rauch, J.; Matthias, C. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *343*, 252-259, doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.139.
78. Kuburich, N.A.; den Hollander, P.; Pietz, J.T.; Mani, S.A. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Semin Cancer Biol* **2022**, *86*, 816-826, doi:10.1016/j.semcancer.2021.12.006.
79. Chernock, R.D.; El-Mofty, S.K.; Thorstad, W.L.; Parvin, C.A.; Lewis, J.S., Jr. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol* **2009**, *3*, 186-194, doi:10.1007/s12105-009-0126-1.
80. Klussmann, J.P.; Weissenborn, S.J.; Wieland, U.; Dries, V.; Eckel, H.E.; Pfister, H.J.; Fuchs, P.G. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* **2003**, *192*, 129-132, doi:10.1007/s00430-002-0126-1.
81. Wilczynski, S.P.; Lin, B.T.; Xie, Y.; Paz, I.B. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **1998**, *152*, 145-156.
82. Boxberg, M.; Bollwein, C.; Johrens, K.; Kuhn, P.H.; Haller, B.; Steiger, K.; Wolff, K.D.; Kolk, A.; Jesinghaus, M.; Weichert, W. Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance. *J Clin Pathol* **2019**, *72*, 285-294, doi:10.1136/jclinpath-2018-205454.
83. Muller, S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol* **2017**, *11*, 33-40, doi:10.1007/s12105-017-0792-3.
84. International Histological Classification of Tumours; Naggar, A.K.e.; Chan, J.K.C.; Grandis, J.R.; Takata, T.; Slootweg, P.J.; International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of head and neck tumours*, 4th edition ed.; 2017; p. 347 Seiten.
85. Rubin Grandis, J.; Melhem, M.F.; Gooding, W.E.; Day, R.; Holst, V.A.; Wagener, M.M.; Drenning, S.D.; Twardy, D.J. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* **1998**, *90*, 824-832, doi:10.1093/jnci/90.11.824.
86. Zhu, X.; Zhang, F.; Zhang, W.; He, J.; Zhao, Y.; Chen, X. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* **2013**, *108*, 387-397, doi:10.1002/jso.23406.
87. Faber, A.; Barth, C.; Hormann, K.; Kassner, S.; Schultz, J.D.; Sommer, U.; Stern-Straeter, J.; Thorn, C.; Goessler, U.R. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **2011**, *26*, 321-326, doi:10.3892/or.2011.1322.
88. Yu, S.S.; Cirillo, N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 65-73, doi:10.1002/jcp.28963.
89. Zhang, Q.; Shi, S.; Yen, Y.; Brown, J.; Ta, J.Q.; Le, A.D. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* **2010**, *289*, 151-160, doi:10.1016/j.canlet.2009.08.010.
90. Qian, X.; Wagner, S.; Ma, C.; Coordes, A.; Gekeler, J.; Klussmann, J.P.; Hummel, M.; Kaufmann, A.M.; Albers, A.E. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced,

- metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **2014**, *140*, 1151-1158, doi:10.1007/s00432-014-1685-4.
91. Qian, X.; Wagner, S.; Ma, C.; Klussmann, J.P.; Hummel, M.; Kaufmann, A.M.; Albers, A.E. ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status. *Oncol Rep* **2013**, *29*, 1777-1784, doi:10.3892/or.2013.2340.
 92. Toledo-Guzman, M.E.; Bigoni-Ordonez, G.D.; Ibanez Hernandez, M.; Ortiz-Sanchez, E. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells* **2018**, *10*, 183-195, doi:10.4252/wjsc.v10.i12.183.
 93. Visvader, J.E.; Lindeman, G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 755-768, doi:10.1038/nrc2499.
 94. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Human Papillomaviruses* **2007**, Volume 90, 1-637.
 95. Kandoth, C.; McLellan, M.D.; Vandin, F.; Ye, K.; Niu, B.; Lu, C.; Xie, M.; Zhang, Q.; McMichael, J.F.; Wyczalkowski, M.A.; et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **2013**, *502*, 333-339, doi:10.1038/nature12634.
 96. Bouaoun, L.; Sonkin, D.; Ardin, M.; Hollstein, M.; Byrnes, G.; Zavadil, J.; Olivier, M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat* **2016**, *37*, 865-876, doi:10.1002/humu.23035.
 97. Sullivan, K.D.; Galbraith, M.D.; Andrysiak, Z.; Espinosa, J.M. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 133-143, doi:10.1038/cdd.2017.174.
 98. Lain, S.; Lane, D. Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *Eur J Cancer* **2003**, *39*, 1053-1060, doi:10.1016/s0959-8049(03)00063-7.
 99. Linzer, D.I.; Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **1979**, *17*, 43-52, doi:10.1016/0092-8674(79)90293-9.
 100. Lane, D.P.; Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **1979**, *278*, 261-263, doi:10.1038/278261a0.
 101. Li, D.; Marchenko, N.D.; Schulz, R.; Fischer, V.; Velasco-Hernandez, T.; Talos, F.; Moll, U.M. Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* **2011**, *9*, 577-588, doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0534.
 102. Terzian, T.; Suh, Y.A.; Iwakuma, T.; Post, S.M.; Neumann, M.; Lang, G.A.; Van Pelt, C.S.; Lozano, G. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev* **2008**, *22*, 1337-1344, doi:10.1101/gad.1662908.
 103. Katzenellenbogen, R.A.; Egelkrout, E.M.; Vliet-Gregg, P.; Gewin, L.C.; Gafken, P.R.; Galloway, D.A. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol* **2007**, *81*, 3786-3796, doi:10.1128/JVI.02007-06.
 104. Gewin, L.; Myers, H.; Kiyono, T.; Galloway, D.A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* **2004**, *18*, 2269-2282, doi:10.1101/gad.1214704.
 105. McLaughlin-Drubin, M.E.; Park, D.; Munger, K. Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 16175-16180, doi:10.1073/pnas.1310432110.
 106. Li, M.; Yang, J.; Liu, K.; Yang, J.; Zhan, X.; Wang, L.; Shen, X.; Chen, J.; Mao, Z. p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis. *J Cancer* **2020**, *11*, 1457-1467, doi:10.7150/jca.35479.
 107. Xiao, Z.; He, Y.; Liu, C.; Xiang, L.; Yi, J.; Wang, M.; Shen, T.; Shen, L.; Xue, Y.; Shi, H.; Liu, P. Targeting P16INK4A in uterine serous carcinoma through inhibition of histone demethylation. *Oncol Rep* **2019**, *41*, 2667-2678, doi:10.3892/or.2019.7067.
 108. Klingenberg, B.; Hafkamp, H.C.; Haesevoets, A.; Manni, J.J.; Slootweg, P.J.; Weissenborn, S.J.; Klussmann, J.P.; Speel, E.J. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology* **2010**, *56*, 957-967, doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03576.x.
 109. Begum, S.; Cao, D.; Gillison, M.; Zahurak, M.; Westra, W.H. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 5694-5699, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0587.
 110. Cao, D.; Begum, S.; Ali, S.Z.; Westra, W.H. Expression of p16 in benign and malignant cystic squamous lesions of the neck. *Hum Pathol* **2010**, *41*, 535-539, doi:10.1016/j.humpath.2009.09.006.
 111. Pai, R.K.; Erickson, J.; Pourmand, N.; Kong, C.S. p16(INK4A) immunohistochemical staining may be helpful in distinguishing branchial cleft cysts from cystic squamous cell carcinomas originating in the oropharynx. *Cancer* **2009**, *117*, 108-119, doi:10.1002/cncy.20001.
 112. Shintani, S.; Mihara, M.; Nakahara, Y.; Kiyota, A.; Ueyama, Y.; Matsumura, T.; Wong, D.T. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* **2002**, *38*, 235-243, doi:10.1016/s1368-8375(01)00048-3.
 113. Antony, V.M.; Kakkar, A.; Sikka, K.; Thakar, A.; Deo, S.V.S.; Bishop, J.A.; Jain, D. p16 Immunoexpression in sinonasal and nasopharyngeal adenoid cystic carcinomas: a potential pitfall in ruling out HPV-related multiphenotypic sinonasal carcinoma. *Histopathology* **2020**, *77*, 989-993, doi:10.1111/his.14212.
 114. Wang, Y.; Tian, Y.; Lin, J.; Chen, L.; Wang, L.; Hao, P.; Han, R.; Ying, M.; Li, X.; Tang, X. Assessment of p16 expression and HPV infection in adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland. *Mol Vis* **2018**, *24*, 143-152.
 115. Stagner, A.M.; Afrogheh, A.H.; Jakobiec, F.A.; Iacob, C.E.; Grossniklaus, H.E.; Deshpande, V.; Maske, C.; Hiss, D.C.; Faquin, W.C. p16 Expression Is Not a Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomavirus

