

**Prognostische Faktoren in zervikalen Karzinometastasen
unbekannter Primärtumoren**

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

vorgelegt von Ahling, Iris, geb. Hülsewig
aus Freiburg i. Brg.

Gießen (2017)

Aus dem Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
unter der Leitung von Prof. Dr. J. P. Klußmann
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Wittekindt
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Grimminger

Tag der Disputation: 27.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Karzinommetastasen bei unbekanntem Primärtumor (engl. Cancer of Unknown Primary/CUP).....	1
1.1.1 Diagnose.....	1
1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie	2
1.1.3 Klassifikation.....	3
1.1.4 Therapie und Prognose.....	5
1.2 Humanes Papillomavirus.....	7
1.2.1 Aufbau des Humanen Papillomavirus.....	8
1.2.2 Die viralen Onkogene E6 und E7	10
1.2.3 Der Tumorsuppressor p16.....	12
1.2.4 Integration und Replikation des HPV	13
1.3 Cancer of Unknown Primary und Humanes Papillomavirus	14
1.4 Epithelial-mesenchymale Transition.....	16
1.4.1 β -Catenin.....	16
1.4.2 Aufbau und Funktion des β -Catenins	18
1.4.3 EGFR.....	18
1.4.4 Wnt-Signalweg	19
1.5 Laborparameter.....	21
1.5.1 C-reaktives Protein und Leukozyten.....	21
1.5.2 Erythrozyten, Hämatokrit und Hämoglobin.....	21
1.6 Ziel der Arbeit und Vorgehensweise.....	22
2. Material und Methoden	25
2.1 Patientenkollektiv	25
2.1.1 Datenerfassung.....	25
2.1.2 Datenmaterial	25
2.1.3 Biometrische Merkmale.....	26
2.1.4 Diagnosestellung	27
2.1.5 Therapie.....	30
2.1.6 Prognosen	30
2.1.7 FFPE-Gewebeprobe.....	31
2.2 Gewebeschnitte.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	HPV-Nachweis	32
2.2.2	DNA-Extraktion	32
2.2.3	PCR.....	33
2.2.4	Multiplex-PCR.....	35
2.2.5	Immunhistochemische Vorversuche.....	36
2.2.6	Vor- und Nachbereitung der Gewebeschnitte.....	37
2.2.7	β -Catenin-Immunhistochemie.....	37
2.2.8	p16 ^{INK4a} -Immunhistochemie.....	39
2.2.9	β -Catenin-Immunfluoreszenz.....	40
2.3	Statistische Methoden.....	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	HPV-Analyse	42
3.2	HPV-Inzidenz.....	43
3.3	Signifikant besseres Überleben bei HPV-positiven Metastasen	45
3.4	Lokalisation des β -Catenins in den Zellkompartimenten.....	46
3.5	Die nukleäre Lokalisation von β -Catenin korreliert signifikant mit positivem HPV-Status	50
3.6	Signifikant schlechtere Prognose in Abhängigkeit von Laborparametern bei Diagnose	52
3.6.1	Signifikant schlechtere Prognose bei erhöhten CRP- und Leukozytenwerten ...	53
3.6.2	Signifikant schlechtere Prognose bei erniedrigten Erythrozytenwerten.....	56
3.6.3	Signifikant schlechtere Prognose bei erniedrigten Hämoglobin- und Hämatokritwerten.....	57
3.7	Prognose in Abhängigkeit des Geschlechts	59
3.8	Prognose in Abhängigkeit von Nikotin- und Alkoholabusus.....	60
3.9	Prognose in Abhängigkeit der Komorbidität.....	61
3.10	Prognose in Abhängigkeit der N-Kategorie	62
3.11	Prognose in Abhängigkeit von Fernmetastasen	63
3.12	Einfluss der Therapie auf das Überleben.....	63
3.12.1	Einfluss der Therapie auf das Überleben in Abhängigkeit von Fernmetastasierung	65
3.13	Tabellarische Übersicht der Risikofaktoren	66
3.13.1	Hazard Ratio der prognostischen Faktoren.....	69
3.13.2	Verteilung der prognostischen Parameter im HPV-positiven und HPV-negativen Kollektiv	70
3.14	Multivariate Analysen.....	72

Inhaltsverzeichnis

3.14.1	Abhängigkeit von Therapie und Komorbidität.....	72
4.	Diskussion	74
4.1	HPV-Prävalenz innerhalb des CUP-Kollektivs	75
4.2	HPV-Status als Prognoseparameter	76
4.3	β -Catenin-Lokalisation in den Zellkompartimenten bei HPV-positiven Proben ..	77
4.4	Zervikales CUP und prognostische Faktoren	81
5.	Zusammenfassung	84
6.	Summary	85
7.	Abkürzungsverzeichnis	86
8.	Abbildungsverzeichnis	88
9.	Tabellenverzeichnis	90
10.	Literaturverzeichnis	92
11.	Anhang	108
11.1	Ehrenwörtliche Erklärung	108
11.2	Danksagung.....	109

1. Einleitung

1.1 Karzinometastasen bei unbekanntem Primärtumor (engl. Cancer of Unknown Primary/CUP)

Karzinometastasen bei unbekanntem Primärtumor (engl. Cancer of Unknown Primary/CUP) sind definiert als histologisch gesicherte Metastasen, deren Primärtumor auch nach aufwendiger klinischer Untersuchung nicht gefunden werden kann (Krementz et al., 1979). Teil der erforderlichen Untersuchungen sind u. a. eine ausführliche Anamnese, gründliche körperliche Untersuchung, sowie Blut-, Urin- und Stuhlanalyse unter Berücksichtigung von Parametern wie Blutbild, klinischer Chemie, LDH, Urinstatus und PSA bei Männern. Ebenso kommen bildgebende Verfahren wie Thorax-, Abdomen- und Becken-CT sowie bei Frauen zusätzlich eine Mammografie zur Anwendung. Erst nach Durchführung dieses Algorithmus kann die Diagnose CUP gestellt werden (Abbruzzese et al., 1995). Uneinheitlich wird gehandhabt, inwiefern es sich bei Patienten, bei denen im späteren Verlauf ein Primärtumor in der Nachsorge sichtbar wird, tatsächlich um CUP-Patienten handelt. Patienten, bei denen ein Primärtumor nie gefunden wird, werden deshalb auch als wahre CUP-Populationen bezeichnet (Tribius et al., 2012). In 50–75 % der Fälle kann bei dieser Population durch eine Autopsie post mortem ein Primärtumor entdeckt werden, der zu Lebzeiten trotz intensiver Diagnostik verborgen blieb. Dieser befindet sich dann i. d. R. in Lunge, Pankreas, Darm, Niere oder den Gallenwegen (Pentheroudakis et al., 2007).

1.1.1 Diagnose

Bei ca. 1–2 % aller Kopf-Hals-Tumoren handelt es sich um ein CUP-Syndrom (Guntinas-Lichius et al., 2006). Klinisch tritt dieses meist durch einen schmerzlosen, einseitigen Befall der zervikalen Lymphknoten in Erscheinung (Sinnathamby et al., 1997). Bei 5–10 % aller Patienten, die sich mit einer zervikalen Metastase vorstellen, findet man den Primärtumor nicht auf Anhieb (Adams & O'Brien, 2002). Ist dies der Fall folgt i. d. R. eine wie schon geschilderte initiale Diagnostik, die u. a. Blut-, Urin- und Stuhlanalyse beinhaltet, wobei es keine einheitliche Richtlinie oder Vorgehensweise gibt. Nach Durchführung pathologischer Screenings mittels immunhistochemischer Färbung auf z. B. CK7/CK20 (Differenzierung von

Adenokarzinom), CK5/6 (Plattenepithelkarzinom) oder TTF-1 (Bronchialkarzinom) schließen sich dann je nach Ergebnis weitere Untersuchungen wie Broncho- oder Koloskopie an (Greco, 2013). Beim hier untersuchten CUP des Kopf-Hals-Bereichs handelt es sich in bis zu 90 % der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom (Tribius et al., 2012).

Verwendung in der Diagnostik des CUP finden weiterhin häufig 18F-Fluoro-2-Deoxyglucose Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) und 18F-Fluoro-2-Deoxyglucose Positronen-Emissions-Tomographie/Computer-Tomographie (FDG-PET/CT), mit deren Hilfe laut Literatur in bis zu 41 % (FDG-PET) bzw. bis zu 73 % (FDG-PET/CT) der Fälle ein Primärtumor detektiert werden kann (Rusthoven et al., 2004; Sève et al., 2007; Fencel et al., 2007; Fleming et al., 2007). Bei FDG-Anreicherung in einem Gebiet, das nicht dem der bekannten Metastasen entspricht, folgt eine weitere teils invasive Diagnostik. Da es aber auch zu einer falsch-positiven FDG-Anreicherung kommen kann, birgt eine FDG-Untersuchung immer auch die Gefahr, dass eine den Patienten belastende invasive Diagnostik durchgeführt wird, die für ihn jedoch keinen Nutzen mit sich bringt, zumal das Ergebnis der invasiven Diagnostik auch bei korrekt-positiver FDG-Anreicherung nicht immer auch tatsächlich den Therapieverlauf beeinflusst (Park et al., 2011).

Durch die geschilderte intensive Diagnostik kann im Kopf-Hals-Bereich in 3–8 % der vermeintlichen CUP-Fälle mit zunächst unbekanntem Primärtumor doch noch ein Primärtumor identifiziert werden (Grau et al., 2000). Es verbleiben jedoch die eingangs erwähnten ca. 1–2 %, bei denen die Diagnose zervikales CUP gestellt wird (Guntinas-Lichius et al., 2006).

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Offensichtliche Risikofaktoren oder andere ätiologische Faktoren, welche die Pathogenese von CUP erklären würden, sind nicht bekannt. Ebenso konnte man bis jetzt keine spezifischen genetischen Alterationen identifizieren, die ursächlich für die Entstehung von CUP sein könnten (Pavlidis et al., 2009). Man verfolgt bei zervikalem CUP zwei Theorien bzgl. der Pathogenese. Zum einen ist es möglich, dass es zu einer durch das Immunsystem vermittelten Rückbildung des Primärtumors kommt, während die Metastasen weiter progredient sind (Neben et al., 2008). Zum anderen könnte es zu einer „malignen Transformation versprengter Epithelzellen am Metastasierungsort ohne Primärtumor“ kommen (Neben et al., 2008; Califano et al., 1996).

Bei ca. 4 % aller diagnostizierten Neoplasien kann kein Primärtumor gefunden werden, sodass die Diagnose CUP lautet (van de Wouw et al., 2002). Damit stellt CUP weltweit die siebt- bis achthäufigste Form von Krebs dar und ist bei Frauen und Männern die vierthäufigste Ursache für einen Tod durch Krebsleiden (Pavlidis et al., 2003). Auch in Europa gehört CUP zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen (Neben et al., 2008). Bei den für diese Arbeit relevanten malignen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich handelt es sich bei ca. 1–2 % um CUP (Guntinas-Lichius et al., 2006). In Deutschland erkranken insgesamt ca. 50/100.000 Einwohnern pro Jahr an einem malignen Kopf-Hals-Tumor, dementsprechend beträgt die Inzidenz des zervikalen CUP ca. 0,5–1/100.000 (Keilholz, 2013).

1.1.3 Klassifikation

Eine Klassifikation des CUP ist von Bedeutung, damit eine gezielte weitere Diagnostik und eine möglichst optimale Therapie im Sinne des Patienten erfolgen können. Zudem können verlässlichere Aussagen über die Prognose getroffen werden und nicht zuletzt dient die Klassifikation als Basis für Studien und deren Vergleichbarkeit, um die Grundlagen für eine adäquate Therapie zu schaffen (Osborne, 2011).

Für gewöhnlich werden maligne Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mittels TNM-Klassifikation der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC) eingeteilt (Sloan, 2009). Dabei erfolgt die Einteilung nach Größe des Primärtumors (T), Lymphknotenbefall (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Da bei CUP keine Erkenntnisse bzgl. des Primärtumors vorliegen, kann für die Klassifikation nur N in leicht abgewandelter Form bestimmt werden. Bei einem bekannten Primärtumor wird im Rahmen der N-Kategorie auch die Lokalisation der Lymphknotenmetastase in Bezug auf die Seite, auf der sich der Primärtumor befindet, berücksichtigt (Tabelle 1).

Tab. 1: N-Kategorie nach UICC (7. Aufl., 2010).

N1	Eine einzelne Lymphknotenmetastase < 3 cm
N2a	Eine einzelne Lymphknotenmetastase > 3 bis 6 cm
N2b	Mehrere Lymphknotenmetastasen < 6 cm auf einer Seite
N2c	Lymphknotenmetastasen auf beiden Seiten < 6 cm
N3	Lymphknotenmetastase(n) > 6 cm

1. Einleitung

CUP lässt sich u. a. auch nach den Guidelines des National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) definieren. Dabei werden drei Untergruppen unterschieden, die sich in erster Linie durch die zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden Erkenntnisse bzgl. der Lokalisation eines Primärtumors in Verbindung mit der bis dahin getätigten Diagnostik unterscheiden (Tabelle 2).

Tab. 2: CUP-Klassifikation nach NICE-Guidelines (2010).

Malignancy of undefined primary origin (MUO)	Durch begrenzte Anzahl an Tests identifizierte Metastase ohne auffindbaren Primärtumor; umfassende Diagnostik noch ausstehend.
Provisional carcinoma of unknown primary (pCUP)	Durch histologische und zytologische Untersuchungen identifizierte epitheliale oder neuro-endokrine Metastase ohne auffindbaren Primärtumor; initiale Diagnostik erfolgt, weitere Untersuchungen noch ausstehend.
Confirmed carcinoma of unknown primary (cCUP)	Primärtumor bleibt trotz intensiver weiterführender Diagnostik und spezieller Tests verborgen.

Des Weiteren lässt sich CUP nach ICD-10 wie folgt codieren (Tabelle 3):

Tab. 3: CUP-Klassifikation nach ICD-10 (2013).

C77	Sekundäre und nicht näher bezeichnete bösartige Neubildung der Lymphknoten
C78	Sekundäre bösartige Neubildung der Atmungs- und Verdauungsorgane
C79	Sekundäre bösartige Neubildung an sonstigen und nicht näher bezeichneten Lokalisationen
C80	Bösartige Neubildung ohne Angabe der Lokalisation

Entsprechend seiner Histologie kann man CUP in Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom oder undifferenziertes Karzinom unterteilen (Altman & Cadman, 1986), wobei es sich bei zervikalem CUP in über 90 % der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom handelt (Schmalbach & Miller, 2007).

Zusätzlich erfolgt ein „Grading“, d. h. eine Einteilung des Gewebes in Abhängigkeit von dessen Differenzierung (Tabelle 4). Dies soll weitere prognostische Möglichkeiten bieten (Akhter et al., 2011).

Tab. 4: Grading nach UICC (7. Aufl., 2010).

G1	gut differenziertes bösartiges Gewebe
G2	mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
G3	schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe
G4	nicht differenziertes bösartiges Gewebe

1.1.4 Therapie und Prognose

Beim CUP sind sowohl Therapie als auch Prognose abhängig von der Lokalisation sowie der Histologie des Befunds (Krämer et al., 2008). Die Wahl der Therapie ist umstritten, es gibt keine einheitliche Empfehlung hierzu (Guntinas-Lichius et al., 2006). Die European Society for Medical Oncology (ESMO) empfiehlt in ihren *Minimal Clinical Recommendations* bei zervikalem CUP für N1–N2 eine Bestrahlung und für höhere Stadien zusätzlich eine Chemotherapie mit einer auf Platin basierenden Kombination (Briasoulis et al., 2005). Die *Standard, Options, and Recommendations* der French National Federation of Cancer Centres (FNCLCC) stellen evidenzbasierte Empfehlungen dar, die in Zusammenarbeit mit einer Gruppe unabhängiger Experten erstellt wurden. Dabei wurden die Empfehlungen in die Kategorien „Standard“ und „Optional“ unterteilt, abhängig davon, ob sich alle Experten einig waren („Standard“), oder nur die Mehrheit ein bestimmtes Vorgehen als vorteilhaft, unangemessen oder sogar potenziell gefährlich erachtete („Optional“). Laut der Empfehlungen sollten der Kategorie „Standard“ entsprechend bei zervikalem CUP eine Neck Dissection sowie ergänzend eine Radiotherapie durchgeführt werden. Sollte eine Operation nicht möglich sein, wird jedoch eine Radiotherapie gemäß der Kategorie „Standard“ empfohlen. Chemotherapie ist der Kategorie „Optional“ entsprechend bei denjenigen Patienten angebracht, bei denen eine Neck Dissection bzw. Resektion nicht möglich ist (Bugat et al., 2003). Eine Neck Dissection kann als „radikale Neck Dissection“ durchgeführt werden, d. h. unter Entfernung aller ipsilateralen zervikalen Lymphknotengruppen, Level I–VI sowie der V. jugularis interna, des M. sternocleidomastoideus und des N. accessorius. Alternativ ist auch eine Durchführung als „modifiziert radikale Neck Dissection“, d. h. unter Erhalt mind. einer nicht-lymphatischen Struktur wie z. B. der V. jugularis interna möglich oder als „selektive Neck Dissection“ unter Erhalt mind. einer Lymphknotengruppe (Robbins et al., 2002).

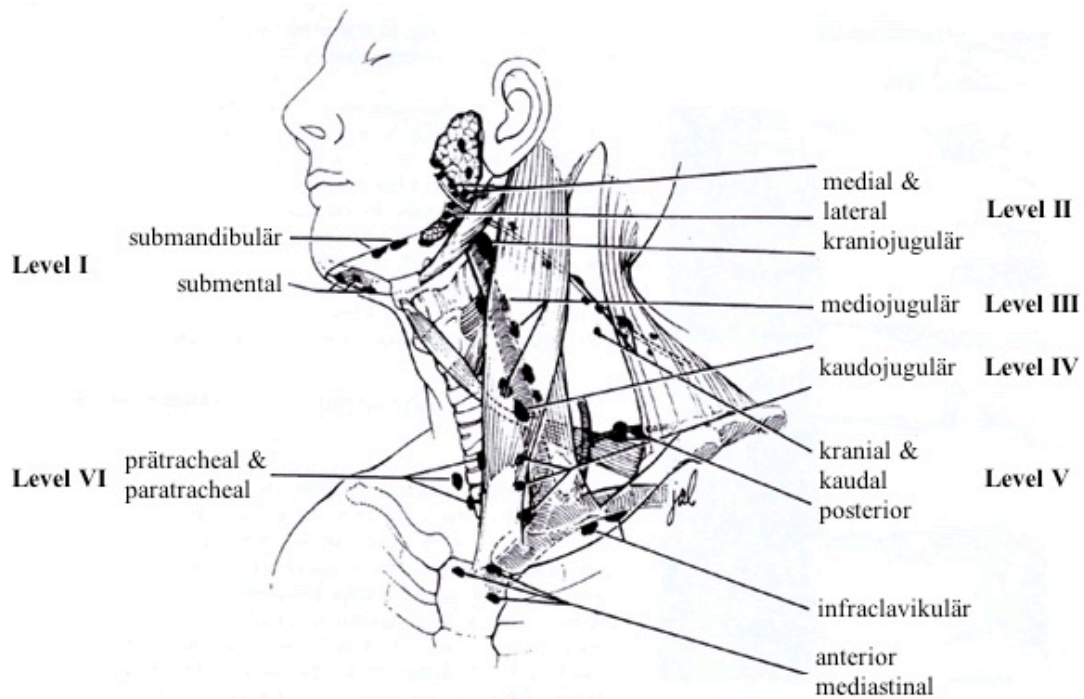


Abb. 1: Anatomische Darstellung der zervikalen Lymphknotenregionen (Level I–VI).

(modifiziert nach Chaplin, 2015)

Die Wahrscheinlichkeit abnehmender Tumorkontrolle nach Radiotherapie steigt mit zunehmender N-Kategorie. Möglicherweise ist der Nutzen einer sanierenden Operation bei höherer N-Kategorie analog hierzu größer, dies ist jedoch durch Literaturdaten bzw. Forschungsbefunde nicht ausreichend abgesichert (Jereczek-Fossa et al., 2004). Letztlich ist der Benefit einer sanierenden Tumoroperation zervikal nicht unumstritten – insbesondere bei N1-Kategorie. Die ebenfalls nicht unumstrittene Radiotherapie beim zervikalen CUP umfasst häufig auch die Radiotherapie von Teilen des Oropharynx sowie des Nasopharynx und kann analog zur Therapie eines bekannten Primärtumors in diesen Regionen erfolgen (Barker et al., 2005; Wallace et al., 2011). Da der Primärtumor häufig in Mittellinienstrukturen wie dem Zungengrund vermutet wird, erfolgt i. d. R. eine Bestrahlung des gesamten Oropharynx (Mendenhall et al., 2001). In wenigen Fällen, so z. B. bei Patienten mit N1-Kategorie, kommt auch eine alleinige Neck Dissection mit anschließender engmaschiger Nachsorge infrage (Barker et al., 2005).

Bei der Nachsorge sollte wie bei Kopf-Hals-Tumoren mit bekanntem Primärtumor verfahren werden (Pavlidis et al., 2009). Dies beinhaltet Nachsorgeuntersuchungen im Abstand von drei Monaten im ersten Jahr sowie von vier bis sechs Monaten im zweiten

sowie halbjährlich im dritten und im vierten Jahr nach Diagnose. Ab dem fünften Jahr folgen jährliche Untersuchungen (Stasche & Schmieder, 2010).

CUP im Allgemeinen hat eine ungünstige Prognose mit einem mittleren Überleben von 10–14 Monaten bzw. bis zu 25 Monaten nach abgeschlossener Radiotherapie (Palmeri et al., 2006; Sher et al., 2011). Zervikales CUP zählt jedoch zu den prognostisch günstigeren Subgruppen (Pavlidis & Pentheroudakis, 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt hier 52 %, das mittlere Überleben liegt bei 89 Monaten (Guntinas-Lichius et al., 2006).

HPV-positive Karzinome gehen mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit einher. Bei zervikalem Plattenepithelkarzinom kann das mittlere Überleben bei HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen Fällen um neun Monate höher liegen (Weiss et al., 2010).

Ein zusätzlicher wichtiger prognostischer Faktor innerhalb der Gruppe von zervikalem CUP ist der Lymphknotenstatus. Je höher dieser ist, desto schlechter ist die Prognose (Jereczek-Fossa et al., 2004). Zudem sind weitere unabhängige prognostische Faktoren, zu denen unter anderem Alter, Geschlecht und Performance Status zählen, beschrieben. Hierbei wird i. d. R. der Performance-Status der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) verwendet, der von 0 (keine körperlichen Einschränkungen) bis 4 (bettlägerig) reicht. Beispielsweise wurde eine schlechtere Prognose bei Männern, Patienten mit einem Performance Status höher als 1, Patienten älter als 64 und Patienten mit mind. 10 pack-years, d. h. einem Nikotinkonsum von durchschnittlich einem Päckchen pro Tag und Jahr, beschrieben (Culine, 2009).

1.2 **Humanes Papillomavirus**

Das humane Papillomavirus (HPV) ist ein DNA-Virus. Es ist gewebsspezifisch und hat das Potenzial, Epithelzellen von Haut und Schleimhäuten zu infizieren. Dies kann eine Zellproliferation in den betroffenen Bereichen bewirken, was wiederum die Ausbildung von gutartigen Warzen zur Folge haben kann. Darüber hinaus ist auch eine unkontrollierte Proliferation im Sinne eines Tumorwachstums möglich (zur Hausen, 1989). Dies wurde in der Vergangenheit bei malignen Entartungen im Gebärmutterhalsbereich beobachtet und untersucht (Walboomers et al., 1999).

Übertragen wird HPV durch sexuellen Kontakt, sodass das Risiko, sich zu infizieren, mit steigender Zahl an Sexualpartnern ebenfalls steigt (Schwartz et al., 1998). Beim Gebärmutterhalskarzinom, dem am deutlichsten mit HPV-Infektion in Verbindung stehenden Karzinom, konnte in über 90 % der Karzinome eine HPV-Infektion mit

„high-risk“-Typen nachgewiesen werden (zur Hausen, 1996). Auch bei Kopf-Hals-Tumoren konnte in ca. 20–35 % der Fälle dieser Nachweis erfolgen (Snijders et al., 1996; McKaig et al., 1998). Bei zervikalem CUP konnte jedoch auch eine Prävalenz zwischen 50 und sogar 80 % festgestellt werden (Tribius et al., 2011; Zengel et al., 2012).

HPV gehört zur Familie der Papillomaviridae und wird je nach Typ weiter unterteilt in die Gattungen Alpha-, Beta- und Gammapapillomavirus (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2013). Insgesamt wurden bis dato über einhundert HPV-Typen entdeckt, wobei man davon ausgeht, dass bis zu zweihundert HPV-Typen existieren könnten (Lizano et al., 2009). Je nach DNA-Sequenzlänge werden diese in fünf Gruppen eingeteilt. Zusätzlich unterscheidet man Haut- von Schleimhauttypen, die wiederum abhängig von ihrer onkogenen Potenz unterteilt werden (Klussmann et al., 2004). Wesentlich ist die Unterscheidung von „high risk“-Typen und „low risk“-Typen, die man sowohl unter den Haut- als auch den Schleimhauttypen finden kann. Zu den „high risk“-Typen gehören jene HPV-Typen, die mit malignen Entitäten assoziiert sind, wie z. B. dem Cervixkarzinom. Von den über einhundert bekannten HPV-Typen werden 15 zu den „high risk“-Typen gerechnet (Hoste et al., 2013). Vertreter der „high risk“-Typen sind unter anderem HPV-Typ 16 und 18 (Scheffner et al., 1992). „Low risk“-Typen fördern hingegen das Wachstum benigner Warzen, z. B. der Verruca vulgaris (gewöhnliche Hautwarze) oder Condylomata acuminata (Feigwarze) (Alani & Münger, 1998). Vertreter der „low risk“-Typen sind unter anderem die HPV-Typen 1, 2, 3 und 4 (Chen et al., 1993).

1.2.1 Aufbau des Humanen Papillomavirus

Das HPV ist aufgebaut als rundliches Kapsid in der Form eines Isokaeders. Es besitzt eine zirkuläre, doppelsträngige DNA mit einer Länge von ca. 8000 Basenpaaren. Jedoch codiert nur einer der beiden DNA-Stränge für die viralen Proteine, da nur dieser sogenannte „open reading frames“ beinhaltet und damit eine Replikation ermöglicht (Phelps & Alexander, 1995).

Eine Infektion mit dem Virus ist nur möglich, wenn die epitheliale Barriere nicht intakt ist, da zunächst die basalen, sich replizierenden Keratinozyten infiziert werden (Alani & Münger, 1998). Nach Infektion einer Zelle kommt es zur Replikation von viraler DNA in der Zelle (Phelps & Alexander, 1995). Das HPV-Genom kann hierbei in drei wichtige Abschnitte unterteilt werden. Ein früher Abschnitt, genannt E-Region (Early-

Region), ist etwa 4000 Basenpaare (bp) lang und codiert nichtstrukturelle Proteine. Ein späterer Abschnitt, genannt L-Region (Late-Region), codiert für zwei Kapsid-Proteine und umfasst etwa 3000 bp. Diesem Abschnitt folgt ein ca. 1000 bp langer Kontroll-Abschnitt, der eine Vielfalt von cis-Elementen beinhaltet. Diese cis-Elemente regulieren virale Replikation und Genexpression. Die E- und L-Region sind durchnummeriert, wobei größere Nummern einen kleineren „open reading frame“ repräsentieren. So handelt es sich bei den Abschnitten der L-Region, die für die eben genannten zwei Kapsid-Proteine codieren, um das L1- und L2-Gen (Münger et al., 2004). Der L1-„open reading frame“ ist auch entscheidend, wenn es um die Entdeckung neuer Papillomaviren geht, denn diese werden als neu betrachtet, wenn sich der L1-„open reading frame“ zu mindestens 10 % von den bekannten HPV unterscheidet. Bei 2–10 % an Unterschieden in der DNA handelt es sich um einen neuen Subtypen und bei < 2 % um eine Variante des Virus (de Villiers et al., 2004). Die wichtigsten Virusproteine der E-Region sind E1, E2 sowie E4–7. Ein entscheidender Schritt für die durch HPV induzierte Karzinogenese ist die Integration des HPV-Genoms in das Chromosom der Wirtszelle. Hierfür scheint es allerdings keine spezifischen Abschnitte im humanen Genom zu geben (Ziegert et al., 2003). Kommt es nun zur Integration des HPV-Genoms in die Wirtszelle, kommen die E-Gene zum Tragen. Dies ist wichtig für die virale DNA-Replikation.

Das E1-Protein besitzt DNA-Helikase-Aktivität (Seo et al., 1993). E1- und E2-Protein interagieren in einem Komplex, der an die DNA binden und ihre Replikation bewirken kann. Hierbei fungiert das E1-Protein als Initiator der Replikation und das E2-Protein als Transkriptionsaktivator (Sedman & Stenlund, 1995).

Der E2-„open reading frame“ hingegen codiert für drei DNA-bindende Proteine, welche die Regulation der viralen Transkription steuern (Alani & Münger, 1998). Bei den drei durch das E2-Gen codierten Proteinen handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator sowie zwei Transkriptionsrepressoren, Repressor E2-TR und Repressor E8/E2 (McBride et al., 1989). Das E2-Protein selbst besteht aus drei funktionellen Domänen: einer N-terminalen Transaktivationsdomäne, einer prolinreichen Verbindungssequenz und einer C-terminalen DNA-Bindungsdomäne (Bussiere et al., 1989). Alle drei E2-Proteine teilen sich die C-terminale DNA-Bindungsdomäne, sodass die Repressoren kompetitiv an die E2-Bindungsstelle binden (McBride et al., 1989). Das E2-Protein fungiert als Repressor der E6- und E7-Gene (Bechtold et al., 2003). Ein Verlust des E2-Gens während der viralen Integration hat folglich eine Überexpression der viralen Proteine E6 und E7 zur Folge (Alani & Münger, 1998).

Das E4-Virusprotein tritt zu Beginn der späten Phase der Infektion in Erscheinung. Es trägt zur Amplifikation des HPV-Genoms und zur Virussyntese bei. Seine relativ hohe Expressionsrate lässt zusätzliche Funktionen bei der Virusfreisetzung oder auch Virusübertragung vermuten. Das E4-Protein kann als Biomarker für eine aktive Virusinfektion genutzt werden und im Falle einer Infektion durch einen „high risk“-Typen sogar zur Abschätzung der Schwere der Infektion herangezogen werden (Doorbar, 2013).

Das E5-Protein kann eine Aktivierung des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) bewirken und somit die Zelle zur Proliferation anregen (Leechanachai et al., 1992).

Auf die Proteine E6 und E7 wird im folgenden Abschnitt ein besonderes Augenmerk gelegt. Ihre Funktionsweise wird seit geraumer Zeit sehr intensiv erforscht, da eine Interaktion dieser Proteine mit diversen zelleigenen Proteinen, die den Zellzyklus hemmen, besteht. Zu diesen zählen bspw. das Tumorsuppressorprotein p53 und das Retinoblastomprotein (pRb) (Werness et al., 1990; Münger et al., 1989).

1.2.2 Die viralen Onkogene E6 und E7

Die Expression des viralen Proteins E6 geht einher mit einer erniedrigten Konzentration des Tumorsuppressors p53. p53 induziert in Zellen, die z. B. DNA-Schäden aufweisen, einen Zellzyklusarrest sowie das Eintreten in die Apoptose und unterdrückt somit das Tumorstadium. Diese Funktion wird deutlich bei Versuchen mit sogenannten p53-knockout-Mäusen, die nicht über einen intakten Tumorsuppressor p53 verfügen. Sie bilden schon in frühen Phasen der Tumorentstehung verschiedene Arten von Tumoren aus (Ko & Prives, 1996). Die durch E6 vermittelte erniedrigte Konzentration ist jedoch nicht auf eine Repression der Transkription von p53 zurückzuführen, sondern auf eine Stimulierung der Ubiquitinierung und somit des Abbaus des Tumorsuppressors p53 (Scheffner et al., 1990). Dies wird z. B. durch die Halbwertszeit von p53 in HPV infizierten Keratinozyten deutlich. Hier beträgt sie nur 15 bis 30 Minuten, während sie ohne Einfluss des Proteins E6 1 bis 4 Stunden beträgt (Hubbert et al., 1992). Zudem treten HPV-positive Zellen als Folge des E6 vermittelten p53-Defizits entgegen physiologischer Abläufe nicht in den Zellzyklusarrest ein, wenn sie Bestrahlung oder DNA-schädlichen Medikamenten ausgesetzt werden (Kessis et al., 1993).

Das E6-Protein wiegt 18kDa (Thomas et al., 1999). Es besitzt charakteristischerweise vier Cys-X-X-Cys-DNA-Sequenzen, die zwei Zinkfinger bilden (Cole & Danos, 1987; Grossman & Laimins, 1989). Das Virusprotein E6 vermittelt den Abbau von p53 über

ein E6-assoziiertes Protein (E6-AP) (Huibregtse et al., 1993). Das E6-AP agiert als E3-Ubiquitinprotein-Ligase. Die Ubiquitinierungskaskade umfasst folgende Schritte: Das E1-Protein aktiviert Ubiquitin, das dann durch das E2-Konjugationsenzym in die E3-Ubiquitinprotein-Ligase umgewandelt wird. Diese erkennt dann spezifische Targetproteine (Hershko & Ciechanover, 1992). Mutierte E6-AP, die E6 nicht binden können, können auch p53 nicht binden und somit auch nicht seine Ubiquinierung stimulieren (Huibregtse et al., 1993). Auf der anderen Seite sind p53-Mutationen, die kein E6 binden können, resistent gegen die Einleitung der Ubiquinierung durch E6-AP (Scheffner et al., 1992). Dies lässt den Schluss zu, dass E6 für die Vermittlung der Interaktion zwischen Tumorsuppressor p53 und E6-AP obligat ist bzw. die E3-Ligase in der Ubiquinierungskaskade nicht aus E6-AP allein besteht, sondern aus einem E6-AP/E6-Komplex (Thomas et al., 1999). Zusätzlich zu der durch E6-AP vermittelten Interaktion von E6 und p53 kann das E6-Protein p53 auch direkt binden, ohne jedoch den Abbau von p53 einzuleiten. Diese Bindung verhindert allerdings, dass p53 an DNA binden und seine Funktion im Zellzyklus ausüben kann (Lechner & Laimins, 1994).

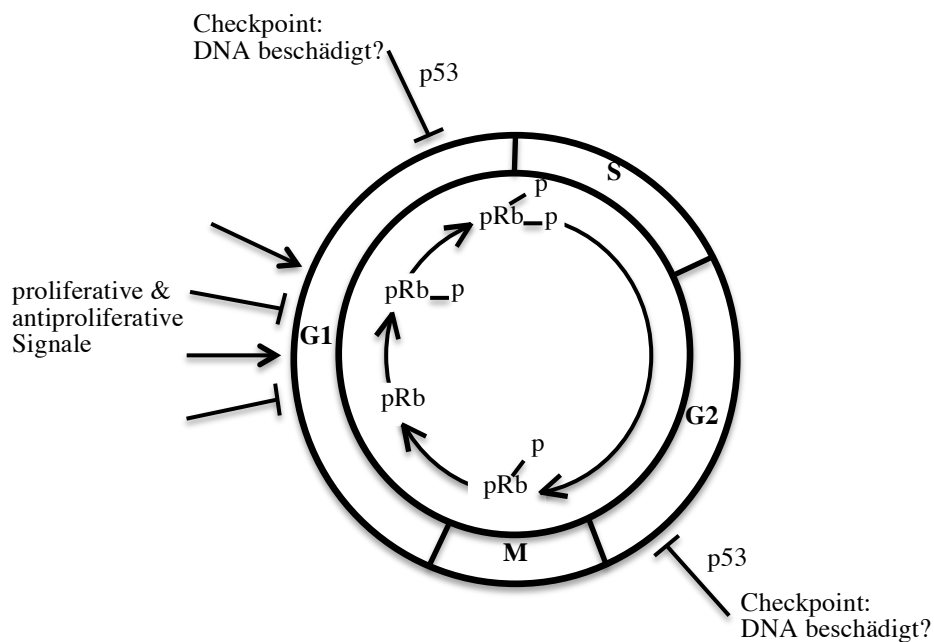


Abb. 2: Zellzyklus.

p53 fungiert an den Checkpoints, pRb je nach Phosphorylierungszustand in der G1-Phase.
(modifiziert nach Grana & Reddy, 1995)

Das E7-Protein führt zu einem Verlust des Retinoblastomaproteins (pRb). pRb gehört ebenfalls zur Gruppe der Tumorsuppressorproteine und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Länge der G1-Phase des Zellzyklus (Weinberg, 1995). Dabei liegt pRb in den Zellen sowohl in hypo- bzw. unphosphorylierter (p110) als auch in hyperphosphorylierter (p112-114) Form vor (DeCaprio et al., 1989). Die

unphosphorylierte Form des pRb bildet Komplexe mit E2F-Transkriptionsfaktoren und kann somit die Produktion von Genen, die entscheidend für eine Zellzyklusprogression sind, unterbinden. G2-, M- und S-Phase-cyclinabhängige Kinasen phosphorylieren pRb, sodass es zur Lösung des pRb/E2F-Komplexes kommt und der Zellzyklus fortgeführt werden kann. Somit erklärt sich auch die Funktion von pRb während der G1-Phase (Chellappan et al., 1991). Das E7-Protein bindet nun zum einen spezifisch an hypophosphoryliertes pRb (Dyson et al., 1989), zum anderen initiiert es den Abbau von pRb, was eine erniedrigte pRb-Konzentration bei normalen pRb-mRNA-Konzentrationen zur Folge hat (Wazer et al., 1995). Der Abbau von pRb erfolgt hierbei über ubiquitinvermittelte Proteolyse (Boyer et al., 1996). Die Konsequenz beider Vorgänge ist jeweils die kontinuierliche Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren. Somit kommt es zu einem unkontrollierten Voranschreiten des Zellzyklus. Zusätzlich reduziert das Virusprotein E7 die Expression des zellulären E-Cadherins (Laurson et al., 2010). E-Cadherin spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. So wird auf der Oberfläche von Keratinozyten präsentiertes E-Cadherin für die Migration von Langerhanszellen, einer Gruppe dendritischer Zellen, benötigt (Tang et al., 1993). Das E7-Protein bewirkt jedoch nicht den Abbau des E-Cadherins via Proteolyse, sondern fördert die Anreicherung von DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1), die eine Reduktion der Transkription der E-Cadherin-Gene zur Folge hat. Eine Inhibierung der Dnmt 1 bewirkt dementsprechend einen Anstieg der E-Cadherin-Level (Laurson et al., 2010). E6 und E7 fungieren folglich als Onkoproteine, indem sie über die Hemmung von Tumorsuppressoren eine ungehemmte Zellproliferation und somit Entartung des Gewebes fördern. Das allein reicht jedoch nicht aus, um die Karzinogenese in Gang zu setzen. Vielmehr benötigt es sogenannte „intraepitheliale Vorläuferläsionen“. Diese entstehen durch z. B. die Expression weiterer Onkogene (Dürst et al., 1989). Zwischen Infektion mit dem humanen Papillomavirus und einer damit verbundenen Tumorerkrankung liegen deshalb i. d. R. viele Jahre.