- Infection in Periocular Sebaceous Carcinoma. *Am J Ophthalmol* **2016**, *170*, 168-175, doi:10.1016/j.ajo.2016.07.012.
116. Prigge, E.S.; Toth, C.; Dyckhoff, G.; Wagner, S.; Muller, F.; Wittekindt, C.; Freier, K.; Plinkert, P.; Hoffmann, J.; Vinokurova, S.; Klussmann, J.P.; von Knebel Doeberitz, M.; Reuschenbach, M. p16(INK4a) /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. *Int J Cancer* **2015**, *136*, 1589-1599, doi:10.1002/ijc.29130.
117. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **2001**, *11*, S27-31, doi:10.1016/s0962-8924(01)02151-1.
118. Collado, M.; Blasco, M.A.; Serrano, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **2007**, *130*, 223-233, doi:10.1016/j.cell.2007.07.003.
119. Reuschenbach, M.; von Knebel Doeberitz, M. Diagnostic tests for the detection of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Curr Pharm Des* **2013**, *19*, 1358-1370.
120. Bigelow, E.O.; Seiwert, T.Y.; Fakhry, C. Deintensification of treatment for human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: Current state and future directions. *Oral Oncol* **2020**, *105*, 104652, doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104652.
121. Mehanna, H.; Robinson, M.; Hartley, A.; Kong, A.; Foran, B.; Fulton-Lieuw, T.; Dalby, M.; Mistry, P.; Sen, M.; O'Toole, L.; et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* **2019**, *393*, 51-60, doi:10.1016/S0140-6736(18)32752-1.
122. Hoffmann, M.; Tribius, S.; Quabius, E.S.; Henry, H.; Pfannenschmidt, S.; Burkhardt, C.; Gorogh, T.; Halec, G.; Hoffmann, A.S.; Kahn, T.; Rocken, C.; Haag, J.; Waterboer, T.; Schmitt, M. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett* **2012**, *323*, 88-96, doi:10.1016/j.canlet.2012.03.033.
123. Mena, M.; Taberna, M.; Tous, S.; Marquez, S.; Clavero, O.; Quiros, B.; Lloveras, B.; Alejo, M.; Leon, X.; Quer, M.; et al. Double positivity for HPV-DNA/p16(ink4a) is the biomarker with strongest diagnostic accuracy and prognostic value for human papillomavirus related oropharyngeal cancer patients. *Oral Oncol* **2018**, *78*, 137-144, doi:10.1016/j.oraloncology.2018.01.010.
124. Boscolo-Rizzo, P.; Pawlita, M.; Holzinger, D. From HPV-positive towards HPV-driven oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cancer Treat Rev* **2016**, *42*, 24-29, doi:10.1016/j.ctrv.2015.10.009.
125. Nauta, I.H.; Rietbergen, M.M.; van Bokhoven, A.; Bloemena, E.; Lissenberg-Witte, B.I.; Heideman, D.A.M.; Baatenburg de Jong, R.J.; Brakenhoff, R.H.; Leemans, C.R. Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol* **2018**, *29*, 1273-1279, doi:10.1093/annonc/mdy060.
126. Mirghani, H.; Amen, F.; Moreau, F.; Guigay, J.; Ferchiou, M.; Melkane, A.E.; Hartl, D.M.; Lacau St Guily, J. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol* **2014**, *50*, 1-9, doi:10.1016/j.oraloncology.2013.10.008.
127. Reuschenbach, M.; Kansy, K.; Garbe, K.; Vinokurova, S.; Flechtenmacher, C.; Toth, C.; Prigge, E.S.; Thiele, O.C.; Reinert, S.; Hoffmann, J.; von Knebel Doeberitz, M.; Freier, K. Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany. *Oral Oncol* **2013**, *49*, 937-942, doi:10.1016/j.oraloncology.2013.03.451.
128. Lingen, M.W.; Xiao, W.; Schmitt, A.; Jiang, B.; Pickard, R.; Kreinbrink, P.; Perez-Ordóñez, B.; Jordan, R.C.; Gillison, M.L. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* **2013**, *49*, 1-8, doi:10.1016/j.oraloncology.2012.07.002.
129. Kouvousi, M.; Xesfyngi, D.; Tsimplaki, E.; Argyri, E.; Ioannidou, G.; Ploxoru, M.; Lazaris, A.C.; Patsouris, E.; Panotopoulou, E. Prevalence of human papillomavirus in 45 greek patients with oral cancer. *J Oncol* **2013**, *2013*, 756510, doi:10.1155/2013/756510.
130. Shyamsundar, V.; Thangaraj, S.V.; Krishnamurthy, A.; Vimal, S.; Kesavan, P.; Babu, A.; Kmk, M.; Ramshankar, V. Exome Sequencing with Validations and Expression of p16/CDKN2A Shows no Association with HPV in Oral Cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* **2022**, *23*, 191-200, doi:10.31557/APJCP.2022.23.1.191.
131. Burrell, R.A.; McGranahan, N.; Bartek, J.; Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **2013**, *501*, 338-345, doi:10.1038/nature12625.
132. Zhao, H.; Liu, X.; Yu, L.; Lin, S.; Zhang, C.; Xu, H.; Leng, Z.; Huang, W.; Lei, J.; Li, T.; Li, J.; Yang, F.; Wang, L. Comprehensive landscape of epigenetic-dysregulated lncRNAs reveals a profound role of enhancers in carcinogenesis in BC subtypes. *Mol Ther Nucleic Acids* **2021**, *23*, 667-681, doi:10.1016/j.omtn.2020.12.024.
133. Persi, E.; Wolf, Y.I.; Horn, D.; Ruppén, E.; Demichelis, F.; Gatenby, R.A.; Gillies, R.J.; Koonin, E.V. Mutation-selection balance and compensatory mechanisms in tumour evolution. *Nat Rev Genet* **2021**, *22*, 251-262, doi:10.1038/s41576-020-00299-4.
134. Schiavetto, C.M.; de Abreu, P.M.; von Zeidler, S.V.; de Jesus, L.M.; Carvalho, R.S.; Cirino, M.T.; Carloni, A.C.; Oliveira, C.; Scapulatempo-Neto, C.; de Almeida, G.C.; de Menezes, N.S.; Carvalho, A.L.; Reis, R.M.; de Carvalho, A.C. Human Papillomavirus DNA Detection by Droplet Digital PCR in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumor Tissue from Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Patients. *Mol Diagn Ther* **2021**, *25*, 59-70, doi:10.1007/s40291-020-00502-6.
135. Martins, I.; Ribeiro, I.P.; Jorge, J.; Goncalves, A.C.; Sarmiento-Ribeiro, A.B.; Melo, J.B.; Carreira, I.M. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. *Genes (Basel)* **2021**, *12*, doi:10.3390/genes12030349.
136. Lone, S.N.; Nisar, S.; Masoodi, T.; Singh, M.; Rizwan, A.; Hashem, S.; El-Rifai, W.; Bedognetti, D.; Batra, S.K.; Haris, M.; Bhat, A.A.; Macha, M.A. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer* **2022**, *21*, 79, doi:10.1186/s12943-022-01543-7.