1.2.3 Der Tumorsuppressor p16

Der Tumorsuppressor p16 gehört zur Familie der INK4, einer Gruppe von Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen (CDK), und ist deshalb auch bekannt als p16^{INK4a}. p16 hemmt CDK4 und CDK6 (Serrano et al., 1993). CDK4 und CDK6 sind für die Phosphorylierung des pRb in der späten G1-Phase verantwortlich, was den Eintritt der Zelle in die S-Phase ermöglicht (Li et al., 2011). p16 trägt also im Sinne eines negativen

Regulators dazu bei, dass pRb in seinem hypophosphorylierten Zustand verbleibt und es nicht zur Lösung des pRb/E2F-Komplexes mit folgendem Progress des Zellzyklus kommt (Sherr, 1996).

Eine p16-Überexpression korreliert in der Regel mit einer HPV-assoziierten Karzinogenese und kann hier sogar als prognostischer Marker bei CUP dienen (Vent et al., 2013). Bei HPV-negativen Karzinomen findet man diese Überexpression seltener, im Gegenteil findet man hier häufiger einen Verlust von p16 (Karsai et al., 2007). Der Grund hierfür ist, dass der Tumorsuppressor p16 seine Wirkung über pRb vermittelt. Das Virusprotein E7 interagiert mit pRb und führt somit zur Freisetzung von E2F, das wiederum die Synthese des p16 induziert (zur Hausen, 2002; Wittekindt et al., 2011). Da es sich bei der gesteigerten Konzentration von p16 letztendlich um eine durch das HPV-Protein E7 vermittelte Reaktion handelt, kann p16 als indirekter Nachweis einer aktiven HPV-assoziierten Tumorerkrankung genutzt werden (Wittekindt et al., 2005). Zusätzlich zu diesem indirekten Nachweis erfolgt ein direkter Nachweis der HPV-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).

1.2.4 Integration und Replikation des HPV

Obligat für die Infektion mit dem humanen Papillomavirus ist, dass das Virus die epitheliale Basalschicht erreicht und in die sich dort teilenden Basalzellen eindringt. Dieser Vorgang wird vermutlich über ein Heparansulfat-Proteoglykan, Syndekan 1, als Rezeptor vermittelt (Shafti-Keramat et al., 2003). Die Viruspartikel werden dann von Clathrin umhüllten Vesikeln via Endozytose aufgenommen und gebunden. In den späten Endosomen und Lysosomen werden die Viruspartikel anschließend zerlegt (Day et al., 2003). Es kommt zum Uncoating, der Freisetzung der viralen DNA, und dem Transport der viralen DNA zum Nucleus mithilfe des Capsid-Proteins L2. Schon 12 Stunden nach einer Infektion können virale Transkripte in Form von mRNA nachgewiesen werden (Day et al., 2004).

Der Infektion folgt die Integration des viralen Genoms als stabiles Episom, ohne dass es jedoch zur tatsächlichen Integration des Plasmids in das Genom der Wirtszelle kommt. Hierbei sind nun die Virusproteine E1 und E2 mit ihrer Fähigkeit, die virale DNA-Replikation zu initiieren, von Bedeutung. In den Basalzellen kommt es während der S-Phase des Zellzyklus zur Replikation des viralen Genoms zeitgleich mit derjenigen der zellulären DNA. Die dabei in der infizierten Basalzelle entstehenden Genome werden dann während der Zellteilung zu gleichen Teilen auf beide Zellen verteilt und somit an

die Tochterzelle weitergeben. Diese Tochterzelle verlässt im Folgenden die Basalzellschicht und wandert in die äußeren Schichten des Epithels. Die in der Basalzellschicht verbleibende Zelle sorgt fortan für eine kontinuierliche Produktion des Virus (Doorbar, 2006). Für gewöhnlich sind nur die Basalzellen zur Teilung fähig, allerdings können die Virusproteine E6 und E7 bei Zellen der äußeren Zellschichten eine Resistenz gegenüber einer Ausdifferenzierung bewirken und sie zur weiteren Teilung anregen, womit auch hier eine Vermehrung des Virus ermöglicht wird (Münger et al., 1989).

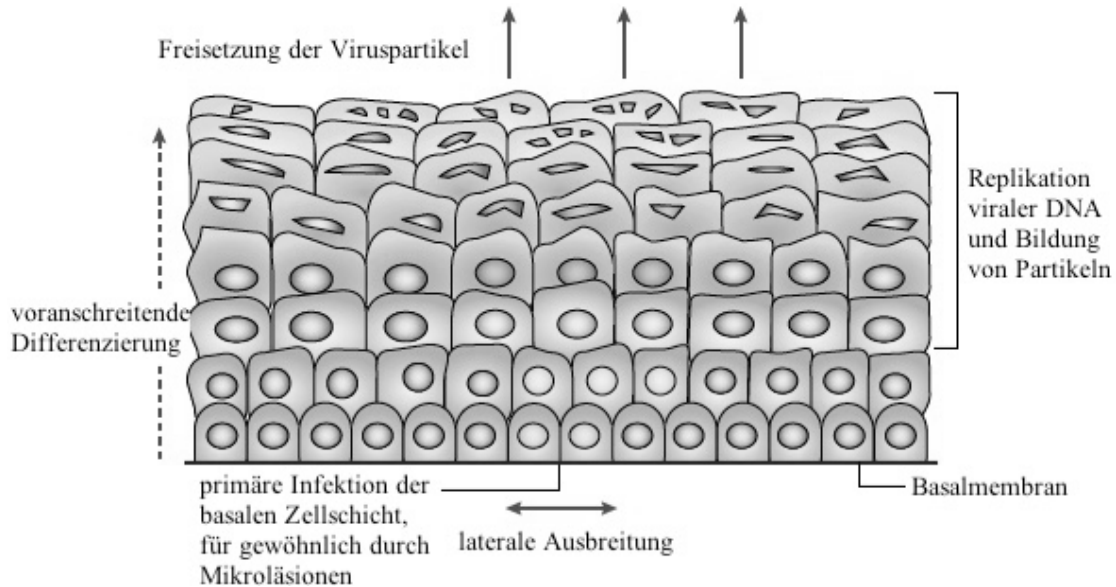


Abb. 3: Lebenszyklus des humanen Papillomavirus (HPV).

Bedingung für eine Infektion ist das Vorhandensein einer basalen Zellschicht. Dies ist für gewöhnlich bei kleinen Läsionen der Haut oder Mukosa der Fall. Die infizierte Zelle teilt sich und breitet sich lateral aus. Bei einem Teil der Zellen kommt es zur Wanderung in die suprabasalen, sich differenzierenden Zellschichten, wo virale Gene aktiviert werden. Die virale DNA wird repliziert und Capsid-Proteine werden gebildet. Es folgt die Bildung viraler Partikel, die an der Oberfläche freigesetzt werden und anschließend ggf. weiteres Gewebe infizieren.

(modifiziert nach zur Hausen, 2002)

1.3 Cancer of Unknown Primary und Humanes Papillomavirus

In Studien wurde gezeigt, dass eine Beziehung zwischen Cancer of Unknown Primary und einer Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) besteht; demnach kommt es bei Patienten, bei denen eine HPV-Infektion vorliegt, häufiger zum Auftreten eines CUP im Kopf-Hals-Bereich (Zengel et al., 2012). Als eine Ursache hierfür gilt die frühe lymphatische Metastasierung bei HPV-positiven Tumoren (Zengel et al., 2012).

Dass eine HPV-Infektion als Risikofaktor nicht nur für Gebärmutterhalstumore, sondern auch Kopf-Hals-Tumore fungiert, wurde bereits gezeigt (Gillison et al., 2000; Paz et al., 1997). Auch der HPV-positive Status bei Metastasen im Kopf-Hals-Bereich kann als Indikator für eine Genese des Tumors aus dieser Region, d. h. der Kopf-Hals-Region, gesehen werden (Begum et al., 2007; Park et al., 2012; Yasui et al., 2014).

Zudem wird in Studien beschrieben, dass bei Patienten mit CUP der HPV-Status als prognostischer Faktor dienen kann und nicht zuletzt deswegen eine Routine bei der Diagnostik des CUP im Kopf-Hals-Bereich sein sollte (Tribius et al., 2012; Weiss et al., 2010).

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der hier genannten Arbeiten zum Thema Cancer of Unknown Primary und Humanes Papillomavirus einschließlich ihrer Kernaussagen.

Tab. 5: Arbeiten zu Cancer of Unknown Primary und Humanes Papillomavirus

Yasui, T., Morii, E., Yamamoto, Y., Yoshii, T., Takenaka, Y., Nakahara, S., et al.	Human Papillomavirus and Cystic Node Metastasis in Oropharyngeal Cancer of Unknown Primary Origin.	2014 in PLOS ONE	HPV-positiver Status bei Metastasen im Kopf-Hals-Bereich als Indikator für die Genese des Tumors aus dieser Region.
Park, G., Lee, M., Roh, J.-L., Yu, MS, Choi, S.-H., et al.	Human papillomavirus and p16 detection in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor.	2012 in Oral Oncology	HPV-positiver Status bei Metastasen im Kopf-Hals-Bereich als Indikator für die Genese des Tumors aus dieser Region.
Zengel, P., Assman, G., Mollenhauer, M., Jung, A., Sotlar, K., Kirchner, T., et al.	Cancer of unknown primary origin from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity.	2012 in Virchows Arch	HPV-Infektion korreliert mit gehäuften Auftreten eines CUP im Kopf-Hals-Bereich. Ursächlich sei u. a. eine frühe lymphatische Metastasierung.
Tribius, S., Hoffmann, A., Bastrop, S., Görögh, T., Haag, J., Röcken, C., et al.	HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome.	2012 in Oral Oncology	HPV-Status als prognostischer Faktor; Bestimmung idealerweise als Routine zum Zeitpunkt der Diagnose.
Weiss, D., Koopman, M., & Rudack, C.	Prevalence and Impact on Clinicopathological Characteristics of Human Papillomavirus-16 DNA in Cervical Lymph Node Metastases of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.	2010 in Head Neck	HPV-Status als prognostischer Faktor; Bestimmung idealerweise als Routine zum Zeitpunkt der Diagnose.

Begum, S., Gillison, M., Nicol, T., & Westra, W.	Detection of Human Papillomavirus-16 in Fine-Needle Aspirates to Determine Tumor Origin in Patients with Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.	2007 in Clin. Cancer Res.	HPV-positiver Status bei Metastasen im Kopf-Hals- Bereich als Indikator für die Genese des Tumors aus dieser Region.
-----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1.4 Epithelial-mesenchymale Transition

In vielen Tumoren geht die maligne Transformation einher mit einem Verlust der epithelialen Charakteristika und einer Zunahme von mesenchymalen Eigenschaften (Burdal et al., 1993). Dieser Vorgang wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Gilles et al., 1999).

Der Verlust der Expression von E-Cadherin, das zusammen mit β -Catenin im Cadherin/Catenin-Komplex zur Zelladhäsion, d. h. der Verbindung der Zellen untereinander, in Kombination mit einer vermehrten Expression von Vimentin beiträgt, dient als Marker für eine EMT (Lee et al., 2006). Vimentin ist ein Protein, das man normalerweise in mesenchymalen Zellen findet. Es wird jedoch auch in epithelialen Zellen exprimiert, z. B. wenn diese während der Embryogenese oder in Phasen der Wundheilung migrieren (Gilles et al., 1999). Die Verbindung mesenchymaler Zellen untereinander ist nicht so stark wie die von epithelialen Zellen, sodass die Fähigkeit der Migration von mesenchymalen Zellen höher ist (Lee et al., 2006). Der mit EMT einhergehende Verlust der epithelialen Eigenschaften und somit auch die Loslösung der Zelle aus dem engen Epithelzellverband fördert den Prozess der Tumordinvasion und Metastasierung (Yang et al., 2004).

EMT ist eng verknüpft mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg, dessen abnorme Aktivierung EMT und somit Tumorprogression und Metastasierung bedingt (Uraguchi et al., 2004). Hierbei fungieren die Effektoren des Wnt-Signalwegs, die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF1, zusammen mit dem Coaktivator β -Catenin im Bereich des Vimentinpromotors und steigern die Vimentinexpression (Gilles et al., 2003).

1.4.1 β -Catenin

β -Catenin übt zwei wichtige Funktionen in der Zelle aus. Zum einen als Verbindungsprotein, zum anderen als Signalprotein. In seiner Funktion als

Verbindungsprotein bindet es zum einen an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin und andererseits über α -Catenin an die Aktinfilamente. Somit ist β -Catenin Teil des Cadherin-Catenin-Komplexes. Durch diesen Komplex werden über α - und β -Catenin die in der Zellwand lokalisierten Cadherin-Moleküle mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Zusätzlich erfüllt β -Catenin Aufgaben als Signalprotein, indem es bei Kontaktlösung oder auch bedingt durch spezielle Wachstumssignale in den Zellkern wandert und dort an der Transkription proliferationsfördernder Gene beteiligt ist (Drenckhahn, 2008).

β -Catenin interagiert zudem mit mehreren Proteinen. Zu diesen gehört nicht nur das schon erwähnte E-Cadherin, sondern auch das Gerüstprotein Axin, das Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Gen und die Transkriptionsfaktoren der Familie der T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor-1 (TCF/LEF1) (Xing et al., 2003; Rubinfeld et al., 1993; Clevers & van de Wetering, 1997).

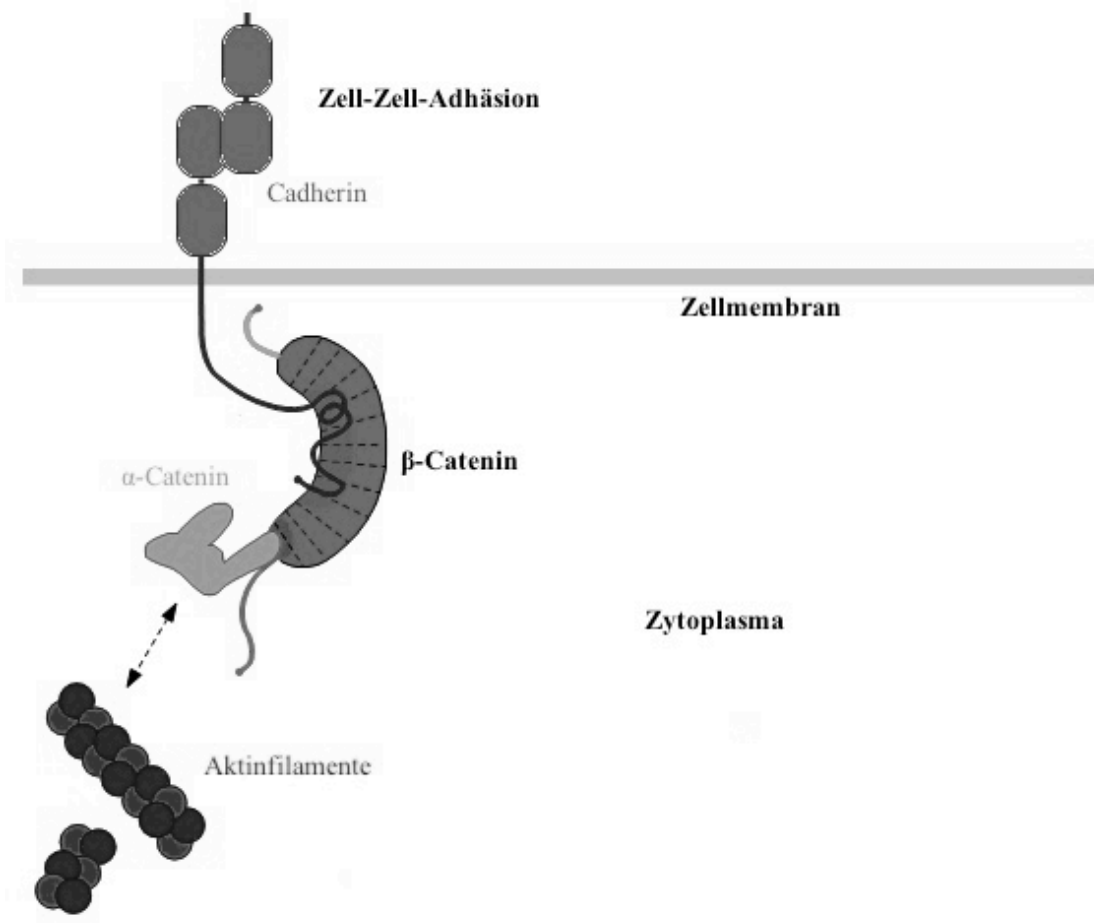


Abb. 4: β -Catenin als Strukturprotein.

β -Catenin fungiert als Verbindungsprotein im Cadherin-Catenin-Komplex, indem es einerseits an den zytoplasmatischen Teil des E-Cadherins und andererseits über α -Catenin an die Aktinfilamente bindet.

(modifiziert nach Bubus, 2013)

1.4.2 Aufbau und Funktion des β -Catenins

β -Catenin ist ein 88kDa schweres Protein, auch bekannt unter dem Namen Cadherin-assoziiertes Protein (National Center for Biotechnology Information, 2017). Die Primärstruktur des Proteins beinhaltet einen Aminoterminus, der eine Rolle bei der Stabilisierung des Proteins spielt (Yost et al., 1996), und einen Carboxy-Terminus, der als Transkriptionsaktivator fungiert (van de Wetering et al., 1997). Entdeckt wurde β -Catenin zunächst zusammen mit E-Cadherin in seiner Funktion als Verbindungsprotein (Vestweber & Kemler, 1984). Dieser Cadherin-Catenin-Komplex wird stabilisiert durch die Phosphorylierung von Serin/Threonin (Ser/Thr) des β -Catenins durch Casein-Kinase II (CKII) (Bek & Kemler, 2002). Wohingegen die Tyrosin-Phosphorylierung des β -Catenins durch den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) die Affinität der beiden Proteine zueinander senkt (Roura et al., 1999). Verliert β -Catenin seine Bindung im Cadherin-Catenin-Komplex und wird frei, kommt es zunächst zur Ansammlung von β -Catenin im Zytoplasma und im Anschluss zur Wanderung des Proteins in den Zellkern (Lee et al., 2010). Dort wirkt es als Coaktivator für Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF1-Familie (Clevers & van de Wetering, 1997). β -Catenin bewirkt zusammen mit TCF/LEF1 z. B. eine erhöhte Expression von Cyclin D1, indem es Histone modifiziert bzw. den Umbau von Chromatin initiiert (Lee et al., 2010). Cycline sind Proteine, welche die Aktivität der cyclinabhängigen Kinasen (CDK) regulieren. Cyclin D1 bildet einen Komplex mit CDK4 oder CDK6 und fungiert hier als Untereinheit dieser CDKs. Die Aktivität der Kinasen wird benötigt, um von der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase zu gelangen (National Center for Biotechnology Information, 2017). Eine vermehrte nukleäre Lokalisation von β -Catenin und eine damit verbundene erhöhte Expression von Cyclin D1 tragen folglich zu einem Zellwachstum und einer potenziellen Entartung der Zelle bei. So findet man bspw. in manchen Melanomen ein erhöhtes β -Catenin-Level als Folge einer Mutation, welche die Ser/Thr-Phosphorylierung verhindert und somit eine erhöhte Stabilität des β -Catenins mit sich bringt (Rubinfeld et al., 1997).

1.4.3 EGFR

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) setzt eine Signalkaskade in Gang, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung zur Folge hat. Dieses in Gang setzen geschieht durch das Binden an die extrazelluläre Region des membranständigen EGF-Rezeptors,

wodurch seine Dimerisierung bewirkt wird und es zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase kommt (Ogiso et al., 2002; Lee et al., 2010). Der EGFR gehört zur Familie der Tyrosinkinasen. Die Stimulierung des EGFR erfolgt über Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), einem nur 6kDa schweren Polypeptid (National Center for Biotechnology Information, 2017; Northcott et al., 2001). Der Rezeptor war der erste Growth Factor Receptor, der 1975 von Carpenter et al. in Krebszellen identifiziert wurde (Burgess, 2008). Zur Familie der EGFR gehören vier Rezeptoren: EGFR, erbB2, erbB3 und erbB4 (Ogiso et al., 2002). Besonders c-erbB2, auch bekannt als HER2, interagiert z. B. mit β -Catenin (Kanai et al., 1995). Hier bewirken die EGFR eine Translokation des β -Catenins von der Zellmembran hin zum Zellkern, wo β -Catenin, wie bereits beschrieben, über Transkriptionsfaktoren zur Zellproliferation und auch Tumorprogression beiträgt (Lee et al., 2010). Die medikamentöse Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms zielt dementsprechend auch auf die überexprimierten Epidermal Growth Factors wie z. B. HER2 ab. So wirkt Gefitinib, ein EGFR-Inhibitor, wachstumshemmend auf Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC). In Kombination mit Pertuzumab, einem Antikörper, der die Dimerisierung von HER2 verhindert, wird dieser Effekt sogar noch gesteigert (Erjala et al., 2006). Bei einer Überexpression von mehr als zwei EGFR steigt auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lymphknotenmetastasen bei HNSCC (Bei et al., 2004).

1.4.4 Wnt-Signalweg

Bei den Wnt-Signalwegen handelt es sich um Signaltransduktionswege, durch die Zellen auf äußere Einflüsse reagieren. Drei Signalwege wurden bis jetzt besonders intensiv beschrieben (Schulte & Bryja, 2007). Einer der drei Signalwege vermittelt seine Wirkung über β -Catenin. Dieser Wnt-Signalweg heißt canonical Wnt-Signalweg oder auch Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Rao & Kühl, 2010). Benannt ist der Wnt-Signalweg nach seinem Signalprotein Wnt. Dieses ist an vielen Entwicklungsschritten während der Embryogenese beteiligt, ist aber auch in Zellen Erwachsener noch für die Stimulation der Mitose oder auch die Differenzierung der Zellen von Bedeutung. Außerdem spielt Wnt auch bei der Karzinogenese eine Rolle (Logan & Nusse, 2004). Im ersten Schritt des Wnt-Signalwegs bindet ein Wnt-Protein an die extrazelluläre Domäne eines Frizzled (Fz) genannten Rezeptors (Bhanot et al., 1996). Bei diesem handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Foord et al., 2005). Das Signal wird nun zunächst vom Fz-Rezeptor auf das im Zytoplasma gelegene

1. Einleitung

Phosphoprotein Dishevelled (Dsh) übertragen. Aktiviertes Dsh hemmt dann die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3) und es kommt zur Auflösung des Destruktionskomplexes (Zeng et al., 1997). Bei dem Destruktionskomplex handelt es sich um einen Komplex aus GSK-3, Axin und APC. In diesem wird β -Catenin von GSK-3 phosphoryliert, was den Abbau von β -Catenin in Proteasomen zur Folge hat (Clevers & Nusse, 2012). Die Bindung eines Wnt-Proteins bewirkt also die Zerstörung des Destruktionskomplexes. β -Catenin wird nicht mehr gebunden und abgebaut und kann sich somit im Zytoplasma anreichern sowie in den Zellkern translozieren. Am Ende des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs stehen die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF-1 als nukleäre Effektoren des Wnt (Molenaar et al., 1996; Behrens et al., 1996).

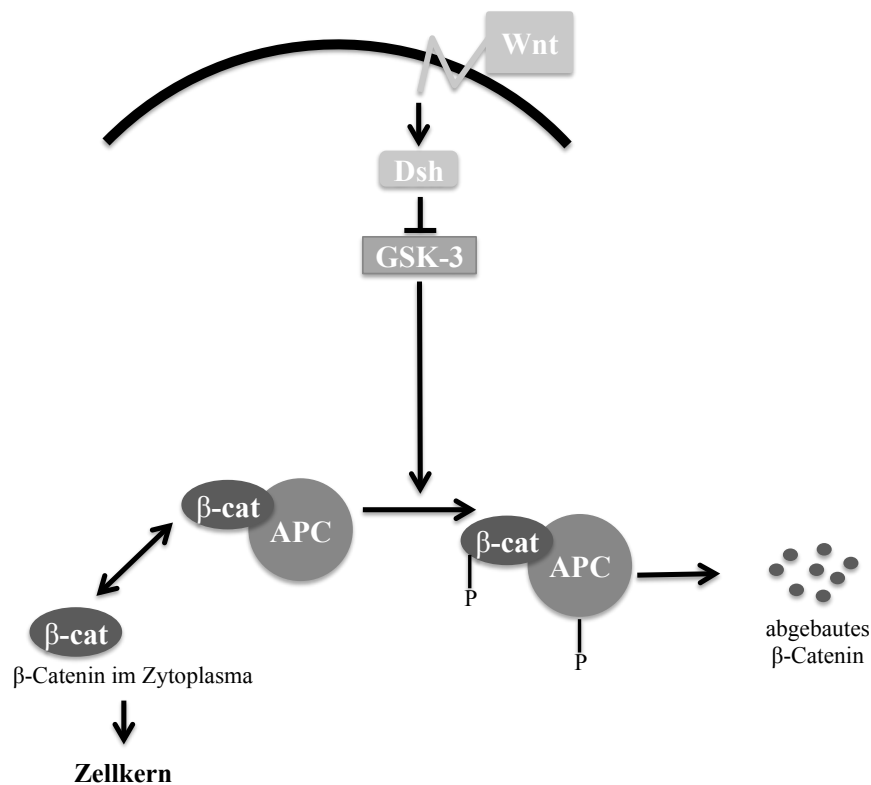


Abb. 5: Wnt-Signalweg.

Wnt bindet an den Fz-Rezeptor, der das Protein Dsh aktiviert. Dieses inhibiert wiederum GSK-3, das den Abbau von β -Catenin fördert. Dies führt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma, von wo aus es zu einer Translokation in den Zellkern kommt.

(modifiziert nach Zeng et al., 1997)

1.5 Laborparameter

Das Erheben von Laborparametern zum Zeitpunkt der Diagnose stellt eine risikoarme, da wenig invasive Diagnostik mittels Blutentnahme, sowie eine vergleichsweise kostengünstige Art der Diagnostik dar.

1.5.1 C-reaktives Protein und Leukozyten

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Protein, das zur Pentaxin-Familie gehört. Es ist Teil der körpereigenen Abwehr, indem es körperfremde Pathogene sowie körpereigene beschädigte Zellen erkennt und ihre Zerstörung initiieren kann. Als Folge steigt das CRP-Level im Blut während bzw. nach einer Verletzung, einer Infektion oder anderer inflammatorischer Stimuli, wie sie auch im Rahmen einer Tumorerkrankung auftreten können (National Center for Biotechnology Information, 2017). Daher kann ein hoher CRP-Wert als Indikator für die Tumoraktivität im Rahmen einer malignen Erkrankung als prognostischer Marker dienen (Shrotriya et al., 2015).

Leukozyten, auch weiße Blutkörperchen genannt, sind kernhaltige Blutzellen, deren Hauptaufgabe die Erkennung sowie Zerstörung oder Abtötung von Fremdkörpern und Krankheitserregern ist (Reuter, 2007). In dieser Funktion sind sie ebenso wie das CRP wichtiger Bestandteil des körpereigenen Abwehrsystems.

1.5.2 Erythrozyten, Hämatokrit und Hämoglobin

Bei den Erythrozyten, auch als rote Blutkörperchen bekannt, handelt es sich um bikonkave, scheibenförmige, kernlose Blutzellen. Der Hämatokritwert beschreibt den Anteil dieser roten Blutkörperchen am Gesamtblutvolumen (Reuter, 2007).

Hämoglobin (Hb) ist der in den Erythrozyten enthaltene Blutfarbstoff, es handelt sich hierbei um ein kugelförmiges Molekül. Dieses transportiert Sauerstoff von der Lunge zum Gewebe sowie Kohlendioxid zurück vom Gewebe zur Lunge (Reuter, 2007). Im Rahmen einer malignen Erkrankung kann es zu einer sogenannten Tumoranämie, d. h. erniedrigtem Hb-Wert, im Rahmen der Erkrankung kommen. Dies wird bedingt durch die hemmende Wirkung einzelner Entzündungsmediatoren (Fisch, 2009).

Da eine Tumoranämie mit einer schlechteren Prognose einhergeht, bietet dies auch einen therapeutischen Ansatzpunkt. Ein Anheben des Hb-Werts und somit auch

Hämatokritwerts ist bspw. mittels Transfusion oder auch medikamentös (Erythropoetin) möglich (Bohlius et al., 2006).

1.6 Ziel der Arbeit und Vorgehensweise

Für das zervikale CUP-Syndrom wurde bis dato an kleinen Kollektiven eine HPV-Assoziation als wichtiger Prognosefaktor beschrieben, bisher galt lediglich die N-Kategorie als führend für die Therapiewahl und Prognose der Patienten. Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand eines größeren Kollektivs den Prognosefaktor HPV bei zervikalem CUP-Syndrom zu überprüfen sowie weitere Prognose- bzw. Risikofaktoren aufzudecken. Weiterhin sollten immunhistochemische Marker für epithelial-mesenchymale Transition (EMT) untersucht werden, weil EMT-Marker bei HPV-getriebenen Oropharynxkarzinomen beschrieben sind und sich hier unter Umständen Ansätze für eine zielgerichtete Therapie ergeben.

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Unterscheidet sich die HPV-Prävalenz bei CUP von der HPV-Prävalenz bekannter Primärtumoren? Gibt es einen Unterschied zwischen der HPV-Prävalenz in unserem Kollektiv im Vergleich zur publizierten HPV-Prävalenz anderer Kollektive?
2. Wie verhält sich die β -Catenin-Lokalisation bei HPV-positiven im Vergleich zu HPV-negativen Fällen?
3. Inwiefern beeinflusst eine HPV-Infektion die Prognose bei CUP?
4. Ist die β -Catenin-Lokalisation von prognostischer Bedeutung?
5. Lassen sich weitere statistisch signifikante Prognose- bzw. Risikofaktoren und damit verbunden therapeutische Konsequenzen für CUP bzw. insbesondere für HPV-negative CUP-Fälle ableiten? Können bspw. Laborwerte zum Zeitpunkt der Diagnose als prognostische Faktoren herangezogen werden?

Es wurde folgende methodische Vorgehensweise festgelegt:

1. Es wurde auf Basis einer IBM-SPSS-Datei des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS) ein Kollektiv von Patienten erstellt, die im Zeitraum zwischen Januar 2000 und Dezember 2010 die Diagnose CUP erhielten und in dieser Zeit in der Gießener Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde behandelt wurden. Patienten, bei denen im Nachhinein ein Primärtumor lokalisiert werden konnte, wurden nachträglich ausgeschlossen. Die Anzahl der verbliebenen, „echten“ CUP-Fälle, betrug 82.
2. Es folgte die retrospektive Auswertung der stationären sowie ambulanten Patientenakten des gesamten Kollektivs. Unter anderem wurden Laborparameter zum Diagnosezeitpunkt, durchgeführte Therapie sowie Konsum von Alkohol und/oder Nikotin extrahiert. Ebenso wurden die histopathologischen Befunde erfasst und ausgewertet. Die IBM-SPSS-Datei des GTDS wurde auf Fehler überprüft und im Anschluss erfolgte das Hinzufügen aller erfassten Daten zur Datei.
3. Bei 68 Patienten konnte mittels Untersuchung der formalinfixierten paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeproben ein HPV-Status erstellt werden. Dies geschah mittels Nachweis von HPV-DNA. Eine HPV-Assoziation wurde definiert als positives Ergebnis der PCR in Verbindung mit Immunreaktivität gegen das zelluläre p16^{INK4a}-Protein.
4. An einem Vorversuchskollektiv wurden immunhistochemische (IHC)-Färbungen durchgeführt, um eine geeignete Methode für das Anfärben von β -Catenin zu finden. Dieses Kollektiv bestand aus insgesamt 21 Metastasen, die dem Studienkollektiv entstammen.
5. Die Vorversuche wurden ausgewertet und es fand eine IHC-Färbung zur Darstellung von β -Catenin für das gesamte Studienkollektiv statt. Im Anschluss wurde die Lokalisation des β -Catenins in der Zelle per Lichtmikroskop bestimmt. Stichprobenartig wurde das Ergebnis mittels β -Catenin-Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

6. Abschließend wurden mittels Überlebensanalyse Prognoseparameter bei CUP in Abhängigkeit von HPV-Infektion und β -Catenin-Lokalisation analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Gewebematerial und Daten von 82 Patienten/innen, bei denen CUP diagnostiziert und die im Zeitraum von Januar 2000 bis Dezember 2010 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Gießen behandelt wurden.

2.1.1 Datenerfassung

Zunächst wurden die stationären sowie die ambulanten Patientenakten des gesamten Kollektivs retrospektiv ausgewertet. Ebenso wurde mit den histopathologischen Befunden verfahren. Alle so gewonnenen Daten wurden zu einer bereits bestehenden IBM-SPSS-Datei des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS) hinzugefügt, die vorher auf Fehler kontrolliert und der Fragestellung entsprechend überarbeitet wurde. Nach Vervollständigung folgte die deskriptive Auswertung dieser Daten.

2.1.2 Datenmaterial

Das aus den stationären sowie ambulanten Patientenakten gewonnene Datenmaterial enthält Informationen zu Folgendem:

- Biometrische Merkmale: Geschlecht, Alter, Alkohol-/Nikotinabusus, Body-Mass-Index (BMI), Komorbidität
- Laborparameter zum Diagnosezeitpunkt: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Quick, INR, PTT, Na⁺, K⁺, CRP
- Tumordiagnose: Diagnosedatum, histopathologischer Befund, Grading, N-Kategorie, weitere Metastasen
- Therapie: Therapiebeginn, Art und ggf. Dosierung der Therapie (Operationen, Radiatio, Chemotherapie)

Folgende Informationen stammen aus dem GTDS:

- Prognose: Lebend/Verstorben-Status, Rezidiv

2.1.3 Biometrische Merkmale

Das Patientenkollektiv (n=82) teilt sich auf in 14 (17,1 %) weibliche Patienten und 68 (82,9 %) männliche Patienten.

Der jüngste Patient war zum Diagnosezeitpunkt 32 Jahre und der älteste 95 Jahre alt. Damit ergibt sich eine Spannweite von 63 Jahren. Das mittlere Alter bei Diagnose betrug 62 Jahre. Abbildung 6 zeigt die Verteilung der Altersgruppen.

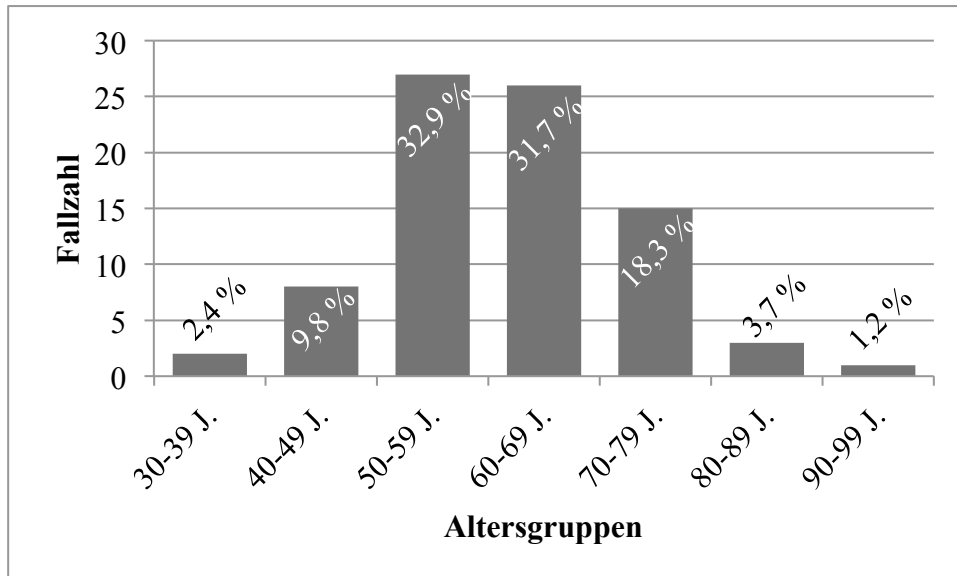


Abb. 6: Altersverteilung innerhalb des Patientenkollektivs.

Aufteilung in Altersdekaden: 30–39 Jahre: 2 Pat. (2,4 %), 40–49 Jahre: 8 Pat. (9,8 %), 50–59 Jahre: 27 Pat. (32,9 %), 60–69 Jahre: 26 Pat. (31,7 %), 70–79 Jahre: 15 Pat. (18,3 %), 80–89 Jahre: 3 Pat. (3,7 %), 90–99 Jahre: 1 Pat. (1,2 %).

In der folgenden Tabelle 6 sind die Parameter Body-Mass-Index (BMI), Komorbidität zum Diagnosezeitpunkt sowie Nikotin- und Alkoholabusus aufgeführt. Zur Quantifizierung der Komorbidität wurde der Performance-Status der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) verwendet, der von 0 (keine körperlichen Einschränkungen) bis 4 (bettlägerig) reicht.

Tab. 6: BMI, ECOG, Nikotinkonsum, Alkoholabusus (n=82).