137. Perumal, V.; Corica, T.; Dharmarajan, A.M.; Sun, Z.; Dhaliwal, S.S.; Dass, C.R.; Dass, J. Circulating Tumour Cells (CTC), Head and Neck Cancer and Radiotherapy; Future Perspectives. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11030367.
138. Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D.A. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* **2011**, *192*, 373-382, doi:10.1083/jcb.201010021.
139. Nikanjam, M.; Kato, S.; Kurzrock, R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* **2022**, *15*, 131, doi:10.1186/s13045-022-01351-y.
140. You, J.S.; Jones, P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* **2012**, *22*, 9-20, doi:10.1016/j.ccr.2012.06.008.
141. Shen, H.; Laird, P.W. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* **2013**, *153*, 38-55, doi:10.1016/j.cell.2013.03.008.
142. Stransky, N.; Egloff, A.M.; Tward, A.D.; Kostic, A.D.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Kryukov, G.V.; Lawrence, M.S.; Sougnez, C.; McKenna, A.; et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **2011**, *333*, 1157-1160, doi:10.1126/science.1208130.
143. Agrawal, N.; Frederick, M.J.; Pickering, C.R.; Bettegowda, C.; Chang, K.; Li, R.J.; Fakhry, C.; Xie, T.X.; Zhang, J.; Wang, J.; et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **2011**, *333*, 1154-1157, doi:10.1126/science.1206923.
144. Lechner, M.; Frampton, G.M.; Fenton, T.; Feber, A.; Palmer, G.; Jay, A.; Pillay, N.; Forster, M.; Cronin, M.T.; Lipson, D.; et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med* **2013**, *5*, 49, doi:10.1186/gm453.
145. Seiwert, T.Y.; Zuo, Z.; Keck, M.K.; Khattri, A.; Pedomallu, C.S.; Stricker, T.; Brown, C.; Pugh, T.J.; Stojanov, P.; Cho, J.; et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 632-641, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3310.
146. Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576-582, doi:10.1038/nature14129.
147. Leemans, C.R.; Snijders, P.J.F.; Brakenhoff, R.H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 269-282, doi:10.1038/nrc.2018.11.
148. Froimchuk, E.; Jang, Y.; Ge, K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene* **2017**, *627*, 337-342, doi:10.1016/j.gene.2017.06.056.
149. Halbert, C.L.; Demers, G.W.; Galloway, D.A. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* **1992**, *66*, 2125-2134, doi:10.1128/JVI.66.4.2125-2134.1992.
150. Halbert, C.L.; Demers, G.W.; Galloway, D.A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* **1991**, *65*, 473-478, doi:10.1128/JVI.65.1.473-478.1991.
151. Hudson, J.B.; Bedell, M.A.; McCance, D.J.; Laiminis, L.A. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol* **1990**, *64*, 519-526, doi:10.1128/JVI.64.2.519-526.1990.
152. Marur, S.; Forastiere, A.A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* **2016**, *91*, 386-396, doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017.
153. Gronhoj, C.; Jakobsen, K.K.; Jensen, D.H.; Rasmussen, J.; Andersen, E.; von Buchwald, C. Pattern of and survival following loco-regional and distant recurrence in patients with HPV+ and HPV- oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based study. *Oral Oncol* **2018**, *83*, 127-133, doi:10.1016/j.oraloncology.2018.06.012.
154. Asheer, J.; Jensen, J.S.; Gronhoj, C.; Jakobsen, K.K.; Buchwald, C.V. Rate of locoregional recurrence among patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma with known HPV status: a systematic review. *Acta Oncol* **2020**, *59*, 1131-1136, doi:10.1080/0284186X.2020.1759822.
155. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809.
156. Graves, E.E.; Hicks, R.J.; Binns, D.; Bressel, M.; Le, Q.T.; Peters, L.; Young, R.J.; Rischin, D. Quantitative and qualitative analysis of [(18)F]FDG and [(18)F]FAZA positron emission tomography of head and neck cancers and associations with HPV status and treatment outcome. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2016**, *43*, 617-625, doi:10.1007/s00259-015-3247-7.
157. Nagao, A.; Kobayashi, M.; Koyasu, S.; Chow, C.C.T.; Harada, H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20020238.
158. Forsythe, J.A.; Jiang, B.H.; Iyer, N.V.; Agani, F.; Leung, S.W.; Koos, R.D.; Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 4604-4613, doi:10.1128/MCB.16.9.4604.
159. Li, J.; Li, S.X.; Gao, X.H.; Zhao, L.F.; Du, J.; Wang, T.Y.; Wang, L.; Zhang, J.; Wang, H.Y.; Dong, R.; Guo, Z.Y. HIF1A and VEGF regulate each other by competing endogenous RNA mechanism and involve in the pathogenesis of peritoneal fibrosis. *Pathol Res Pract* **2019**, *215*, 644-652, doi:10.1016/j.prp.2018.12.022.
160. Hong, W.X.; Hu, M.S.; Esquivel, M.; Liang, G.Y.; Rennert, R.C.; McArdle, A.; Paik, K.J.; Duscher, D.; Gurtner, G.C.; Lorenz, H.P.; Longaker, M.T. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2014**, *3*, 390-399, doi:10.1089/wound.2013.0520.
161. Noch, E.; Khalili, K. Oncogenic viruses and tumor glucose metabolism: like kids in a candy store. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 14-23, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0517.
162. Bodily, J.M.; Mehta, K.P.; Laimins, L.A. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer Res* **2011**, *71*, 1187-1195, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2626.

163. Cuninghame, S.; Jackson, R.; Zehbe, I. Hypoxia-inducible factor 1 and its role in viral carcinogenesis. *Virology* **2014**, *456-457*, 370-383, doi:10.1016/j.virol.2014.02.027.
164. Nakamura, M.; Bodily, J.M.; Beglin, M.; Kyo, S.; Inoue, M.; Laimins, L.A. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology* **2009**, *387*, 442-448, doi:10.1016/j.virol.2009.02.036.
165. Reviron, M.; Janvier, D.; Comte, S.; Paysant, J. A c antigen not recognized by a monoclonal anti-c reagent. *Transfusion* **1989**, *29*, 464, doi:10.1046/j.1537-2995.1989.29589284152.x.
166. Brown, D.R.; Bryan, J.T. Abnormalities of cornified cell envelopes isolated from human papillomavirus type 11-infected genital epithelium. *Virology* **2000**, *271*, 65-70, doi:10.1006/viro.2000.0317.
167. Loh, C.Y.; Chai, J.Y.; Tang, T.F.; Wong, W.F.; Sethi, G.; Shanmugam, M.K.; Chong, P.P.; Looi, C.Y. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8101118.
168. Zhang, Q.; Bai, X.; Chen, W.; Ma, T.; Hu, Q.; Liang, C.; Xie, S.; Chen, C.; Hu, L.; Xu, S.; Liang, T. Wnt/beta-catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1alpha signaling. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 962-973, doi:10.1093/carcin/bgt027.
169. Lu, X.; Kang, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 5928-5935, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1360.
170. Martin, A.; Cano, A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat Cell Biol* **2010**, *12*, 924-925, doi:10.1038/ncb1010-924.
171. Chen, J.; Imanaka, N.; Chen, J.; Griffin, J.D. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 351-360, doi:10.1038/sj.bjc.6605486.
172. Sahlgren, C.; Gustafsson, M.V.; Jin, S.; Poellinger, L.; Lendahl, U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 6392-6397, doi:10.1073/pnas.0802047105.
173. Copple, B.L. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int* **2010**, *30*, 669-682, doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02205.x.
174. Zhang, W.; Shi, X.; Peng, Y.; Wu, M.; Zhang, P.; Xie, R.; Wu, Y.; Yan, Q.; Liu, S.; Wang, J. HIF-1alpha Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLoS One* **2015**, *10*, e0129603, doi:10.1371/journal.pone.0129603.
175. Leemans, C.R.; Braakhuis, B.J.; Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 9-22, doi:10.1038/nrc2982.
176. Slaughter, D.P.; Southwick, H.W.; Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **1953**, *6*, 963-968, doi:10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::aid-cnrc2820060515>3.0.co;2-q.
177. Petrelli, F.; Sarti, E.; Barni, S. Predictive value of human papillomavirus in oropharyngeal carcinoma treated with radiotherapy: An updated systematic review and meta-analysis of 30 trials. *Head Neck* **2014**, *36*, 750-759, doi:10.1002/hed.23351.
178. Lassen, P.; Eriksen, J.G.; Hamilton-Dutoit, S.; Tramm, T.; Alsner, J.; Overgaard, J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **2009**, *27*, 1992-1998, doi:10.1200/JCO.2008.20.2853.
179. O'Sullivan, B.; Huang, S.H.; Perez-Ordóñez, B.; Massey, C.; Siu, L.L.; Weinreb, I.; Hope, A.; Kim, J.; Bayley, A.J.; Cummings, B.; et al. Outcomes of HPV-related oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy alone using altered fractionation. *Radiother Oncol* **2012**, *103*, 49-56, doi:10.1016/j.radonc.2012.02.009.
180. Van Aken, E.; De Wever, O.; Correia da Rocha, A.S.; Mareel, M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* **2001**, *439*, 725-751, doi:10.1007/s004280100516.
181. Meng, X.; Morita, M.; Kuba, S.; Hayashi, H.; Otsubo, R.; Matsumoto, M.; Yamanouchi, K.; Kobayashi, K.; Soyama, A.; Hidaka, M.; Kanetaka, K.; Nagayasu, T.; Eguchi, S. Association of quantitative analysis of intratumoral reduced E-cadherin expression with lymph node metastasis and prognosis in patients with breast cancer. *Sci Rep* **2023**, *13*, 10434, doi:10.1038/s41598-023-37012-4.
182. Corso, G.; Figueiredo, J.; De Angelis, S.P.; Corso, F.; Girardi, A.; Pereira, J.; Seruca, R.; Bonanni, B.; Carneiro, P.; Pravettoni, G.; et al. E-cadherin deregulation in breast cancer. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 5930-5936, doi:10.1111/jcmm.15140.
183. Derksen, P.W.; Liu, X.; Saridin, F.; van der Gulden, H.; Zevenhoven, J.; Evers, B.; van Beijnum, J.R.; Griffioen, A.W.; Vink, J.; Krimpenfort, P.; Peterse, J.L.; Cardiff, R.D.; Berns, A.; Jonkers, J. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 437-449, doi:10.1016/j.ccr.2006.09.013.
184. Yang, M.H.; Wu, M.Z.; Chiou, S.H.; Chen, P.M.; Chang, S.Y.; Liu, C.J.; Teng, S.C.; Wu, K.J. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 295-305, doi:10.1038/ncb1691.
185. Higgins, D.F.; Kimura, K.; Bernhardt, W.M.; Shrimanker, N.; Akai, Y.; Hohenstein, B.; Saito, Y.; Johnson, R.S.; Kretzler, M.; Cohen, C.D.; Eckardt, K.U.; Iwano, M.; Haase, V.H. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **2007**, *117*, 3810-3820, doi:10.1172/JCI30487.
186. Krishnamachary, B.; Berg-Dixon, S.; Kelly, B.; Agani, F.; Feldser, D.; Ferreira, G.; Iyer, N.; LaRusch, J.; Pak, B.; Taghavi, P.; Semenza, G.L. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **2003**, *63*, 1138-1143.
187. Liu, Y.; Liu, Y.; Yan, X.; Xu, Y.; Luo, F.; Ye, J.; Yan, H.; Yang, X.; Huang, X.; Zhang, J.; Ji, G. HIFs enhance the migratory and neoplastic capacities of hepatocellular carcinoma cells by promoting EMT. *Tumour Biol* **2014**, *35*, 8103-8114, doi:10.1007/s13277-014-2056-0.

188. Arenz, A.; Ziemann, F.; Mayer, C.; Wittig, A.; Dreffke, K.; Preising, S.; Wagner, S.; Klussmann, J.P.; Engenhardt-Cabillic, R.; Wittekindt, C. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol* **2014**, *190*, 839-846, doi:10.1007/s00066-014-0605-5.
189. Ziemann, F.; Arenz, A.; Preising, S.; Wittekindt, C.; Klussmann, J.P.; Engenhardt-Cabillic, R.; Wittig, A. Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation +/- Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am J Cancer Res* **2015**, *5*, 1017-1031.
190. Rieckmann, T.; Tribius, S.; Grob, T.J.; Meyer, F.; Busch, C.J.; Petersen, C.; Dikomey, E.; Kriegs, M. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol* **2013**, *107*, 242-246, doi:10.1016/j.radonc.2013.03.013.
191. Zech, H.B.; Berger, J.; Mansour, W.Y.; Nordquist, L.; von Barga, C.M.; Bussmann, L.; Oetting, A.; Christiansen, S.; Mockelmann, N.; Bottcher, A.; et al. Patient derived ex vivo tissue slice cultures demonstrate a profound DNA double-strand break repair defect in HPV-positive oropharyngeal head and neck cancer. *Radiother Oncol* **2022**, *168*, 138-146, doi:10.1016/j.radonc.2022.01.017.
192. Kocher, S.; Zech, H.B.; Krug, L.; Gatzemeier, F.; Christiansen, S.; Meyer, F.; Rietow, R.; Struve, N.; Mansour, W.Y.; Kriegs, M.; Petersen, C.; Betz, C.; Rothkamm, K.; Rieckmann, T. A Lack of Effectiveness in the ATM-Orchestrated DNA Damage Response Contributes to the DNA Repair Defect of HPV-Positive Head and Neck Cancer Cells. *Front Oncol* **2022**, *12*, 765968, doi:10.3389/fonc.2022.765968.
193. Pavlacky, J.; Polak, J. Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2020**, *11*, 57, doi:10.3389/fendo.2020.00057.
194. Farber, S.; Diamond, L.K. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* **1948**, *238*, 787-793, doi:10.1056/NEJM194806032382301.
195. Fendt, S.M. Is There a Therapeutic Window for Metabolism-Based Cancer Therapies? *Front Endocrinol (Lausanne)* **2017**, *8*, 150, doi:10.3389/fendo.2017.00150.
196. Kather, J.N.; Suarez-Carmona, M.; Charoentong, P.; Weis, C.A.; Hirsch, D.; Bankhead, P.; Horning, M.; Ferber, D.; Kel, I.; Herpel, E.; et al. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.36967.
197. Georgiev, P.; Benamar, M.; Han, S.; Haigis, M.C.; Sharpe, A.H.; Chatila, T.A. Regulatory T cells in dominant immunologic tolerance. *J Allergy Clin Immunol* **2023**, doi:10.1016/j.jaci.2023.09.025.
198. Badoual, C.; Hans, S.; Rodriguez, J.; Peyrard, S.; Klein, C.; Agueznay Nel, H.; Mosseri, V.; Laccourreye, O.; Bruneval, P.; Fridman, W.H.; Brasnu, D.F.; Tartour, E. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 465-472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1886.
199. Bron, L.; Jandus, C.; Andrejevic-Blant, S.; Speiser, D.E.; Monnier, P.; Romero, P.; Rivals, J.P. Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **2013**, *132*, E85-93, doi:10.1002/ijc.27728.
200. Russell, S.; Angell, T.; Lechner, M.; Liebertz, D.; Correa, A.; Sinha, U.; Kokot, N.; Epstein, A. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* **2013**, *5*, 24.
201. Amit, M.; Takahashi, H.; Dragomir, M.P.; Lindemann, A.; Gleber-Netto, F.O.; Pickering, C.R.; Anfossi, S.; Osman, A.A.; Cai, Y.; Wang, R.; et al. Loss of p53 drives neuron reprogramming in head and neck cancer. *Nature* **2020**, *578*, 449-454, doi:10.1038/s41586-020-1996-3.
202. Pilch, H.; Schlenger, K.; Steiner, E.; Brockerhoff, P.; Knapstein, P.; Vaupel, P. Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer* **2001**, *11*, 137-142, doi:10.1046/j.1525-1438.2001.011002137.x.
203. Li, J.; Liu, X.; Zang, S.; Zhou, J.; Zhang, F.; Sun, B.; Qi, D.; Li, X.; Kong, J.; Jin, D.; et al. Small extracellular vesicle-bound vascular endothelial growth factor secreted by carcinoma-associated fibroblasts promotes angiogenesis in a bevacizumab-resistant manner. *Cancer Lett* **2020**, *492*, 71-83, doi:10.1016/j.canlet.2020.08.030.
204. Krishnamurthy, S.; Dong, Z.; Vodopyanov, D.; Imai, A.; Helman, J.I.; Prince, M.E.; Wicha, M.S.; Nor, J.E. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* **2010**, *70*, 9969-9978, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1712.
205. Chang, H.Y.; Sneddon, J.B.; Alizadeh, A.A.; Sood, R.; West, R.B.; Montgomery, K.; Chi, J.T.; van de Rijn, M.; Botstein, D.; Brown, P.O. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* **2004**, *2*, E7, doi:10.1371/journal.pbio.0020007.
206. Augsten, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* **2014**, *4*, 62, doi:10.3389/fonc.2014.00062.
207. Niland, S.; Riscanevo, A.X.; Eble, J.A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* **2021**, *23*, doi:10.3390/ijms23010146.
208. Qian, X.; Karpova, T.; Sheppard, A.M.; McNally, J.; Lowy, D.R. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **2004**, *23*, 1739-1748, doi:10.1038/sj.emboj.7600136.
209. David, J.M.; Rajasekaran, A.K. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res* **2012**, *72*, 2917-2923, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3498.
210. Fedor-Chaiken, M.; Hein, P.W.; Stewart, J.C.; Brackenbury, R.; Kinch, M.S. E-cadherin binding modulates EGF receptor activation. *Cell Commun Adhes* **2003**, *10*, 105-118.
211. Udey, M.C. Cadherins and Langerhans cell immunobiology. *Clin Exp Immunol* **1997**, *107 Suppl 1*, 6-8.