Parameter		n=82	%
BMI	< 18,5	2	2,4
	18,5–24,9	30	36,6
	25–29,9	31	37,8
	≥ 30	18	22
	keine Angabe	1	1,2
ECOG	0	5	6,1
	1	50	61
	2	23	28
	3	2	2,4
	4	2	2,4
Nikotinkonsum innerhalb der vergangenen 15 Jahren?	ja	30	36,6
	nein	52	63,4
Alkoholabusus innerhalb der vergangenen 15 Jahre?	ja	50	61
	nein	32	39

2.1.4 Diagnosestellung

Die Erstdiagnose CUP erfolgte im Zeitraum zwischen dem 01.01.2000 und dem 31.12.2010, sprich in einem Zeitraum von 11 Jahren. Die Nachbeobachtungszeit nach Diagnosestellung, die für die statistische Auswertung der in Hinblick auf das Überleben der Patienten untersuchten Parameter verwendet wurde, betrug 5 Jahre. Bei einem längeren Beobachtungszeitraum wurde der Überlebensstatus des Patienten nach 5 Jahren in „noch lebend“ geändert, da ein Einfluss der natürlichen Sterberate auf das Ergebnis verhindert werden sollte.

Patienten, bei denen während des Nachbeobachtungszeitraums noch ein Primärtumor gefunden werden konnte, wurden aus dem Kollektiv als „unechte“ CUP-Fälle ausgeschlossen, sodass bei allen verbliebenen Patienten des Kollektivs der Primärtumor zu keinem Zeitpunkt gefunden wurde.

In Abbildung 7 erfolgt eine Einteilung nach N-Kategorie zum Zeitpunkt der Diagnose. Hierfür standen die Daten von 80 Patienten (n=80) zur Verfügung. Am häufigsten war mit 32 Fällen (40 %) der Status N2b. Nur 9 Patienten (11,3 %) hatten zum Diagnosezeitpunkt einen N1-Status.

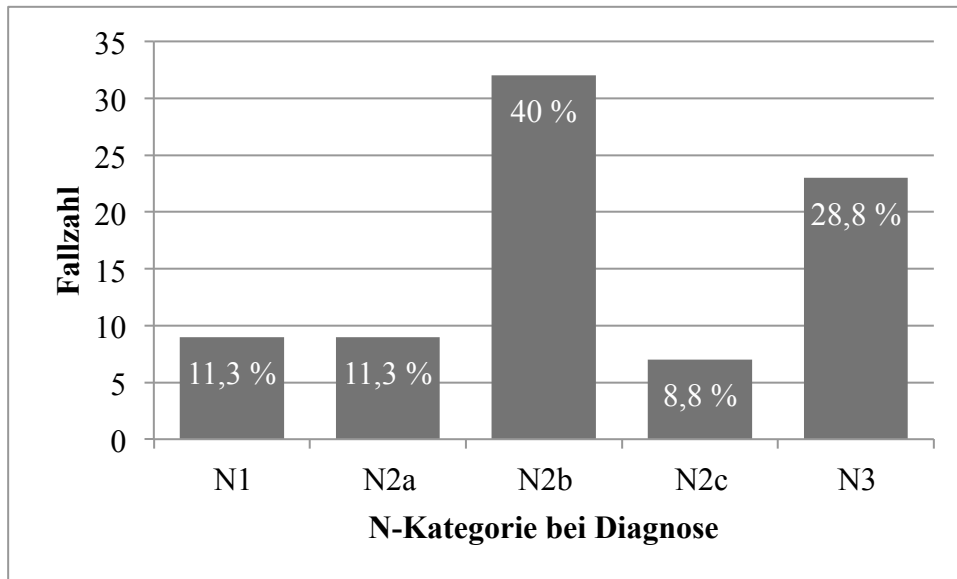


Abb. 7: N-Kategorie bei Diagnose:

N1: 9 Pat. (11,3 %), N2a: 9 Pat. (11,3 %), N2b: 32 Pat. (40 %), N2c: 7 Pat. (8,8 %), N3: 23 Pat. (28,8 %).

Mithilfe von bildgebenden Verfahren und der Untersuchung des bei Operationen entnommenen Gewebes konnte die Zahl der metastasierten Lymphknoten bei 65 Patienten bestimmt werden. Bei einem kleinen Teil dieser Patienten (5 Patienten, 7,7 %) waren 10 oder mehr Lymphknoten (LK) betroffen. Bei 60 Patienten (92,3 %) waren dementsprechend weniger als 10 Lymphknoten betroffen.

Bei 12 Patienten (14,6 %) waren weitere Körperregionen von Metastasen betroffen. Die Metastasen fanden sich hier zusätzlich zu den zervikalen Metastasen in Lunge, Knochen oder Leber.

Die Einteilung der histopathologischen Diagnosen erfolgte in Plattenepithel-, Adeno- sowie undifferenziertes Karzinom. Eine weitere Gruppe „Sonstige“ (9 Patienten, 11 % aller Diagnosen) beinhaltet epitheliale Neoplasien ohne nähere Angabe, neuroendokrines Karzinom und Metastasen, die auf ein malignes Melanom hindeuten. Bei der Mehrheit der Diagnosen handelte es sich um Plattenepithelkarzinome (69 Patienten, 84,1 %), Adeno- und undifferenzierte Karzinome betragen jeweils 2,4 % (je 2 Patienten) aller Diagnosen.

Eine Übersicht über die Laborparameter und ihre Verteilung bzgl. Normbereichen bietet Tabelle 7. Hier sind folgende Laborparameter aufgeführt: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Quick, INR, PTT, Na⁺, K⁺, CRP. Die

2. Material und Methoden

Normwerte richten sich nach den vom Bund Deutscher Internisten (BDI) veröffentlichten Normwerte.

Tab. 7: Laborparameter.

	Parameter	n=82	%
Leukozyten (/μl)	< 3.800 = erniedrigt	2	2,4
	3.000–10.500 = normal	58	74,4
	> 10.500 = erhöht	18	22
	kein Wert vorhanden	4	4,9
Erythrozyten (Mio./μl)	< 3,9 bei ♀ und < 4,3 bei ♂ = erniedrigt	17	20,7
	3,9 bzw. 4,3 - 5,3 bzw. 5,7 = normal	60	73,2
	> 5,3 bei ♀ bzw. > 5,7 bei ♂ = erhöht	1	1,2
	kein Wert vorhanden	4	4,9
Hämoglobin (g/dl)	< 12 bei ♀ und < 13,5 bei ♂ = erniedrigt	22	26,8
	12 bzw. 13,5 - 16 bzw. 17 = normal	53	64,6
	> 16 bei ♀ und > 17 bei ♂ = erhöht	3	3,7
	kein Wert vorhanden	4	4,9
Hämatokrit (%)	< 37 bei ♀ und < 40 bei ♂ = erniedrigt	19	23,2
	37 bzw. 40 - 48 bzw. 52 = normal	58	70,7
	> 48 bei ♀ und > 52 bei ♂ = erhöht	1	1,2
	kein Wert vorhanden	4	4,9
Thrombozyten (/μl)	< 140.000 = erniedrigt	5	6,1
	140.000-345.000 = normal	59	72
	> 345.000 = erhöht	13	15,9
	kein Wert vorhanden	5	6,1
Quick	< 70 = erniedrigt	1	1,2
	70 - 120 = normal	66	80,5
	> 120 = erhöht	11	13,4
	kein Wert vorhanden	4	4,9
INR	< 0,85 = erniedrigt	7	8,5
	0,85 - 1,15 = normal	70	85,4
	> 1,15 = erhöht	1	1,2
	kein Wert vorhanden	4	4,9
PTT (Sekunden)	< 26 = erniedrigt	3	3,7
	26 - 36 = normal	69	84,1
	> 36 = erhöht	6	7,3
	kein Wert vorhanden	4	4,9
Na ⁺ (mmol/l)	< 135 = erniedrigt	5	6,1
	135 - 145 = normal	66	80,5
	> 145 = erhöht	7	8,5
	kein Wert vorhanden	4	4,9
K ⁺ (mmol/l)	< 3,6 = erniedrigt	5	6,1
	3,6 - 5 = normal	71	86,6
	> 5 = erhöht	2	2,4
	kein Wert vorhanden	4	4,9
CRP (mg/l)	≤ 5 = normal	30	36,6
	> 5 = erhöht	43	52,4
	kein Wert vorhanden	9	11

2.1.5 Therapie

Zu den angewandten Therapieverfahren gehören Neck Dissection, Radiatio sowie Chemotherapie. Die Häufigkeitsverteilungen der Therapieverfahren sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Häufigkeitsverteilung von Therapieverfahren (n=82).

Parameter		n=82	%
Neck Dissection	ja	58	70,7
	nein	24	29,3
Radiatio	ja	68	82,9
	nein	14	17,1
Chemotherapie	ja	28	34,1
	nein	65,9	65,9

68 Patienten (82,9 %) erhielten eine Bestrahlungstherapie, bei einem Teil der Patienten erfolgte diese Therapie nicht in der Universitätsklinik Gießen und eine Aussage bzgl. der genauen Strahlendosis in Gray (Gy) kann dementsprechend teilweise nicht getroffen werden. Bei 58 der 68 bestrahlten Patienten (85,3 %) ist dies aber möglich, sodass man von 10 Patienten (14,7 %) sagen kann, dass sie eine Bestrahlungsdosis von 50 Gy oder weniger erhielten, und von 48 Patienten (70,6 %) weiß, dass ihre Bestrahlungsdosis über 50 Gy betrug.

2.1.6 Prognosen

Durch die retrospektive Auswertung des Datenmaterials, das unter 2.1.1 aufgeführt ist, konnten die beiden folgenden Prognoseparameter gewonnen werden: Lebend-/Verstorben-Status und Auftreten von Rezidiven.

Während eines Zeitraums von 5 Jahren nach Diagnosestellung sind 38 Patienten (46,3 %) verstorben, lebend sind 5 Jahre nach der Diagnose noch 43 Patienten (52,4 %). 1 Patient (1,2 %) hat im Beobachtungszeitraum den Kontakt abgebrochen.

Tabelle 9 geht auf den zweiten Prognoseparameter, das Rezidivvorkommen, ein. Unterschieden wird dabei auch nach Lokalisation des Rezidivs zwischen Lokal- und Fernrezidiv. Von 13 Patienten, die ein Rezidiv erlitten, lebt 5 Jahre nach

Diagnosestellung noch 1 Patient (7,7 %).

Tab. 9: Prognoseparameter Rezidiv.

Prognoseparameter Rezidiv		n=82	%
Rezidiv	ja	13	14,6
	nein	69	77,5
	keine Angaben	7	7,9
Lokalisation Rezidiv		n=13	%
Lokal- oder	Lokalrezidiv	10	76,9
Fernrezidiv?	Fernrezidiv	3	23,1

2.1.7 FFPE-Gewebeproben

Die bei Operationen entnommenen Gewebeproben wurden direkt im Anschluss an die Entnahme im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Gießen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Unter Zuhilfenahme der histopathologischen Berichte der jeweiligen Patienten konnten diese Paraffinblöcke, die zuvor von den Pathologen vor Ort auf das Vorhandensein maligner Zellen überprüft worden waren, aus den Archiven des Universitätsklinikums Gießen entnommen werden. Da nicht alle Patienten, die im Laufe ihrer Erkrankung im Universitätsklinikum Gießen behandelt wurden, auch in Gießen operiert und initial diagnostiziert wurden, standen aus dem gesamten Patientenkollektiv von 82 Patienten letztendlich 68 Gewebeproben für den experimentellen Teil der Studie zur Verfügung.

2.2 Gewebeschnitte

Die für die immunhistochemischen Untersuchungen erforderlichen Schnitte wurden mithilfe eines Leica-Schlittenmikrotoms (Modell SM2010R[®]) manuell gefertigt. Die Dicke der Schnitte, die auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen wurden, betrug dabei 2,5 µm. Im Anschluss wurden die so angefertigten Schnitte 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Die Dicke der zum Nachweis von HPV-DNA hergestellten Schnitte betrug 10 µm. Diese Schnitte wurden in LoBind[®] Tubes der Firma Eppendorf überführt, um sie im Anschluss für die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) verwenden zu können.

2.2.1 HPV-Nachweis

Zusätzlich zum reinen Nachweis von HPV-DNA wird, um den Nachweis einer HPV-Beteiligung an der Karzinogenese zu erbringen, nicht nur eine PCR zur HPV-Genotypisierung durchgeführt, sondern auch eine p16^{INK4a}-Immunhistochemie (IHC) angewandt. Der Nachweis sowohl von HPV-DNA als auch von p16-Immunreaktivität dient hierbei als Beweis für eine aktive HPV-Infektion. Eine p16-Überexpression kann in einzelnen Fällen auch bei HPV-negativen Karzinomen auftreten, deshalb kann die p16-IHC eine PCR nicht ersetzen. Die Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte am Institut für angewandte Tumorbiologie der Universität Heidelberg an 68 Gewebeschnitten der CUP-Patienten aus unserem Kollektiv.

Als HPV-Status-positiv wurden solche Proben definiert, die sowohl HPV-DNA-positiv als auch p16-positiv (HPV+/p16+) getestet wurden.

2.2.2 DNA-Extraktion

Die HPV-DNA Bestimmung aller zur Verfügung stehenden Gewebeproben (n=68) wurde am Institut für angewandte Tumorbiologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Um die hier gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde stichprobenartig bei 12 Gewebeproben ebenfalls eine DNA-Extraktion mit anschließender PCR durchgeführt. Um die PCR durchführen zu können, muss zunächst die Isolierung der DNA erfolgen. Sinn der DNA-Extraktion ist es, die DNA von anderen Zellbestandteilen wie Proteinen oder Kleinmolekülen zu trennen. Bei der Isolierung der DNA kommt es zum Aufschluss der Zellen und Ausfällung der DNA in unpolare Umgebung. Hierfür kam das Puregene Tissue Core Kit A (QIAGEN) zur Verwendung. Die Extraktion der DNA erfolgte in drei Schritten. Für die Entparaffinierung, dem ersten Schritt, wurden die sich in den Tubes befindenden Paraffin-Schnitte zweimal für 10 Minuten bei 65°C in einen Heizblock gegeben und zwischenzeitlich kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurden 500 µl Xylol hinzugegeben, gevortext, 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Ablauf wurde dreimal wiederholt. Es folgte das Hinzugeben von 500 µl 100-prozentigem Ethanol (EtOH), Vortexen, Zentrifugieren für 2 Minuten bei 13000 rpm und Abnehmen des Überstands. Dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt und die Proben im Anschluss für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Für den zweiten Schritt, den Proteinase-K-Verdau, wurden 155 µl Cell

Lysis Solution/Proteinase-K-Lösung (150 µl Cell Lysis Solution + 5 µl Puregene Proteinase K (QIAGEN) 20 mg/ml) hinzugegeben und die Tubes anschließend gevortext und anzentrifugiert. Die Tubes verblieben bei 50°C für 3 Stunden im Schüttler (PMR-30, Grant), es wurden je 10 µl RNase A Solution (QIAGEN) hinzugegeben und es folgten weitere 10 Minuten bei 25°C im Schüttler sowie 5 Minuten Zentrifugieren bei 13000 rpm. Im Anschluss wurden die Tubes über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Der Schritt der eigentlichen Extraktion wurde eingeleitet, indem je 100 µl-Probe 80 µl doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) und 25 µl 3M K⁺-Acetat hinzugefügt und dann bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abpipettiert und 200 µl Phenol-Chloroform hinzugefügt. Das Tube wurde geschüttelt und 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Es folgte das Abpipettieren des Überstandes und Hinzufügen von 200 µl Chloroform IAA mit anschließendem Schütteln des Tubes, Zentrifugieren bei 13000 rpm und erneutem Abpipettieren des Überstands. Danach wurde das ca. 0,8-fache des verbliebenen Volumens an Isopropanol hinzugegeben, die Tubes geschüttelt, 20 Minuten bei Raumtemperatur und 20 Minuten bei -20°C gelagert sowie 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, 200 µl 75-prozentiges EtOH hinzugefügt, die Tubes in der Hand geschüttelt und 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut abgenommen wurde, erfolgte das Zentrifugieren der Tubes bei 13000 rpm für 1 Minute und nach Abnahme eventuell vorhandener EtOH-Reste der Verbleib im Heizblock bei 37°C für 10 Minuten mit offenem Deckel. Zuletzt wurden 50 µl ddH₂O hinzugegeben, die Tubes gevortext, anzentrifugiert und über Nacht bei ca. 4°C gekühlt gelagert. Bei der sich nun in den Tubes befindenden Lösung handelte es sich um die für die PCR benötigte DNA-Probe.

2.2.3 PCR

Das Prinzip einer jeden PCR ist die exponentielle Amplifikation von DNA in vitro. Dies geschieht unter Zuhilfenahme des Enzyms DNA-Polymerase. Möglich ist so die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit einer Länge von i. d. R. bis zu ca. 3000 Basenpaaren (bp). Die sich in dicht abschließenden Reaktionsgefäßen befindenden DNA-Proben werden in einen Thermocycler, der die jeweils richtige Umgebungstemperatur für die einzelnen Schritte der PCR erzeugt, gegeben. Der zu vervielfältigende Abschnitt der DNA wird Template genannt. Primer, die den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen, begrenzen dieses Template. Diese Primer sind

2. Material und Methoden

auf Kenntnis der Basensequenzfolge des gesuchten Genoms hergestellte Oligonukleotide. In einem ersten Schritt, der Denaturierung, werden die beiden DNA-Stränge voneinander durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen mittels Temperaturanstieg voneinander getrennt. Es folgt unter Temperaturemniedrigung die Anlagerung der Primer, das Annealing. Anschließend findet die Elongation bzw. Extension statt, während derer der entsprechende Abschnitt dann mittels hitzestabiler DNA-Polymerase und Nukleotiden repliziert wird. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach, sodass eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten Templates möglich ist (Saiki et al., 1988).

Für die PCR wurde zunächst ein Mastermix mit folgenden Konzentrationen erstellt (Tabelle 10):

Tab. 10: Mastermix.

Substrat	Menge
5x Puffer	3 µl
dNTPs	0,3 µl
Primer (GP5/6)	0,6 µl
Phusion Polymerase	0,15 µl
ddH ₂ O	6 µl
10,05 µl/PCR-Tube + je 5 µl DNA-Probe	

In die einzelnen PCR-Tubes wurden dann je 10,05 µl Mastermix und 5 µl DNA-Probe gegeben. Es wurde folgendes PCR-Programm im Thermocycler (C1000TM, BIO-RAD) genutzt (Tabelle 11):

Tab. 11: PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1x Initiale Denaturierung	98°C	45 Sekunden
40x Denaturierung	98°C	12 Sekunden
+ Annealing	45°C	40 Sekunden
+ Extension	72°C	15 Sekunden
1x Finale Extension	72°C	4 Sekunden
		ca. 1,5 Stunden

Nach einer initialen Denaturierung folgten aufeinanderfolgend je vierzigmal Denaturierung, Annealing und Extension sowie eine finale Extension (Abbildung 8). Nach Gießen des DNA-Gels (10 % Polyacrylamid, PAA) folgte der Gellauf mit je 2 µl 6x DNA Load + 12µl DNA-Probe.