212. Matthews, K.; Leong, C.M.; Baxter, L.; Inglis, E.; Yun, K.; Backstrom, B.T.; Doorbar, J.; Hibma, M. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* **2003**, *77*, 8378-8385, doi:10.1128/jvi.77.15.8378-8385.2003.
213. Fausch, S.C.; Da Silva, D.M.; Rudolf, M.P.; Kast, W.M. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol* **2002**, *169*, 3242-3249, doi:10.4049/jimmunol.169.6.3242.
214. Fahey, L.M.; Raff, A.B.; Da Silva, D.M.; Kast, W.M. A major role for the minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune escape. *J Immunol* **2009**, *183*, 6151-6156, doi:10.4049/jimmunol.0902145.
215. Fausch, S.C.; Fahey, L.M.; Da Silva, D.M.; Kast, W.M. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. *J Immunol* **2005**, *174*, 7172-7178, doi:10.4049/jimmunol.174.11.7172.
216. Mocellin, S.; Panelli, M.C.; Wang, E.; Nagorsen, D.; Marincola, F.M. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* **2003**, *24*, 36-43, doi:10.1016/s1471-4906(02)00009-1.
217. Moreau, P.; Adrian-Cabestre, F.; Menier, C.; Guiard, V.; Gourand, L.; Dausset, J.; Carosella, E.D.; Paul, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* **1999**, *11*, 803-811, doi:10.1093/intimm/11.5.803.
218. Berti, F.C.B.; Pereira, A.P.L.; Cebinelli, G.C.M.; Trugilo, K.P.; Brajao de Oliveira, K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev* **2017**, *34*, 1-13, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.002.
219. Loustau, M.; Anna, F.; Drean, R.; Lecomte, M.; Langlade-Demoyen, P.; Caumartin, J. HLA-G Neo-Expression on Tumors. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1685, doi:10.3389/fimmu.2020.01685.
220. Zhuang, B.; Shang, J.; Yao, Y. HLA-G: An Important Mediator of Maternal-Fetal Immune-Tolerance. *Front Immunol* **2021**, *12*, 744324, doi:10.3389/fimmu.2021.744324.
221. Xu, H.H.; Yan, W.H.; Lin, A. The Role of HLA-G in Human Papillomavirus Infections and Cervical Carcinogenesis. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1349, doi:10.3389/fimmu.2020.01349.
222. Gimenes, F.; Teixeira, J.J.; de Abreu, A.L.; Souza, R.P.; Pereira, M.W.; da Silva, V.R.; Boer, C.G.; Maria-Engler, S.S.; Bonini, M.G.; Borelli, S.D.; Consolaro, M.E. Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: a candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker? *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846*, 576-589, doi:10.1016/j.bbcan.2014.10.004.
223. Sarmah, N.; Baruah, M.N.; Baruah, S. Immune Modulation in HLA-G Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Relation to Human Papilloma Virus Positivity: A Study From Northeast India. *Front Oncol* **2019**, *9*, 58, doi:10.3389/fonc.2019.00058.
224. Restifo, N.P.; Smyth, M.J.; Snyder, A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 121-126, doi:10.1038/nrc.2016.2.
225. Aust, S.; Felix, S.; Auer, K.; Bachmayr-Heyda, A.; Kenner, L.; Dekan, S.; Meier, S.M.; Gerner, C.; Grimm, C.; Pils, D. Absence of PD-L1 on tumor cells is associated with reduced MHC I expression and PD-L1 expression increases in recurrent serous ovarian cancer. *Sci Rep* **2017**, *7*, 42929, doi:10.1038/srep42929.
226. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 23-34, doi:10.1056/NEJMoa1504030.
227. Perea, F.; Sanchez-Palencia, A.; Gomez-Morales, M.; Bernal, M.; Concha, A.; Garcia, M.M.; Gonzalez-Ramirez, A.R.; Kerick, M.; Martin, J.; Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Aptsiauri, N. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget* **2018**, *9*, 4120-4133, doi:10.18632/oncotarget.23469.
228. Ramnath, N.; Tan, D.; Li, Q.; Hylander, B.L.; Bogner, P.; Ryes, L.; Ferrone, S. Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother* **2006**, *55*, 891-899, doi:10.1007/s00262-005-0085-7.
229. Kikuchi, E.; Yamazaki, K.; Torigoe, T.; Cho, Y.; Miyamoto, M.; Oizumi, S.; Hommura, F.; Dosaka-Akita, H.; Nishimura, M. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* **2007**, *98*, 1424-1430, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00558.x.
230. Kaneko, K.; Ishigami, S.; Kijima, Y.; Funasako, Y.; Hirata, M.; Okumura, H.; Shinchi, H.; Koriyama, C.; Ueno, S.; Yoshinaka, H.; Natsugoe, S. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 454, doi:10.1186/1471-2407-11-454.
231. Cramer, J.D.; Burtneff, B.; Ferris, R.L. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. *Oral Oncol* **2019**, *99*, 104460, doi:10.1016/j.oraloncology.2019.104460.
232. Cook, E.F.; Goldman, L. Empiric comparison of multivariate analytic techniques: advantages and disadvantages of recursive partitioning analysis. *J Chronic Dis* **1984**, *37*, 721-731, doi:10.1016/0021-9681(84)90041-9.
233. Lee, J.W.; Um, S.H.; Lee, J.B.; Mun, J.; Cho, H. Scoring and staging systems using cox linear regression modeling and recursive partitioning. *Methods Inf Med* **2006**, *45*, 37-43.

5. Abkürzungsverzeichnis

(Verzeichnis und Bedeutung mehrfach verwendeter Abkürzungen. Englische Bedeutung kursiv; Plural bei Bedarf durch angefügtes „s“ angezeigt; einmalig verwendete Abkürzung sind an entsprechender Textstelle erklärt.)

| Abkürzung | Bedeutung | Abkürzung | Bedeutung |
|----------------------|--|----------------------|---|
| ¹⁸ F-FDG | radioaktiv ¹⁸ Fluor-markierte Desoxyglukose, Radiotracer für PET/CT | <i>liquid biopsy</i> | Probe einer Körperflüssigkeit, i.d.R. Blut oder Speichel im Zusammenhang mit KHK |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> | LR | <i>low risk</i> - nicht onogene HPV-Typen |
| ATP | Adenosintriphosphat | mRNA | <i>messenger-</i> oder Boten-RNA |
| CAF | Krebs-assoziiierter Fibroblast; <i>cancer associated fibroblast</i> | M-Status | Fernmetastasen vorhanden / fehlen |
| cfDNA | zellfreie DNA; <i>cell free DNA</i> | NGS | <i>next-generation sequencing</i> |
| CK | Cytokeratin | NK-Zelle | natürlichen Killerzelle; <i>natural killer cell</i> |
| CSC | Krebsstammzelle, <i>cancer stem cell</i> | N-Status | Nodus (Lymphknoten), Fehlen / Vorhandensein, Größe und Zahl von regionären Lymphknotenmetastasen |
| CUP | CUP-Syndrom (Primärtumor unbekannt); <i>cancer of unknown primary</i> | OPSCC | Platteneithelkarzinome des Oropharynx; <i>oropharyngeal squamous cell carcinoma</i> |
| CUP ^{HNSCC} | Platteneithelkarzinom-Metastasen in zervikalen (Hals-)Lymphknoten ohne auffindbaren Primärtumor, Ursprung eines HNSCC aufgrund Lymphab-flusswege wahrscheinlich | PCA | Hauptkomponentenanalyse; <i>principal component analysis</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| ECM | extrazellulären Matrix | PET/CT | Positronen Emissions-Tomographie / Computertomographie |
| ECOG | Index zur Lebensqualität / allgemeinen Leistungsfähigkeit der <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> | RNA | Ribonukleinsäure |
| EMT | epitheliale-mesenchymale Transition; <i>epithelial-to-mesenchymal transition</i> | RPA | rekursiven Partitionierung; <i>recursive partitioning analysis</i> |
| FDA | US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel; <i>U.S. Food and Drug Administration</i> | SCC | Platteneithelkarzinom; <i>squamous cell carcinoma</i> |
| GTDS | Gießener Tumordokumentationssystem | TaqMan-Assay | quantitativen PCR unter Verwendung von spezifischen Hydrolyse-sonden |
| HLA | Humane Leukozytenantigen / Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>Major Histocompatibility Complex (MHC)</i> , bei Menschen als HLA-System bezeichnet; <i>human leukocyte antigen</i> | TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas</i> Programms des US-amerikanischen Krebsforschungszentrum, <i>National Cancer Institute (NCI)</i> |
| HNO-Klinik Gießen | Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen | TME | Tumormikroumgebung; <i>tumor microenvironment</i> |
| HNSCC | Platteneithelkarzinome des Kopf-Hals Bereich; <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> | tNGS | <i>targeted next-generation sequencing</i> |
| HPV | humanes Papillomvirus | TNM | TNM-System der UICC zur Stadienbestimmung bösartiger Tumore; <i>TNM Classification of Malignant Tumours</i> |
| HR | <i>high risk</i> - onogene HPV-Typen | T-Status | Tumor, Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> | UICC | <i>Union for International Cancer Control</i> |
| ICD10 | 10. Version der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme; <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> | USA | Vereinigten Staaten von Amerika |
| IF | Intermediärfilamentprotein | UV | Ultraviolettstrahlung |
| KHK | Kopf-Hals-Karzinom, alle Histologien | WES | <i>whole exome sequencing</i> |
| LDR | lokales oder entferntes Rezidiv; <i>local / distant recurrence</i> | WGS | <i>whole genome sequencing</i> |
| | | WHO | Weltgesundheitsorganisation; <i>World Health Organization</i> |

6. Dieser Arbeit zu Grunde liegende eigene Publikationen

6.1. Inzidenz HPV-assoziiertes Plattenepithelkarzinom des Oropharynx

Seite 53-60

Wittekindt C, **Wagner S***, Bushnak A, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Würdemann N, Bernhardt K, Pons-Kühnemann J, Maulbecker-Armstrong C, Klusmann JP. Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2019 Jun;12(6):375-382. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098. PMID: 31003993.

*: gleichberechtigte Erstautorenschaft

6.2. Risikofaktoren und Prognostischen Modelle

Seite 62-69

Wagner S*, Wittekindt C, Sharma SJ, Wuerdemann N, Jüttner T, Reuschenbach M, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Gattenlöhner S, Burkhardt E, Pons-Kühnemann J, Klussmann JP. Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *Br J Cancer*. 2017 Jun 6;116(12):1604-1611. doi: 10.1038/bjc.2017.132. Epub 2017 May 4. PMID: 28472822; PMCID: PMC5518861.

Seite 70-77

Wuerdemann N, Wittekindt C, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlöhner S, Klussmann JP, **Wagner S**. Risk Factors for Overall Survival Outcome in Surgically Treated Human Papillomavirus-Negative and Positive Patients with Oropharyngeal Cancer. *Oncol Res Treat*. 2017;40(6):320-327. doi: 10.1159/000477097. Epub 2017 May 17. PMID: 28558385.

Seite 78-90

Wagner S*, Langer C, Wuerdemann N, Reiser S, Abing H, Pons-Kühnemann J, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Gattenlöhner S, Waterboer T, Schroeder L, Arens C, Klussmann JP, Wittekindt C. Predictors for Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck Region. *Cancers (Basel)*. 2023 Apr 6;15(7):2167. doi: 10.3390/cancers15072167. PMID: 37046829; PMCID: PMC10093301.

*: gleichberechtigte Erstautorenschaft

6.3. Diagnostische Marker bei Plattenepithelkarzinom des Oropharynx

Seite 92-100

Wagner S*, Prigge ES, Wuerdemann N, Reder H, Bushnak A, Sharma SJ, Obermueller T, von Knebel Doeberitz M, Dreyer T, Gattenlöhner S, Wolf G, Pons-Kühnemann J, Wittekindt C, Klusmann JP. Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *Br J Cancer*. 2020 Sep;123(7):1114-1122. doi: 10.1038/s41416-020-0964-x. Epub 2020 Jul 6. Erratum in: *Br J Cancer*. 2021 Jul;125(2):307. PMID: 32624580; PMCID: PMC7525437.

Seite 101-111

Reder H, Taferner VF, Wittekindt C, Bräuninger A, Speel EM, Gattenlöhner S, Wolf G, Klusmann JP, Wuerdemann N, **Wagner S***. Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Mol Diagn*. 2020 Nov;22(11):1333-1343. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32822851.

*: gleichberechtigte Erst- bzw. Letztautorenschaft

6.4. Genetische Veränderungen und Mutationsmuster beim Oropharynxkarzinom

Seite 113-119

Reder H, **Wagner S***, Gamerdinger U, Sandmann S, Wuerdemann N, Braeuninger A, Dugas M, Gattenloehner S, Klussmann JP, Wittekindt C. Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure. *Oral Oncol.* 2019 Jun;93:59-65. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.04.013. Epub 2019 Apr 28. PMID: 31109697.

Seite 120-129

Reder H, **Wagner S***, Wuerdemann N, Langer C, Sandmann S, Braeuninger A, Dugas M, Gattenloehner S, Wittekindt C, Klussmann JP. Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status. *Cancer Med.* 2021 Feb;10(4):1347-1356. doi: 10.1002/cam4.3741. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33527763; PMCID: PMC7926014.

*: gleichberechtigte Erstautorenschaft

6.5. HPV-induzierte metabolische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Seite 131-141

Knuth J, Sharma SJ, Würdemann N, Holler C, Garvalov BK, Acker T, Wittekindt C, **Wagner S***, Klusmann JP. Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncotarget*. 2017 Sep 11;8(52):89681-89691. doi: 10.18632/oncotarget.20813. PMID: 29163780; PMCID: PMC5685701.

Seite 142-147

Sharma SJ, Wittekindt C, Knuth J, Steiner D, Wuerdemann N, Laur M, Kroll T, **Wagner S***, Klusmann JP. Intraindividual homogeneity of 18F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. *Oral Oncol*. 2017 Oct;73:166-171. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.08.019. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28939071.

*: gleichberechtigte Letztautorenschaft

6.6. HPV-induzierte immunologische Veränderungen beim Oropharynxkarzinom

Seite 149-159

Wagner S, Wittekindt C, Reuschenbach M, Hennig B, Thevarajah M, Würdemann N, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Dreyer T, Gattenlöhner S, Klussmann JP. CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2016 May 1;138(9):2263-73. doi: 10.1002/ijc.29962. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26662627.

Seite 160-175

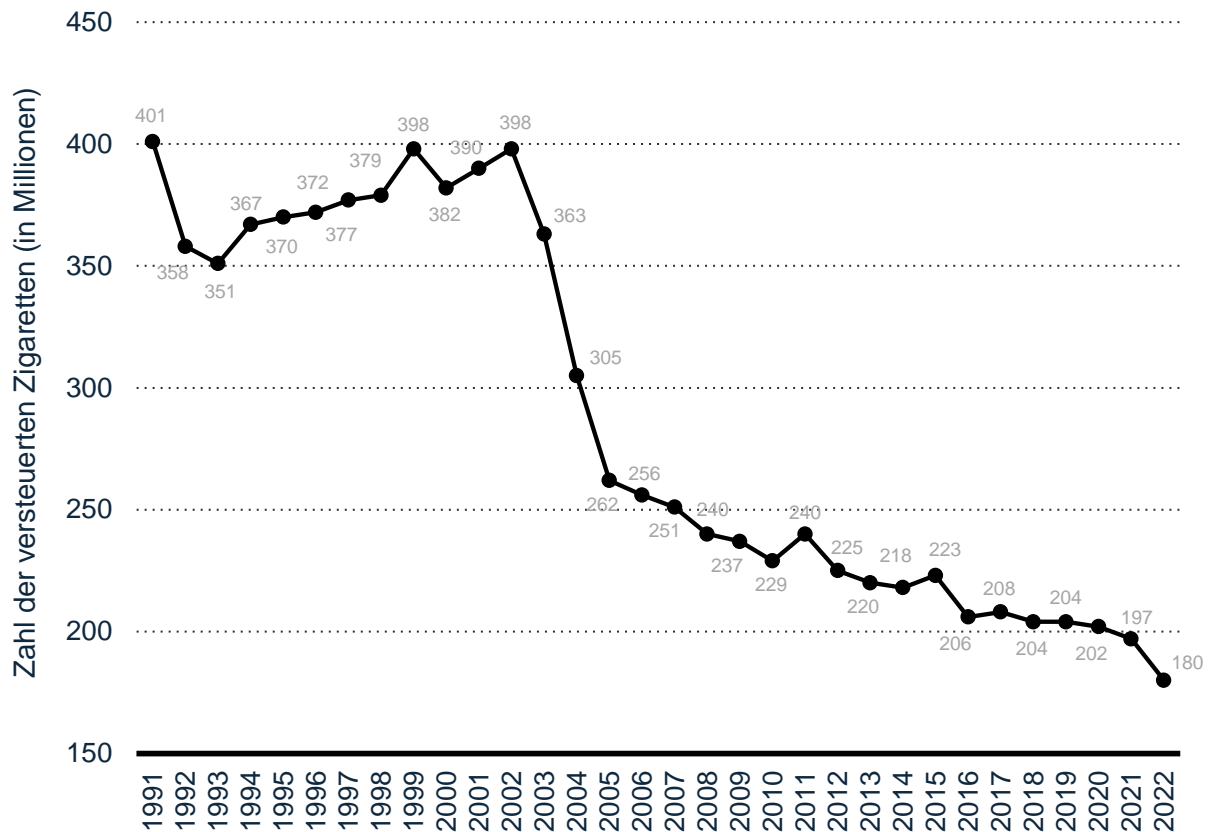
Wuerdemann N, Gültekin SE, Pütz K, Wittekindt C, Huebbers CU, Sharma SJ, Eckel H, Schubotz AB, Gattenlöhner S, Büttner R, Speel EJ, Klussmann JP, **Wagner S***, Quaas A. PD-L1 Expression and a High Tumor Infiltrate of CD8+ Lymphocytes Predict Outcome in Patients with Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 23;21(15):5228. doi: 10.3390/ijms21155228. PMID: 32718057; PMCID: PMC7432501.