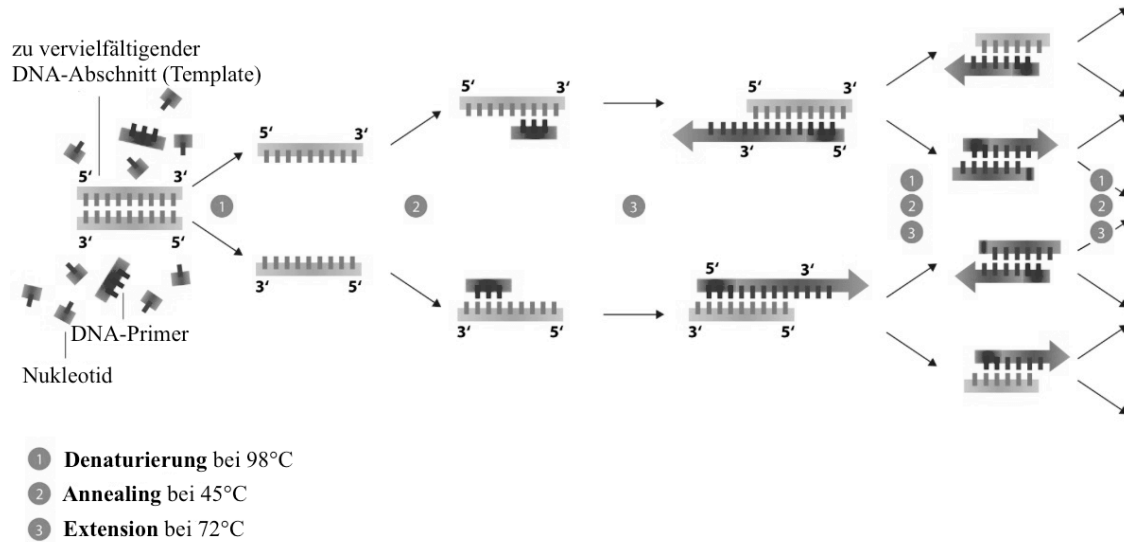


Abb. 8: PCR.

Vervielfältigung einer bestimmten Gen-Sequenz (Template) durch temperaturabhängige Anlagerung von Primern und Nukleotiden.
(modifiziert nach Enzoklop, 2014)

2.2.4 Multiplex-PCR

Bei der Multiplex-PCR, die in der Universität Heidelberg durchgeführt wurde, handelt es sich um eine analytische PCR. Mit einer einfachen PCR kann z. B. ein Virus wie HPV detektiert werden. Möchte man mehr als einen Genomabschnitt identifizieren, um wie im hier vorliegenden Fall z. B. HPV-Genotypen unterscheiden zu können, kommt eine Multiplex-PCR zur Anwendung.

Bei der Multiplex-PCR werden parallel bis zu einhundert verschiedene Templates in einer Probe amplifiziert. Bei der Identifizierung von HPV-DNA kommen Primer (GP5+/bio6+) zum Einsatz, die nicht spezifisch für einen HPV-Typen sind. So kann eine Quantifizierung mehrerer Genotypen erfolgen, denn auch wenn die Startsequenz der einzelnen Genotypen nicht spezifisch ist, so sind es die dieser Sequenz folgenden Regionen doch. Sichtbar gemacht wird diese Quantifizierung mittels sogenannter Beads (Polystyrol-Kügelchen). Diese binden spezifisch an die amplifizierten HPV-Genotypen spezifischen DNA-Sequenzen. Die verschiedenen Beads sind dabei mit

unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass auch die einzelnen HPV-Genotypen über die Beads letztendlich unterschiedlich markiert sind. Sichtbar gemacht wird diese Markierung mittels Luminex-Analyse. Hierbei werden mittels Laser die unterschiedlichen Farbreaktionen in einer Probe erfasst und es wird eine Zuordnung der einzelnen Fluoreszenzsignale zu den HPV-Genotypen vorgenommen (Schmitt et al., 2006). Somit ist es möglich eine Aussage nicht nur über ein Vorhandensein von HPV-DNA in einer Probe zu tätigen, sondern auch eine Quantifizierung einzelner sich in dieser Probe befindenden HPV-Genotypen vorzunehmen.

2.2.5 Immunhistochemische Vorversuche

Um das ideale Verfahren zur Anfärbung des sich in den Zellen befindenden β -Catenin sowie p16 zu ermitteln, wurden im Vorfeld verschiedene Varianten der IHC-Färbung an einem Vorversuchskollektiv durchgeführt. Dieses Kollektiv bestand aus insgesamt 21 Metastasen, die dem Studienkollektiv entstammen. Es wurden nicht nur verschiedene Antikörperkonzentrationen und unterschiedliche Substrate zur Anfärbung des Antikörper-Antigen-Komplexes verwendet, sondern auch verschiedene Varianten des Target Retrieval, das als Vorbereitung der Gewebeschnitte für eine anschließende IHC-Färbung nötig ist, getestet. Zum Einsatz kamen für die p16-IHC der monoklonale Maus-Antikörper p16 (Produktnr. 554079, BD PharmingenTM) und für die β -Catenin-IHC der monoklonale Maus-Antikörper β -Catenin (Produktnr. 610153, BD PharmingenTM). Als Sekundäntikörper wurde jeweils der monoklonale Maus-Antikörper Biotin (Produktnr. B7653, SIGMA-ALDRICH[®]) verwendet. Bei den verwendeten Substraten handelt es sich um das ImmPACTTM NovaREDTM Peroxidase Substrat (Vector Laboratories) sowie das SIGMA FASTTM DAB Peroxidase Substrat (SIGMA-ALDRICH[®]). Für das Target Retrieval wurden Target Retrieval Solution (TRS) pH6 (Dako), die TRS pH9 (Dako) sowie eine Lösung aus 1-prozentigem Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat, SDS)/Tris-Buffered Saline (TBS) (SIGMA-ALDRICH[®]) bei unterschiedlichen Temperaturen verwendet. Nach Auswertung der Vorversuche wurde die Vorgehensweise für die zur Verfügung stehenden Gewebeschnitte des Studienkollektivs (n=68) festgelegt.

2.2.6 Vor- und Nachbereitung der Gewebeschnitte

Zu Beginn einer jeden IHC-Färbung erfolgt die Entparaffinierung und Rehydratation der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte. Die Entparaffinierung wurde mittels Eintauchen in eine Xylol-gefüllte Küvette für zweimal 10 Minuten vorgenommen. Es folgte die Rehydratation über eine sogenannte absteigende Reihe. Dabei wurden die Schnitte in Küvetten mit 100-, 96- und 70-prozentigem Ethanol (EtOH) getaucht. Dies geschah bei 100- und 96-prozentigem EtOH für die Dauer von jeweils zweimal 5 Minuten und bei 70-prozentigem EtOH für einmal 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte in eine Küvette mit Aqua dest. gegeben.

Nach Abschluss der IHC-Färbung sollten die Gewebeschnitte möglichst rasch dehydriert und eingedeckt werden. Hierzu durchlaufen die Objektträger zunächst die absteigende Reihe in umgekehrter Reihenfolge. Dann wird auf die Objektträger ein Tropfen Eindeckmedium Roti[®]-Histokitt (Carl Roth[®]) gegeben und ein Deckplättchen aufgelegt. Nach Abschluss der Immunfluoreszenzfärbung wurde das Eindeckmedium Roti[®]-Mount Fluor Care DAPI (Carl Roth[®]) verwendet.

2.2.7 β -Catenin-Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist der Nachweis von Proteinen durch eine Visualisierung derselben an Gewebeschnitten. Dazu werden Antikörper verwendet, die im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch an diese Proteine binden. Der verwendete Antikörper ist gekennzeichnet durch eine sehr hohe Spezifität und Affinität gegenüber seinem Zielprotein, damit es nicht zu Kreuzreaktionen mit ähnlichen Proteinen kommt. Der Antikörper bindet an das Protein, nach einem Schritt des Waschens verbleibt nur der gebundene Antikörper auf dem Gewebeschnitt. In einem zweiten Schritt wird ein weiterer Antikörper, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, hinzugegeben. Es folgt ein erneutes Waschen des Objektträgers mit Verbleib des an den ersten Antikörper gebundenen zweiten Antikörpers. Diesem wird ein Substrat (Chromogen) angeboten, das durch ein mit dem Antikörper konjugiertes Enzym umgesetzt wird. Die so beschriebene IHC-Färbung mit zwei Antikörpern wird indirekte Methode genannt. Wird nur ein Antikörper verwendet, der sowohl an das Protein bindet, als auch mit einem Farbstoff-umsetzenden Enzym konjugiert ist, handelt es sich um die direkte Methode. Dort, wo es zu einer immunchemischen

Reaktion, also einer Bindung des mit dem Enzym konjugierten Antikörpers kommt, bildet sich ein Farbstoff. Somit lässt sich eine Aussage über das Vorhandensein von einzelnen Proteinen wie z. B. β -Catenin und seiner Lokalisation in den Zellkompartimenten treffen.

Für die β -Catenin-IHC-Färbung wurden zunächst die Gewebeschnitte entparaffiniert und dann für 30 Minuten bei 96°C in eine Küvette mit TRS pH6 (Dako) gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und danach 2 Minuten mit vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) in einer Küvette gewaschen. Die hydrophobe Barriere wurde mit dem Liquid Blocker Super Pap Pen (Daido Sangyo Co.) aufgetragen und die Objektträger (OT) erst zweimal 2 Minuten mit VE-H₂O gewaschen, dann 5 Minuten mit TBS mit Tween (TBST). Es folgte für 60 Minuten ein Block mit 3-prozentigem Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA-ALDRICH®) und ein Waschen auf den OT mit TBST für 5 Minuten. Es wurden je 100 μ l monoklonaler Maus-Antikörper β -Catenin (Produktnr. 610153, BD Pharmingen™) (1:1200) in 1-prozentigem BSA aufgetragen und die OT daraufhin bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die OT zweimal 5 Minuten mit TBST in einer Küvette gewaschen und anschließend je 100 μ l monoklonaler Maus-Antikörper Biotin (Produktnr. B7653, SIGMA-ALDRICH®) (1:180) in TBST aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Schnitte erst zweimal 5 Minuten mit TBST auf den OT, dann 5 Minuten mit TBST in einer Küvette gewaschen und je 100 μ l ABC-Mix, hergestellt mittels Vectastain® ABC Kit (Peroxidase Mouse IgG PK-4002, Vector Laboratories), auf die OT aufgetragen. Dieser wurde dort für 40 Minuten bei Raumtemperatur belassen und die Schnitte im Anschluss wieder zunächst zweimal 5 Minuten mit TBST auf den OT, dann 5 Minuten mit TBST in einer Küvette gewaschen. Nun wurden je 100 μ l DAB-Substrat (SIGMA-ALDRICH®) aufgetragen und die OT für ca. 6 Minuten unter Beobachtung bei Raumtemperatur auf den Rüttler gestellt. Nach Färbung der Schnitte wurden die OT mit VE-H₂O in einer Küvette gewaschen und für 50 Sekunden in eine mit Hämalaun gefüllte Küvette gegeben. Zuletzt erfolgte das Bläuen für 15 Minuten unter laufendem H₂O, die Dehydrierung der Schnitte und das anschließende Eindecken.

Anschließend erfolgte eine Auswertung der Schnitte mithilfe eines Lichtmikroskops. Es wurde eine Einteilung der β -Catenin-Lokalisation in „nukleär“ und „nicht-nukleär“ vorgenommen, abhängig davon, wo sich das rötlich angefärbte β -Catenin in der Zelle befand.

2.2.8 p16^{INK4a}-Immunhistochemie

Die p16-IHC-Färbung fand überwiegend im Institut für angewandte Tumorbio­logie der Universität Heidelberg statt. Zur Verifizierung der hier gewonnenen Ergebnisse wurden stichprobenartig ebenfalls p16-IHC-Färbungen an 13 Gewebeschnitten (19 %) durchgeführt. Nach Entparaffinieren der Gewebeschnitte wurden die OT für 30 Minuten bei 96°C in eine Küvette mit TRS pH6 (Dako) gegeben und anschließend bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Es folgte das Waschen mit VE-H₂O in einer Küvette für dreimal 2 Minuten, bevor die OT für 20 Minuten in eine mit 3-prozentigem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gefüllte Küvette gegeben wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte für zweimal 2 Minuten mit VE-H₂O auf den OT gewaschen und für 5 Minuten in eine Küvette mit TBST gegeben. Die hydrophobe Barriere wurde aufgetragen und für 60 Minuten erfolgte ein Block mit 3-prozentigem Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA-ALDRICH®). Danach wurden die Schnitte auf den OT 1 Minute mit TBST gewaschen und der monoklonale Maus-Antikörper p16 (Produkt­nr. 554079, BD Pharmingen™) (1:300) in 1-prozentigem BSA aufgetragen. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4°C. Die folgenden Schritte von Auftragen des Antikörpers bis Auftragen des Substrats entsprechen den Schritten des β-Catenin-Protokolls (siehe S. 34). Im Anschluss an das Auftragen des DAB-Substrats und ca. 6-minütiger Beobachtungszeit folgte das Waschen des OT mit VE-H₂O für 5 Minuten und das Waschen mit VE-H₂O für weitere 5 Minuten. Für 10 Minuten wurden die OT in eine mit Hämalaun gefüllte Küvette gegeben und dann anschließend 15 Minuten unter laufendem H₂O gebläut. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Eine p16-Überexpression wurde so durch eine braune Färbung des Zytoplasmas sichtbar.

2.2.9 β -Catenin-Immunfluoreszenz

Auch bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine immunhistochemische Färbung, bei der ebenfalls ein primärer sowie ein sekundärer Antikörper zum Einsatz kommen. Zusätzlich zu der Bindung des Primärantikörpers an das Protein, z. B. β -Catenin, wird in einem zweiten Schritt ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Bei diesem Verfahren ist es der Sekundärantikörper, der – ähnlich wie die Beads beim Luminex-DNA-Nachweis – einen fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) gebunden hat. Das β -Catenin, das über Primär- und Sekundärantikörper den Farbstoff gebunden hat, kann dann unter einem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Um das Ergebnis der β -Catenin-IHC-Färbung zu kontrollieren, wurde als Abschluss der Vorversuche eine Immunfluoreszenzfärbung an 7 der 21 Gewebeschnitte des Vorversuchskollektivs durchgeführt. Hierbei erfolgte zusätzlich zur Anfärbung von β -Catenin eine Anfärbung von E-Cadherin (monoklonaler Maus-Antikörper CD324 Alexa Fluor® 488, Produktnr. 53-3249, eBioscience) und Aktin (monoklonalen Maus-Antikörper Cy3, Produktnr. C 2181, SIGMA-ALDRICH®).

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde bis zum Auftragen des monoklonaler Maus-Antikörpers Biotin wie bei der β -Catenin IHC-Färbung geschildert durchgeführt. Anstelle des monoklonalen Maus-Antikörpers Biotin wurden je ca. 150 μ l monoklonaler Maus-Antikörper Cy3 (Produktnr. C 2181, SIGMA-ALDRICH®) (1:600) in 1-prozentigem BSA aufgetragen und die Schnitte für mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Im Anschluss wurden die Schnitte auf den OT für 5 Minuten mit TBST und für zweimal 5 Minuten mit TBS gewaschen. Es folgte das Auftragen von je ca. 150 μ l monoklonalem Maus-Antikörper CD324 Alexa Fluor® 488 (Produktnr. 53-3249, eBioscience) (1:200) in 1-prozentigem BSA und ein erneutes Ruhenlassen der Schnitte für mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte auf den OT je zweimal 2 Minuten mit TBST und TBS gewaschen. Nach einem letzten Waschen in einer Küvette mit VE-H₂O wurden die Schnitte eingedeckt.

Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde anschließend überprüft, ob und wo genau eine rötliche Anfärbung des β -Catenins erfolgt war.

2.3 Statistische Methoden

Für die statistisch-analytische Berechnungen der Ergebnisse wurden die Software-Programme IBM-SPSS[®]-21 und Microsoft[®] Excel[®] für Mac 2011 verwendet.

Es wurden Berechnungen der Prognoseparameter wie z. B. Laborparameter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder Therapie in Abhängigkeit von HPV-Status und β -Catenin-Lokalisation mithilfe von Überlebensanalysen durchgeführt. Je nach Parameter wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Log-Rank-Test und Chi-Quadrat-Test ermittelt bzw. bei Kollektiven < 5 Personen mittels exaktem Test nach Fisher. Als statistisch signifikant wurden alle Ergebnisse mit einem p-Wert von unter 0,05 definiert. Das Überleben wurde mithilfe von Kaplan-Meier-Graphen visualisiert. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Kaplan-Meier-Analyse handelt es sich um eine univariate Analyse mit der abgeschätzt werden kann, wie wahrscheinlich es ist, dass im gewählten Beobachtungszeitraum ein definiertes Ereignis eintritt. Diejenigen Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraums noch lebten oder während des Beobachtungszeitraums aufgrund von mangelnden Informationen bzgl. Verbleib des Patienten oder ungenügender Kooperation seitens Patienten ausschieden, wurden zensiert. So konnte in dieser Arbeit die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in Abhängigkeit der Zeit nach Zeitpunkt der Erstdiagnose CUP berechnet werden.

Im Gegensatz zur univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier berücksichtigt das Cox-Regressions-Modell zusätzliche Störfaktoren. Somit stellt es eine multivariate Form der Analyse dar und kann nicht nur den HPV-Status und die β -Catenin-Lokalisation in seine Berechnungen einbeziehen, sondern auch weitere Einflussgrößen bestimmen. Das Konfidenzintervall (KI) (Konfidenzniveau ist 95 %) gibt dabei die Präzision der Lageschätzung der Parameter wieder. Als deskriptives Maß zum Vergleich von Überlebenszeit zwischen zwei verschiedenen Patientengruppen dient die Hazard Ratio (HR).

3. Ergebnisse

3.1 HPV-Analyse

Bei 68 Metastasen wurden sowohl HPV-DNA-Bestimmung mittels BSGP5+/6+ PCR/Multiplex HPV-Genotypisierung als auch p16^{INK4a}-IHC durchgeführt. Der HPV-Status wurde als positiv definiert, wenn HPV-DNA-Nachweis und auch p16-Nachweis (HPV+/p16+) positiv waren. Der HPV-Status wurde als negativ definiert, wenn beide Ergebnisse negativ waren (HPV-/p16-). Bei nur einem positiven Ergebnis (HPV+/p16- oder HPV-/p16+) erfolgte die Bezeichnung unbekannt (Abbildung 9).

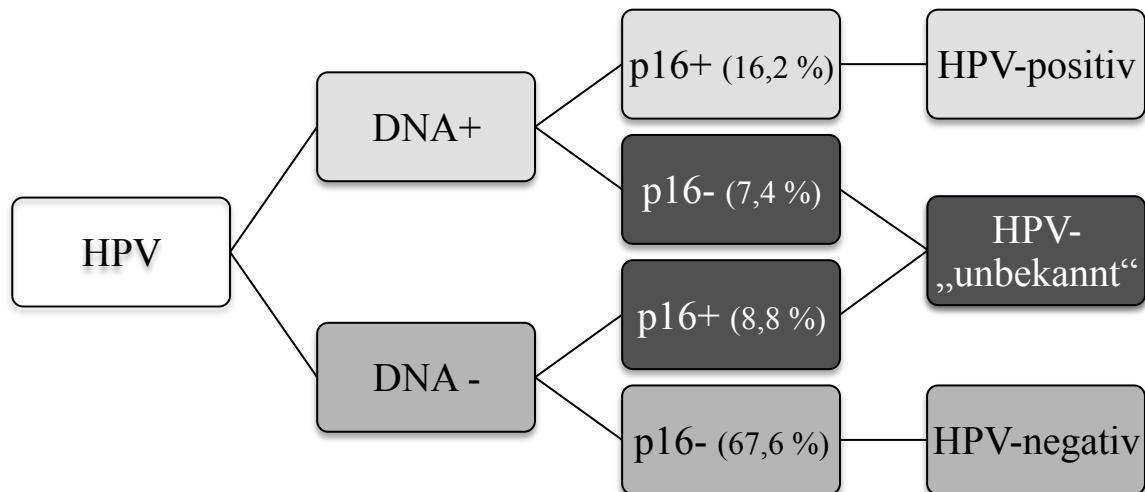


Abb. 9: HPV-Status:

HPV-DNA-positive und p16-IHC-positive Metastasen (HPV+/p16+) wurden als HPV-Status-positiv definiert. War einer der beiden Parameter negativ (HPV+/p16- oder HPV-/p16+) wurde das Ergebnis als unbekannt bezeichnet. Als negativ definiert wurde der HPV-Status bei HPV-DNA-negativen und p16-IHC-negativen Metastasen.