*: gleichberechtigte Letztautorenschaft

7. Anhänge

7.1. Anhang 1: Zigarettenkonsum in Deutschland 1991 bis 2022

Durchschnittlicher Konsum von (versteuerten) Zigaretten pro Tag in Deutschland von 1991 bis 2022 (in Millionen)



Beschreibung

Diese Statistik veranschaulicht den täglichen Zigarettenkonsum in Deutschland von 1991 bis 2022. Im Jahr 2022 werden durchschnittlich 180 Millionen Zigaretten pro Tag konsumiert, was einen Rückgang im Vergleich zum Vorjahr bedeutet. Im Vergleich zu einem Höchststand im Jahr 2002 ist der Verbrauch bis 2022 um 55 % gesunken.

Informationen zu Quelle und Methodik

| | |
|--------------------------------|---|
| Quelle | Statistisches Bundesamt |
| Durchgeführt von | Statista; Statistisches Bundesamt |
| Zeitraum der Erhebung | 1991 bis 2022 |
| Region | Deutschland |
| Veröffentlicht von | Statistisches Bundesamt |
| Zeitpunkt der Veröffentlichung | Februar 2023 |
| Original-Quelle | Absatz von Tabakwaren 2022, page 5 |
| Website URL | https://www.statista.com/statistics/507124/daily-cigarette-consumption-germany/ |
| Hinweise: | Die Zahlen wurden anhand der Daten zur Tabaksteuer berechnet und gerundet. |

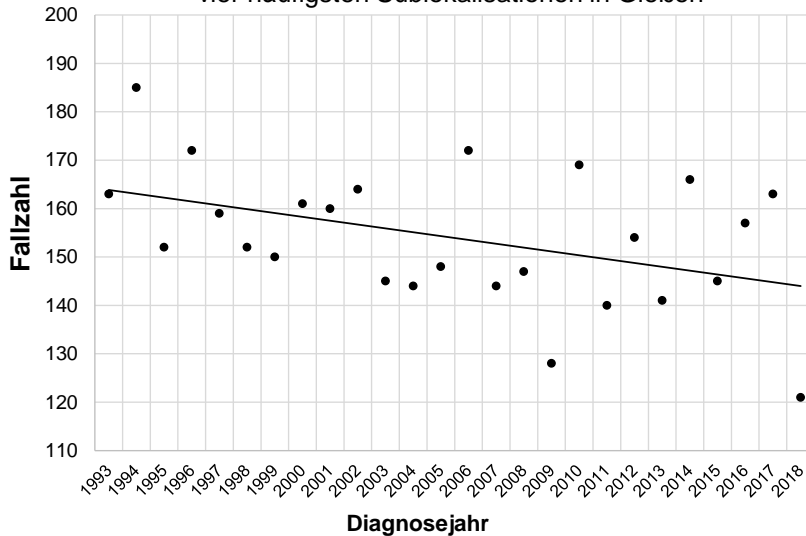
Text übersetzt und Darstellung graphisch angepasst nach Original-Quelle: Statistisches Bundesamt; ID 507124

Literaturquelle: Statistisches Bundesamt. (February 8, 2023). Average consumption of (taxed) cigarettes per day in Germany from 1991 to 2022 (in millions) [Graph]. In Statista. Retrieved November 08, 2023, from <https://www.statista.com/statistics/507124/daily-cigarette-consumption-germany/>

7.2. Anhang 2: Auswertung des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS)

Entwicklung der Fallzahl der an der HNO-Klinik Gießen zwischen 1993 bis 2018 behandelten KHK.

A GTDS Auswertung 1993-2018: Gesamtzahl aller KHK der vier häufigsten Sublokalisationen in Gießen



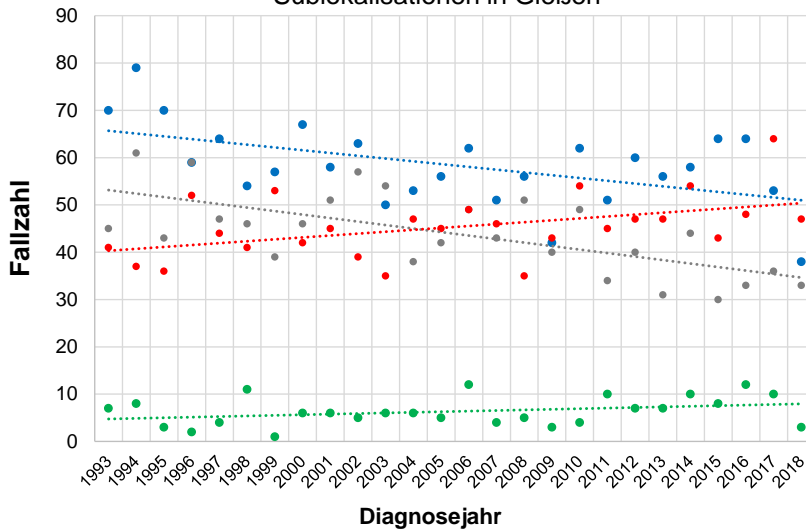
Fallzahlen

| Jahr | alle KHK |
|-------|----------|
| 1993 | 163 |
| 1994 | 185 |
| 1995 | 152 |
| 1996 | 172 |
| 1997 | 159 |
| 1998 | 152 |
| 1999 | 150 |
| 2000 | 161 |
| 2001 | 160 |
| 2002 | 164 |
| 2003 | 145 |
| 2004 | 144 |
| 2005 | 148 |
| 2006 | 172 |
| 2007 | 144 |
| 2008 | 147 |
| 2009 | 128 |
| 2010 | 169 |
| 2011 | 140 |
| 2012 | 154 |
| 2013 | 141 |
| 2014 | 166 |
| 2015 | 145 |
| 2016 | 157 |
| 2017 | 163 |
| 2018 | 121 |
| Summe | 4002 |

Lineare Regressionsanalyse:

R = -0,432; B = -0,795; P = 0,028

B GTDS Auswertung 1993-2018: der vier häufigste Sublokalisationen in Gießen



Fallzahlen

| Jahr | Mundh. ohne Oroph. | Nasenh./Mittelohr | Larynx | Oropharynx |
|-------|--------------------|-------------------|--------|------------|
| 1993 | 70 | 7 | 45 | 41 |
| 1994 | 79 | 8 | 61 | 37 |
| 1995 | 70 | 3 | 43 | 36 |
| 1996 | 59 | 2 | 59 | 52 |
| 1997 | 64 | 4 | 47 | 44 |
| 1998 | 54 | 11 | 46 | 41 |
| 1999 | 57 | 1 | 39 | 53 |
| 2000 | 67 | 6 | 46 | 42 |
| 2001 | 58 | 6 | 51 | 45 |
| 2002 | 63 | 5 | 57 | 39 |
| 2003 | 50 | 6 | 54 | 35 |
| 2004 | 53 | 6 | 38 | 47 |
| 2005 | 56 | 5 | 42 | 45 |
| 2006 | 62 | 12 | 49 | 49 |
| 2007 | 51 | 4 | 43 | 46 |
| 2008 | 56 | 5 | 51 | 35 |
| 2009 | 42 | 3 | 40 | 43 |
| 2010 | 62 | 4 | 49 | 54 |
| 2011 | 51 | 10 | 34 | 45 |
| 2012 | 60 | 7 | 40 | 47 |
| 2013 | 56 | 7 | 31 | 47 |
| 2014 | 58 | 10 | 44 | 54 |
| 2015 | 64 | 8 | 30 | 43 |
| 2016 | 64 | 12 | 33 | 48 |
| 2017 | 53 | 10 | 36 | 64 |
| 2018 | 38 | 3 | 33 | 47 |
| Summe | 1517 | 165 | 1141 | 1179 |

Lineare Regressionsanalysen:

R = -0,519; B = -0,588; P = 0,007

R = 0,321; B = 0,129; P = 0,110

R = -0,663; B = -0,739; P < 0,001

R = 0,463; B = 0,402; P = 0,017

Methodik: Aus dem Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS) wurden alle Patienten ermittelt, bei denen eine bösartige Tumorerkrankung diagnostiziert, bzw. eine solche an der HNO-Klinik in Gießen behandelt wurde. Nach Ausschluss doppelter Einträge (Dopplungen und Einträge von Rezidiven als unabhängige Neuerkrankungen), und Diagnosen die während des Aufbaus von GTDS (vor 1993) oder während der COVID-19-Pandemie (nach 2018) gestellt wurden, erfolgte die Identifizierung aller KHK der vier häufigsten Sublokalisationen anhand der ICD10 Codes (siehe Abbildungen). Fälle bei denen eine Mehrfachkodierung im Gleichen Jahr aus Mundhöhle und Rachen sowie Oropharynx vorlag, wurden dem Oropharynx zugeordnet.

Ergebnisse: **Abbildung A** zeigt einen leichten Rückgang der Summe der vier häufigsten Sublokalisationen (alle KHK) zwischen 1993 und 2018. Die Regressionsanalyse deutet auf einen schwachen bis mäßigen linearen Zusammenhang der Fallzahlentwicklung mit dem Zeitverlauf hin. **Abbildung B** zeigt einen Rückgang der Karzinome der Mundhöhle und des Rachens, sowie des Larynx, jedoch einen Anstieg der Oropharynxkarzinome. Die Regressionsanalysen deutet hin auf einen schwachen bis mäßigen linearen Zusammenhang bei Oropharynxkarzinomen und einen deutlichen linearen Zusammenhang der Fallzahlentwicklung mit dem Zeitverlauf bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens, sowie des Larynx.

7.3. Anhang 3: Grundlagen weiterer prognostischer Modelle

Nomogramme

Die Nomographie wurde bereits 1884 von Philbert Maurice d'Ocagne erfunden, wird aber auch heute noch vielfach genutzt. Sie diente ursprünglich im Ingenieurwesen dazu komplizierte Formeln mit Hilfe einer grafischen Darstellung zu berechnen. Hierbei wird zunächst jede Variable mit einer eigenen Skala separat aufgelistet. Jeder Ausprägung ist auf der Skala eine entsprechende Punktezahl zugewiesen, die nacheinander für alle Variablen aufaddiert wird. Diese kumulative Punktezahl wird anschließend mit einer Ergebnisskala verglichen. In der Medizin werden Nomogramme typischerweise als statistisches Prognosemodell verwendet, um die Wahrscheinlichkeit für ein klinisches Ereignis (z.B. das Wiederauftreten von Krebs) für eine individuelle Person mit Hilfe biologischer und klinischer Variablen vorherzusagen. Insbesondere bevor digitale Hilfsmittel allgemein zugänglich waren wurden Nomogramme häufig verwendet, da die zugrundeliegenden Gleichungen dem Nutzer weder bekannt, noch durch ihn zu berechnen sein müssen, sondern lediglich das Rechenschieber-artige graphischen Ablesen der Graphik erfolgen musste. Inzwischen haben entsprechende Computer- oder Smartphone-basierte Lösungen klassische Nomogrammen jedoch weitgehend abgelöst.

Rekursiven Partitionierung (*recursive partitioning analysis*, RPA)

Bei der RPA wird sozusagen anhand der Ausprägungen der im Modell einbezogenen Variablen ein Entscheidungsbaum erstellt, mit dem die Untersuchungskohorte bestmöglich in Bezug auf die Zielgröße (in unserem Fall das Gesamtüberleben) klassifiziert wird. Die RPA stellt demzufolge ebenfalls eine multivariate statistische Analyse dar, bei der die Einflussfaktoren im Entscheidungsbaum anhand ihrer Bedeutung hierarchisch geordnet werden. Ähnlich den Nomogrammen ist die Interpretation des Entscheidungsbaums der RPA weitgehend intuitiv und erfordert keine zusätzlichen Berechnungen. Sofern lediglich signifikante kategorische Prädiktoren vorhanden sind scheint die RPA im Vergleich zur Cox Regression vorteilhaft für eine Klassifizierung von Patienten zu sein. Weiterhin können synergistische Wechselwirkungen zwischen Faktoren und nichtlineare Beziehungen zum Endpunkt identifiziert und der Variablenauswahlprozess (durch Einbeziehungen von Randbedingungen) beeinflusst werden^[232]. Nachteilig ist eine gewisse Anfälligkeit zur Überinterpretation von Einflussgrößen („*over-training*“ / „*over-fitting*“), insbesondere bei schwindender Stichprobengröße in den späteren Phasen des Auswahlprozesses, sowie eine geringere Eignung für die Verwendung kontinuierlichen Faktoren^[232]. Durch Einbindung einer „lokalen Cox Regression“ in die RPA konnte dieser Nachteil allerdings behoben und die Vorhersagegenauigkeit der RPA erheblich verbessert werden^[233].

Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA)

Mit einer PCA können die wichtigsten Aspekte eines mehrdimensionalen Datensatzes extrahiert und dessen Komplexität reduziert werden. Vereinfacht wird hierbei aus allen Datenpunkten und Variablen eine mehrdimensionale Korrelationsmatrix gebildet. In dieser Matrix wird der lineare Vektor (Eigenvektor) berechnet, der mit den Daten am besten übereinstimmt – mit anderen Worten eine Gerade, zu der die Abstände aller Datenpunkte

minimal sind. Dieser Vektor wird als erste Hauptkomponente bezeichnet und beschreibt den größten Anteil der Datenvarianz in dieser ersten Dimension. Analog erfolgt die Extraktion der zweiten Hauptkomponente, deren Ausrichtung senkrecht zur ersten Hauptkomponente sein muss, um den nächst wichtigen Teil der verbliebenen Varianz im Datensatz auszudrücken. Gleiches erfolgt für alle weiteren Hauptkomponenten, wobei die „verbliebene Varianz“ im Datensatz mit jeder extrahierten Hauptkomponente abnimmt. Meist kann mit den ersten zwei bis drei Hauptkomponenten bereits der Großteil der Varianz in einem Datensatz erklärt werden. In der Praxis werden die entsprechend rotierten Hauptkomponenten als Achsen eines (meist zweidimensionalen) Koordinatensystems verwendet, in das jeder Datenpunkt anhand der Werte für die erste und zweite Hauptkomponente positioniert und so die Bildung von Clustern von Datenpunkten mit ähnlichen Eigenschaften graphisch nachvollzogen werden kann. Der Beitrag jeder Variable zur den Hauptkomponenten liefert wird als deren Ladung (*loading*) bezeichnet. Diese kann ebenfalls im Koordinatensystem der Hauptkomponenten als Vektor dargestellt werden, der vom Ursprung ausgeht und dessen Richtung und Länge den jeweiligen Beitrag zu den Hauptkomponenten angibt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Faktoren wird durch den Winkel zwischen den jeweiligen Vektoren charakterisiert: ein kleiner Winkel (also ein ähnlicher Beitrag zu einer Hauptkomponente) steht für eine wahrscheinliche positive Korrelation, $\sim 180^\circ$ für eine wahrscheinliche negative Korrelation und annähernd 90° zwischen zwei Vektoren für eine unwahrscheinliche Korrelation der Variablen. Mit einer PCA werden sozusagen die Einflussfaktoren in einem Datensatz in neue, künstliche Variablen transformiert, mit denen die größte Variation im Datensatz abgebildet werden kann. Hierdurch kann die Komplexität reduziert und mögliche Beziehungen zwischen den einbezogenen Faktoren erkannt bewerten. Entsprechend eignet sich die PCA bei der explorativen Datenanalyse und bei der Erstellung von Vorhersagemodellen aus komplexen Datensätzen, insbesondere, wenn keinerlei Vorstellung über die zugrundeliegenden Zusammenhänge der Einflussfaktoren besteht.

8. Erklärung über die eigenständige Anfertigung der Arbeit und Kenntlichmachung der benutzten Hilfsmittel bzw. Hilfen.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bzw. die mir zuzuordnenden Teile im Rahmen einer kumulativen Habilitationsschrift, selbstständig 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. Ich versichere, dass ich für die nach §2 (3) der Habilitationsordnung angeführten bereits veröffentlichten Originalarbeiten als Erst- oder Seniorautor fungiere, da ich den größten Teil der Daten selbst erhoben habe, für das Design der Arbeiten verantwortlich bin und die Manuskripte maßgeblich gestaltet habe. Für alle von mir erwähnten Untersuchungen habe ich die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegten Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass alle an der Finanzierung der Arbeiten beteiligten Geldgeber in den jeweiligen Publikationen genannt worden sind. Ich versichere außerdem, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Weise einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde oder Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens war. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Giessen, den 31.01.2024

Dr. rer. nat. Steffen Wagner.