11 Metastasen (16,2 %) wiesen den Status HPV-positiv auf, 46 (67,6 %) waren HPV-negativ und weitere 11 Metastasen (16,2 %) HPV-unbekannt (6 HPV-/p16+ und 5 HPV+/p16-) (Abbildung 10). Bei 100 % der HPV-DNA-positiven Fälle handelte es sich um eine Infektion mit einem „high-risk“-Typen.

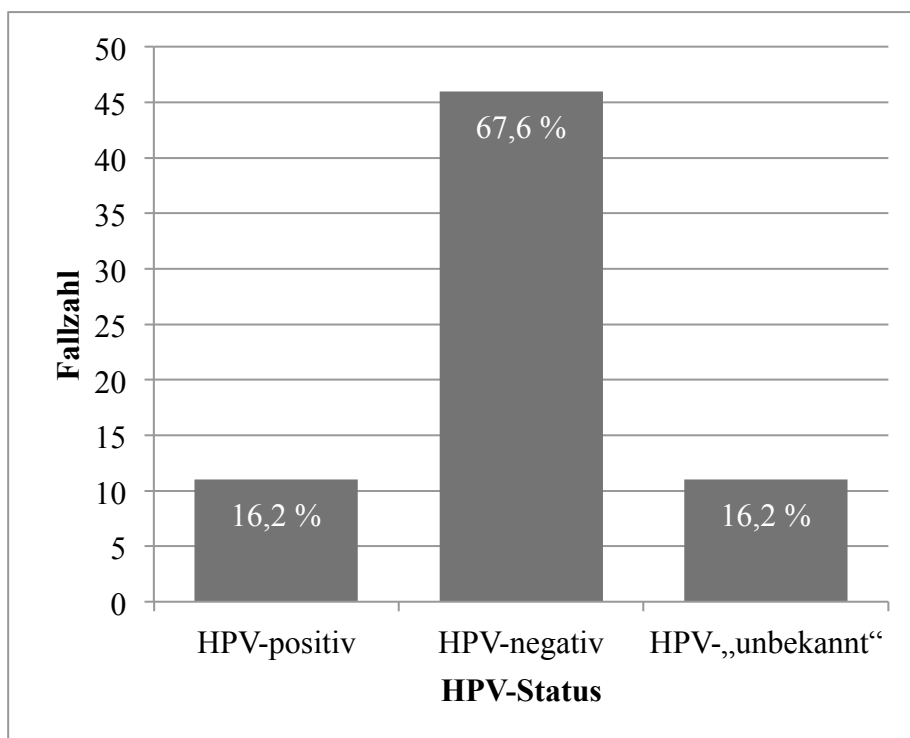


Abb. 10: Anzahl der HPV-pos./-neg./-„unbekannt“ Metastasen (n=68):

11 Metastasen waren HPV-positiv (16,2 %), 46 Metastasen (67,6 %) HPV-negativ und weitere 11 Metastasen (16,2 %) HPV-„unbekannt“.

3.2 HPV-Inzidenz

Von den 68 Patienten, deren Metastasen auf HPV-DNA untersucht wurde, erhielten 34 Patienten (50 %) ihre Diagnose im Zeitraum von 2000 bis 2005 und weitere 34 Patienten (50 %) ihre Diagnose im Zeitraum von 2006 bis 2010 (Abbildung 11). 11 der 68 Patienten (16,2 %) waren HPV-positiv. Von diesen 11 Patienten wurden 4 (36,4 %) in den Jahren 2000 bis 2005 diagnostiziert, die restlichen 7 (63,6 %) in den Jahren 2006 bis 2010. Noch auffälliger ist dieser Trend, wenn man die Anzahl der HPV-DNA-positiven Patienten betrachtet. Von 68 untersuchten Metastasen waren 16 (23,5 %) HPV-DNA-positiv. 5 (31,3 %) der HPV-DNA-positiven Patienten erkrankten zwischen 2000 und 2005, 11 Patienten (68,7 %) zwischen 2006 und 2010 (Abbildung 12). Diese Zahlen sind zwar nicht statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p = .086$), zeigen aber doch einen deutlichen Trend auf.

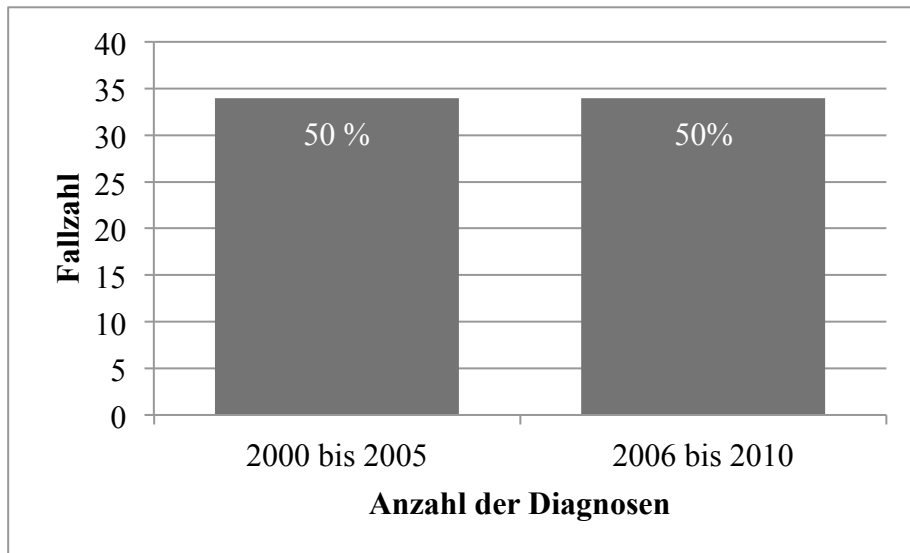


Abb. 11: Anzahl der Diagnosen (n=68):

Zwischen Januar 2000 und Dezember 2010 wurden 68 Patienten, deren Metastasen zur HPV-DNA-Bestimmung zur Verfügung standen, mit CUP diagnostiziert. 34 Patienten (50 %) wurden zwischen Januar 2000 und Dezember 2005 diagnostiziert, weitere 34 Patienten (50 %) zwischen Januar 2006 und Dezember 2010.

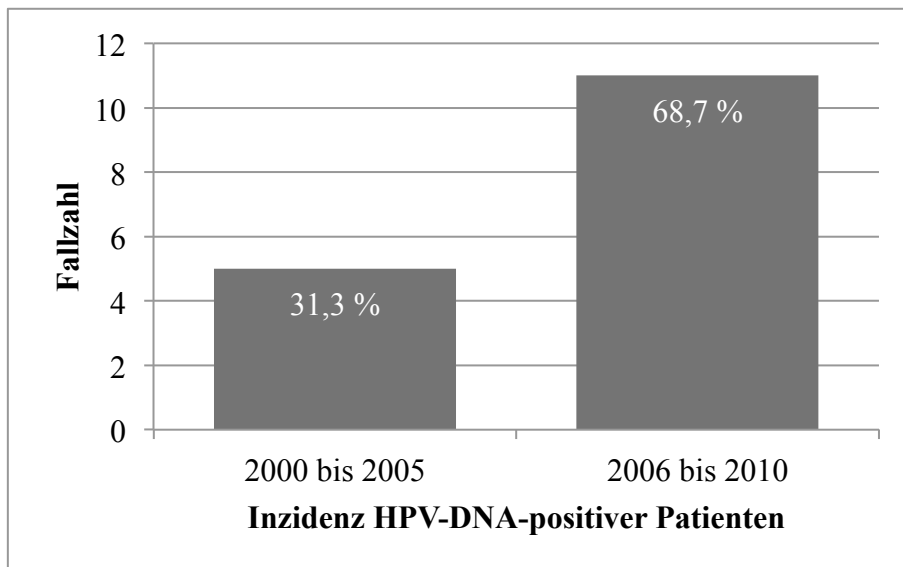


Abb. 12: Inzidenz HPV-DNA-positiver Patienten (n=16):

Von den zwischen Januar 2000 und Dezember 2010 68 mit CUP diagnostizierten Patienten waren 5 Patienten (31,3 %), der 34 zwischen Januar 2000 und Dezember 2005 diagnostizierten Patienten, HPV-DNA-positiv. 11 Patienten (68,7 %), der 34 Patienten zwischen Januar 2006 und Dezember 2010 diagnostizierten Patienten waren HPV-DNA-positiv.

3.3 Signifikant besseres Überleben bei HPV-positiven Metastasen

Mithilfe einer univariaten Überlebenszeitanalyse konnte ein signifikant besseres Überleben von Patienten mit HPV-positiven Metastasen gegenüber Patienten mit HPV-negativen oder HPV-unbekannten Metastasen festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p = .007$). Zum besseren Verständnis wird im folgenden Teil der Arbeit die Gruppe bestehend aus HPV-negativen und HPV-unbekannten Metastasen als HPV-negativ bezeichnet. Die mediane Überlebenszeit der HPV-negativen Patienten lag bei 11 Monaten (0,9 Jahren), diejenige der HPV-positiven Patienten ließ sich nicht berechnen, da keiner der 11 HPV-positiven Patienten im Beobachtungszeitraum verstarb (Abbildung 13). Dementsprechend betrug die 5-Jahres-Überlebensrate der 11 HPV-positiven Patienten 100 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate der HPV-negativen Patienten betrug unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 43 % (Tabelle 12). Diese Daten verdeutlichen das signifikant bessere Überleben der Patienten mit HPV-positivem Status gegenüber den HPV-negativen Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate im Gesamtkollektiv ($n=82$) lag unter Berücksichtigung der zensierten Fälle bei 45 % und die mittlere Überlebenszeit bei 2,9 Jahren.

Tab. 12: Einfluss des HPV-Status auf die mediane Überlebenszeit und 5-Jahres-Überlebensrate.

HPV-Status	n=68	mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres- Überlebensrate (%)	Log-Rank- Test
HPV-positiv	11	¹	100	p = .007
HPV-negativ	57	0.9 ²	43	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

² Zur Berechnung der medianen Überlebenszeit wurde hier der Beobachtungszeitraum auf 10 Jahre erweitert, da innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 5 Jahren keine 50 % der Patienten verstarben.

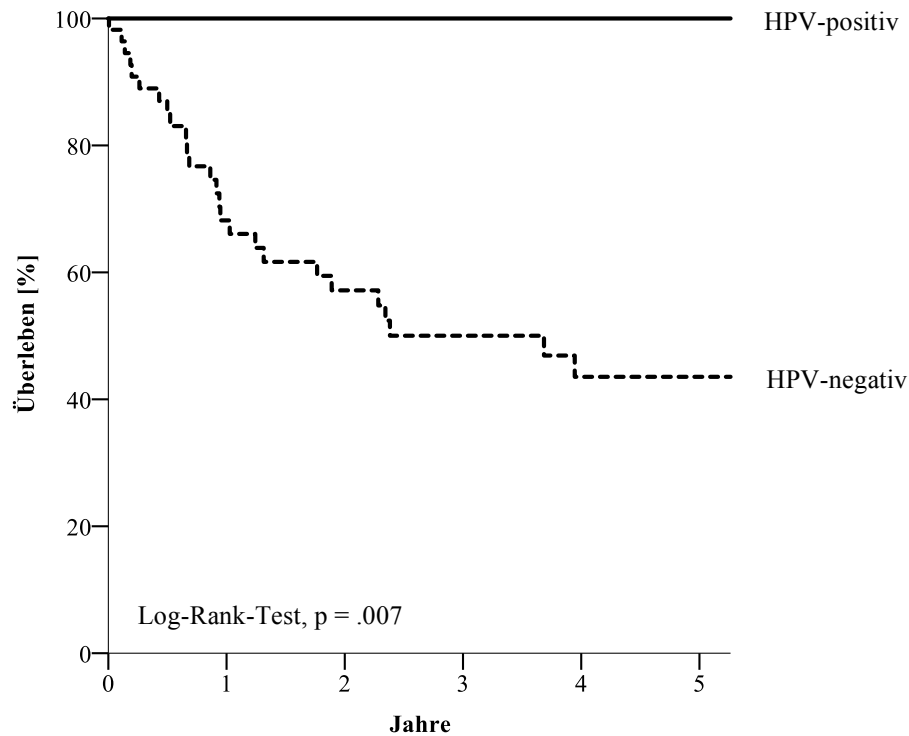


Abb. 13: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom HPV-Status (Kaplan-Meier-Graph).

Da keiner der Patienten aus der HPV-positiven Gruppe im Beobachtungszeitraum verstarb, konnte das mediane Überleben hier nicht bestimmt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei dieser Gruppe bei 100 % und beträgt bei HPV-negativen Patienten 43 %. Das mediane Überleben dieser Gruppe (HPV-negativ) beträgt 6 Jahre (Log-Rank-Test, $p = .007$).

3.4 Lokalisation des β -Catenins in den Zellkompartimenten

An die β -Catenin-IHC-Färbung anschließend wurden die Gewebeschnitte in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilt. Hierbei wurde je nach Lokalisation des β -Catenins in den Zellkompartimenten eine Einteilung vorgenommen und die Metastasen daraufhin in zwei Gruppen unterteilt. In der einen Gruppe befanden sich jene Metastasen, bei denen sich das angefärbte β -Catenin nicht im Zellkern, sondern ausschließlich zytoplasmatisch und membranär befand (β -Catenin nicht nukleär). In der anderen Gruppe konnte β -Catenin im Zellkern identifiziert werden (β -Catenin nukleär). Abbildung 14 zeigt beispielhaft je einen Vertreter der beiden Gruppen.

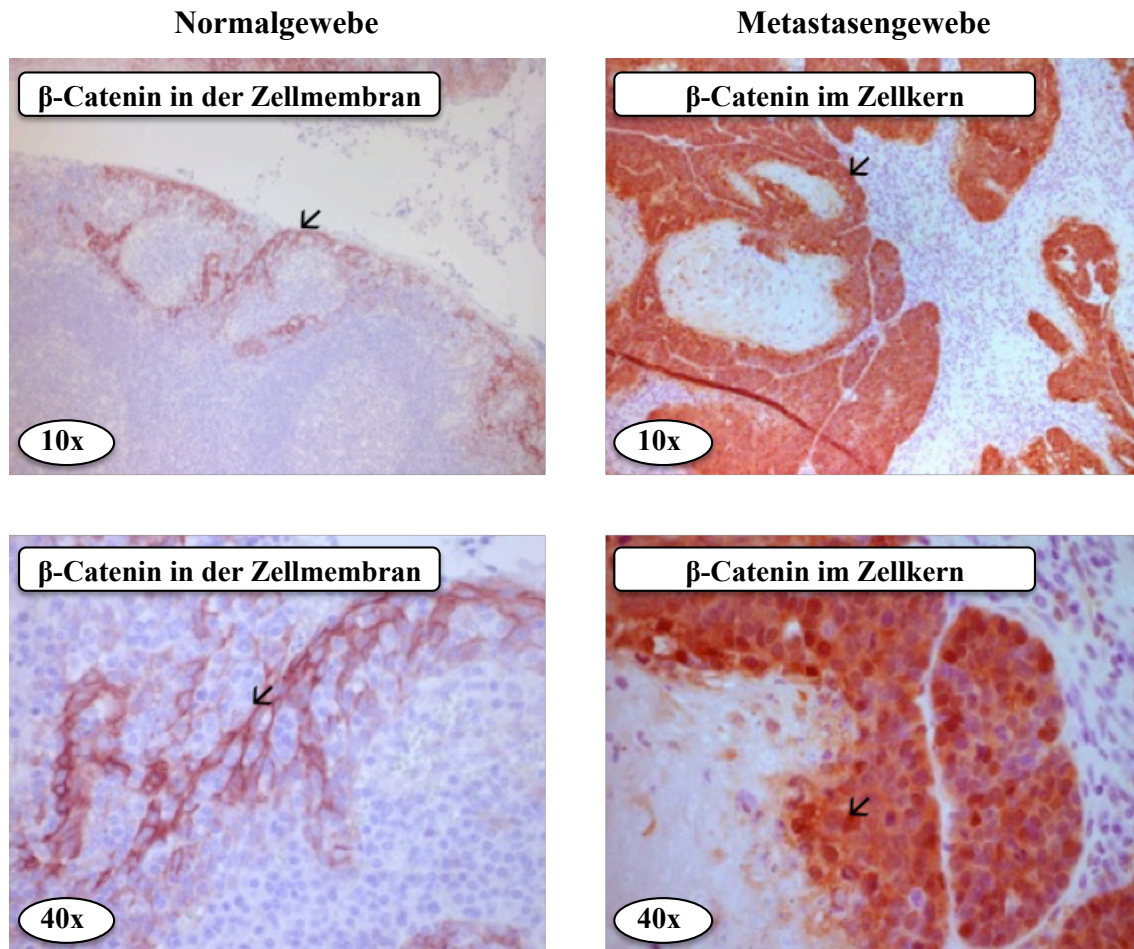


Abb. 14: Histologische Bilder der Anfärbung von β -Catenin mittels IHC.

Die histologischen Bilder zeigen exemplarisch Normalgewebe sowie Metastasengewebe mit auftretenden Lokalisationen von β -Catenin (rötlich angefärbt, Substrat: NovaRed). Ebenfalls dargestellt sind die Kerne (bläulich angefärbt mit Hämalaun).

A: Normalgewebe mit membranärer Lokalisation von β -Catenin (10x).

B: Metastasengewebe mit nukleärer Lokalisation von β -Catenin („ β -Catenin nukleär“) (10x).

C: Normalgewebe mit membranärer Lokalisation von β -Catenin (40x).

D: Metastasengewebe mit nukleärer Lokalisation von β -Catenin (40x).

Stichprobenartig wurden die so ermittelten Ergebnisse mittels Immunfluoreszenz überprüft. Hierbei wurden zusätzlich zum β -Catenin das sich in der Zellmembran befindende E-Cadherin sowie die Kerne angefärbt (Abbildung 15).

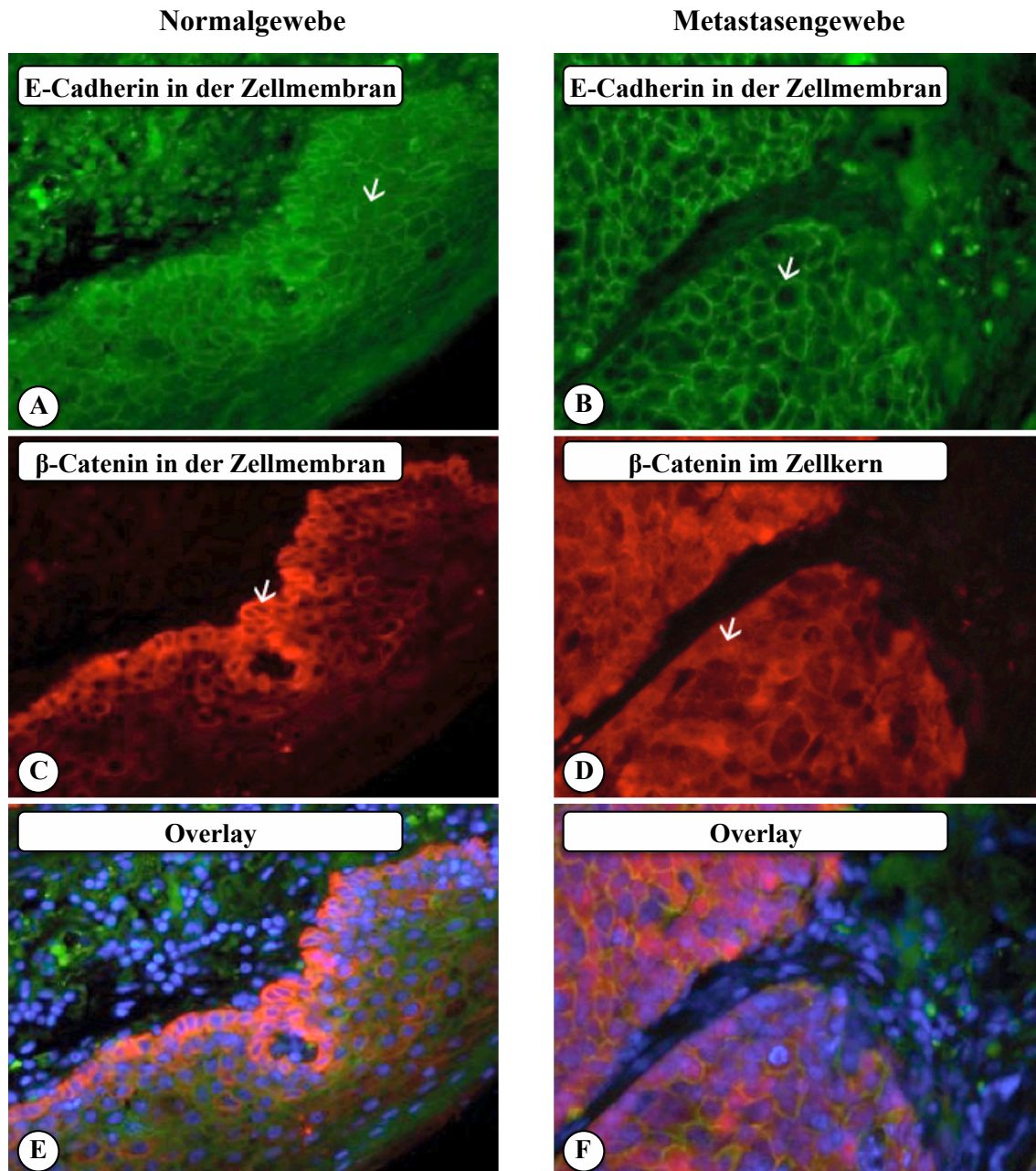


Abb. 15: Histologisches Bild β -Catenin-Immunfluoreszenzfärbung (40x).

Die histologischen Bilder zeigen exemplarisch Normalgewebe sowie Metastasengewebe. Die Zellkerne sind blau angefärbt. **A, C, E:** Normalgewebe, sich in der Zellmembran befindliches E-Cadherin ist grün gefärbt, β -Catenin mit membranärer Lokalisation rot. **B, D, F:** Metastasengewebe, ebenfalls mit grün angefärbter Zellmembran, es ist die nukleäre Lokalisation des β -Catenins zu erkennen.

Verdeutlicht werden diese Ergebnisse, wenn man eine höhere Vergrößerung (100x) betrachtet und einzelne Zellen Normalgewebes denen des Metastasengewebes gegenüberstellt (Abbildung 16).

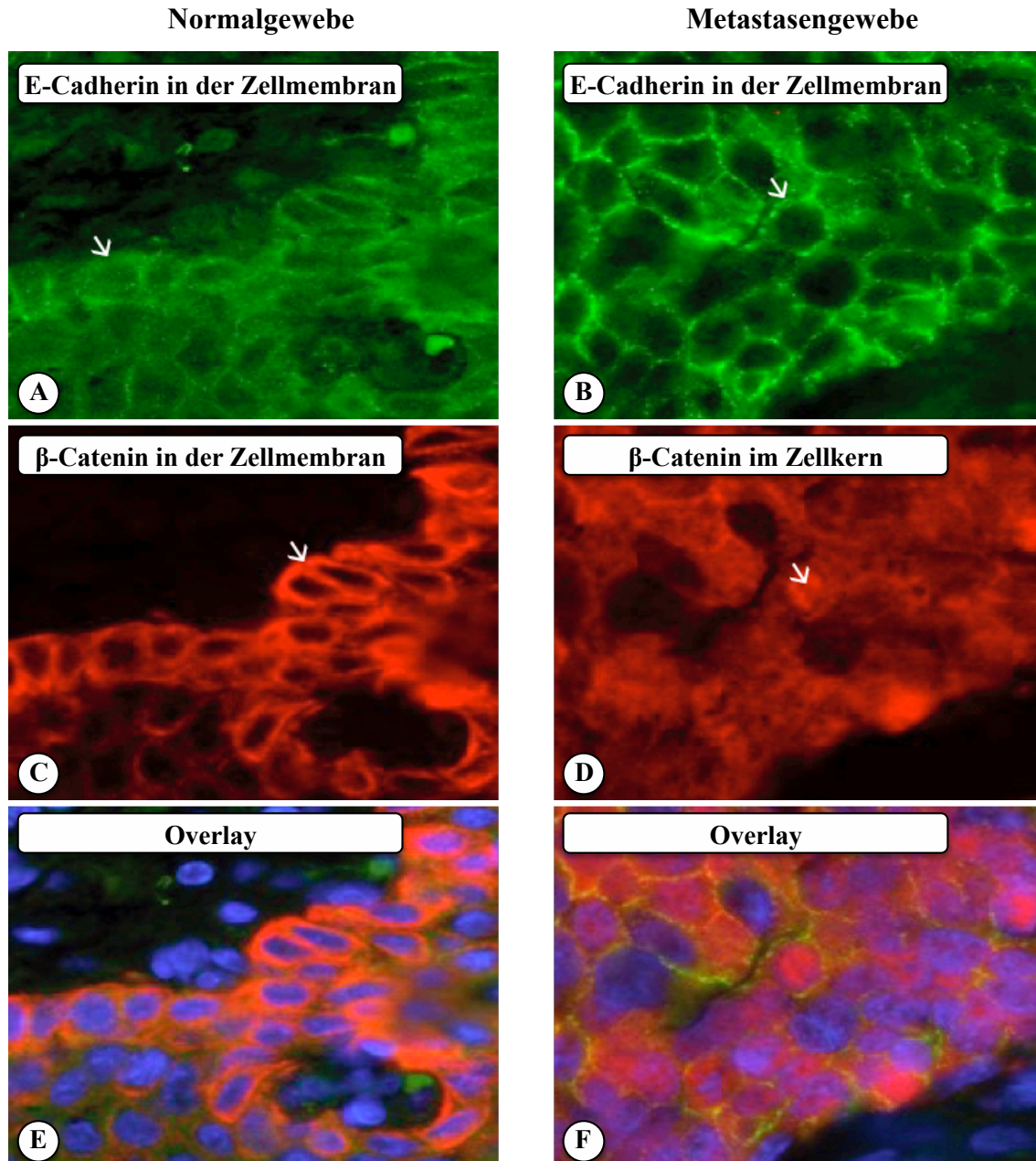


Abb. 16: Histologisches Bild β -Catenin-Immunfluoreszenzfärbung (100x).

Die histologischen Bilder zeigen exemplarisch Normalgewebe sowie Metastasengewebe. Grün gefärbt ist E-Cadherin, das die Zellmembran erkennen lässt, β -Catenin stellt sich rötlich gefärbt dar und die Zellkerne sind blau angefärbt. **A, C, E:** Normalgewebe mit gut sichtbar blau angefärbten Zellkernen und einer membranären Lokalisation von β -Catenin. **B, D, F:** Metastasengewebe mit ebenfalls blau angefärbten Zellkernen, es findet sich hier jedoch eine nukleäre Lokalisation des β -Catenins.

Von 68 untersuchten Metastasen wiesen 19 (27,9 %) eine vorwiegend nukleäre Lokalisation des β -Catenins auf, bei 49 (72,1 %) ließ sich das β -Catenin nur zytoplasmatisch oder membranär lokalisieren.

3.5 Die nukleäre Lokalisation von β -Catenin korreliert signifikant mit positivem HPV-Status

Von insgesamt 68 Metastasen waren 11 Metastasen (16 %) sowohl HPV-DNA als auch p16-IHC positiv und hatten dementsprechend einen positiven HPV-Status. Von 19 Metastasen mit einer nukleären Lokalisation des β -Catenins, waren 6 Metastasen (32 %) HPV-positiv, hingegen waren nur 5 Metastasen (10 %) der restlichen 49 Metastasen, mit nicht nukleärer Lokalisation des β -Catenins, HPV-positiv. Eine nukleäre β -Catenin-Lokalisation korrelierte signifikant mit einem positiven HPV-Status (Chi-Quadrat-Test, $p = .032$) (Tabelle 13).

Tab. 13: β -Catenin-Lokalisation in Abhängigkeit vom HPV-Status.

	HPV-Status negativ	HPV-Status positiv	Gesamt	Chi-Quadrat
β -Catenin nicht nukleär	44 (77,2 %)	5 (45,5 %)	49 (72,1 %)	p = .032
β -Catenin nukleär	13 (22,8 %)	6 (54,5 %)	19 (27,9 %)	
	57	11	68	

Es konnte für die nukleäre β -Catenin-Lokalisation im Vergleich zur nicht nukleären Lokalisation mittels univariater Überlebenszeitanalyse weder im gesamten noch im HPV-negativen Kollektiv ein signifikant besseres Überleben festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p = .641$ bzw. $p = .544$) (Abbildung 17 und 18).

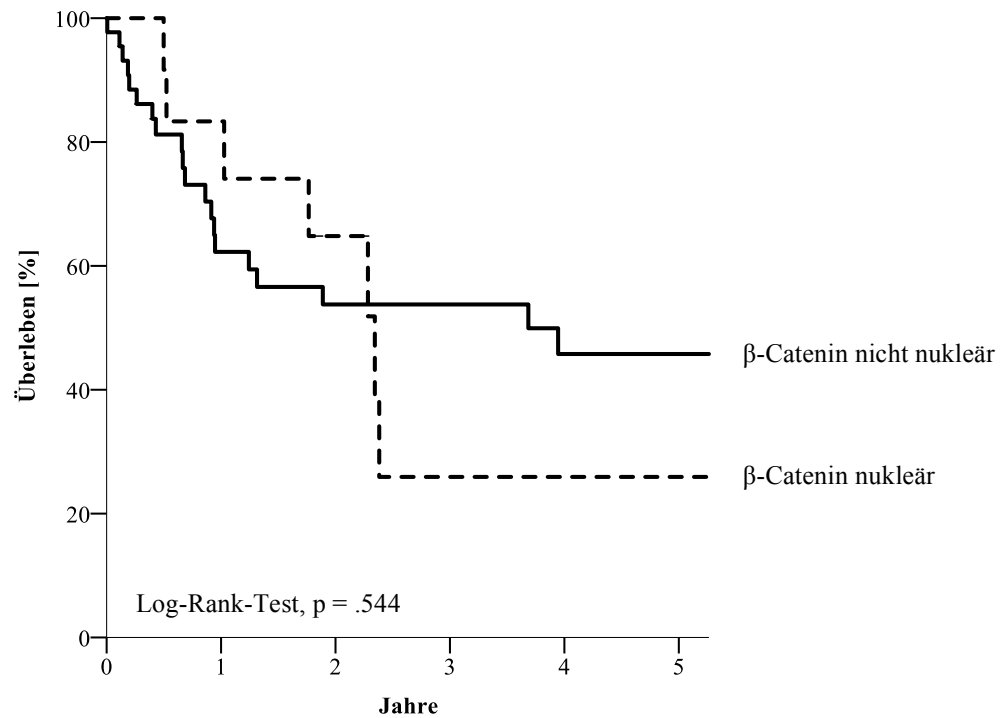


Abb. 17: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der β-Catenin-Lokalisation bei HPV-negativem CUP (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit nicht-nukleär lokalisiertem β-Catenin beträgt 3,7 Jahre, bei einer nukleären Lokalisation beträgt sie 2,3 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit nicht-nukleärer Lokalisation des β-Catenins 45,8 % und bei Patienten mit nukleärer Lokalisation 25,9 % (Log-Rank-Test, p = .544).

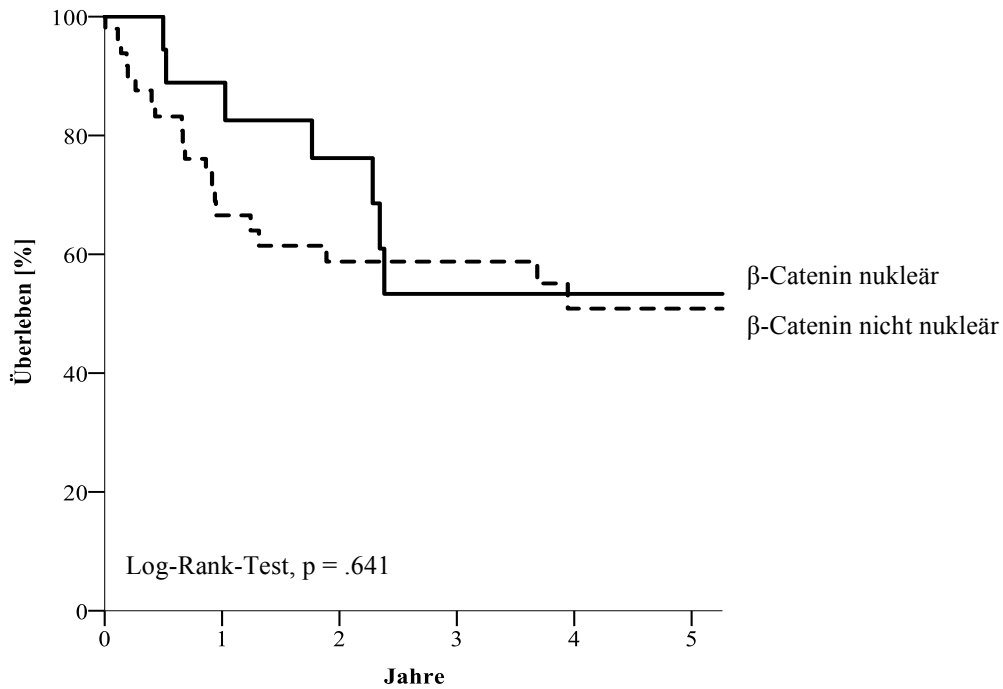


Abb. 18: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der β -Catenin-Lokalisation bei CUP (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit nicht-nukleär lokalisiertem β -Catenin beträgt 5,6 Jahre, bei einer nukleären Lokalisation beträgt sie 6,0 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit nicht-nukleärer Lokalisation des β -Catenins 50,9 % und bei Patienten mit nukleärer Lokalisation 53,3 % (Log-Rank-Test, $p = .641$).

3.6 Signifikant schlechtere Prognose in Abhängigkeit von Laborparametern bei Diagnose

Die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erfassten Laborparameter wurden anhand der Normwerte gruppiert. Folgende Laborparameter wurden erfasst:

- statistisch signifikant: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, CRP
- statistisch nicht signifikant: Thrombozyten, Quick, INR, PTT, Na^+ , K^+

Bei der Gruppe der statistisch nicht signifikanten Laborparameter konnte kein Zusammenhang zwischen dem Parameter und dem Faktor des Überlebens gefunden werden. Die Gruppe der statistisch signifikanten Laborparameter ging jedoch, je nach Parameter bei erhöhten oder erniedrigten Werten, mit einem signifikant besseren Überleben einher. Für die statistische Auswertung lag von 78 Patienten ein zum Zeitpunkt der Diagnose erstelltes Blutbild vor.

3.6.1 Signifikant schlechtere Prognose bei erhöhten CRP- und Leukozytenwerten

Von 78 Patienten wiesen 2 Patienten (2,4 %) erniedrigte Leukozytenwerte auf, 58 Patienten (74,4 %) normwertige und 18 Patienten (22 %) erhöhte Leukozytenwerte (Leukozytose). Aufgrund der geringen Fallzahl von Patienten mit erniedrigten Leukozytenwerten (2 Patienten, 2,4 %) wurden diese der Gruppe von Patienten mit normwertigen Leukozytenwerten zugefügt, sodass zwei Gruppen gebildet wurden: eine Gruppe mit normwertigen Leukozytenwerten bzw. „Leukozytose nein“ (60 Patienten, 76,9 %) und eine Gruppe mit erhöhten Leukozytenwerten bzw. „Leukozytose ja“ (18 Patienten, 23,1 %). Bei 65 der 78 Patienten (89 %) waren die CRP-Werte nicht erhöht, dies war jedoch bei 8 Patienten (11 %) der Fall. Mittels univariater Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass bei Patienten ohne Leukozytose zum Diagnosezeitpunkt das Überleben im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit Leukozytose statistisch signifikant besser war (Log-Rank-Test, $p < .001$) (Abbildung 19). Auch bei normwertigen CRP-Werten war das Überleben im Vergleich zu erhöhten CRP-Werten statistisch signifikant besser (Log-Rank-Test, $p < .001$) (Abbildung 20). Die Patienten ohne Leukozytose wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 3,4 Jahren und unter Berücksichtigung der zensierten Fälle eine 5-Jahres-Überlebensrate von 58,8 % auf, wohingegen die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit Leukozytose nur 1,4 Jahre betrug und die 5-Jahres-Überlebensrate unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 7,9 %. Patienten mit normwertigen CRP-Werten wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 3,2 Jahren auf, die 5-Jahres-Überlebensrate betrug unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 50,1 %. Bei Patienten mit erhöhten CRP-Werten betrug die mittlere Überlebenszeit 0,9 Jahre, die 5-Jahres-Überlebensrate unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 12,5 %. Das mediane Überleben konnte bei den Gruppen von Patienten mit normwertigen CRP- und Leukozytenwerten nicht berechnet werden, da keine 50 % dieser Patientengruppen im Beobachtungszeitraum verstarben. Das mediane Überleben bei Leukozytose betrug 0,7 Jahre (Tabelle 14) und dasjenige bei erhöhten CRP-Werten 0,3 Jahre (Tabelle 15).

Tab. 14: Einfluss der Leukozytenwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate.

Leukozytose?	n=78	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres-Überlebensrate (%)	Log-Rank-Test
nein	60	. ¹	58,8	p < .001
ja	18	0,7	7,9	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

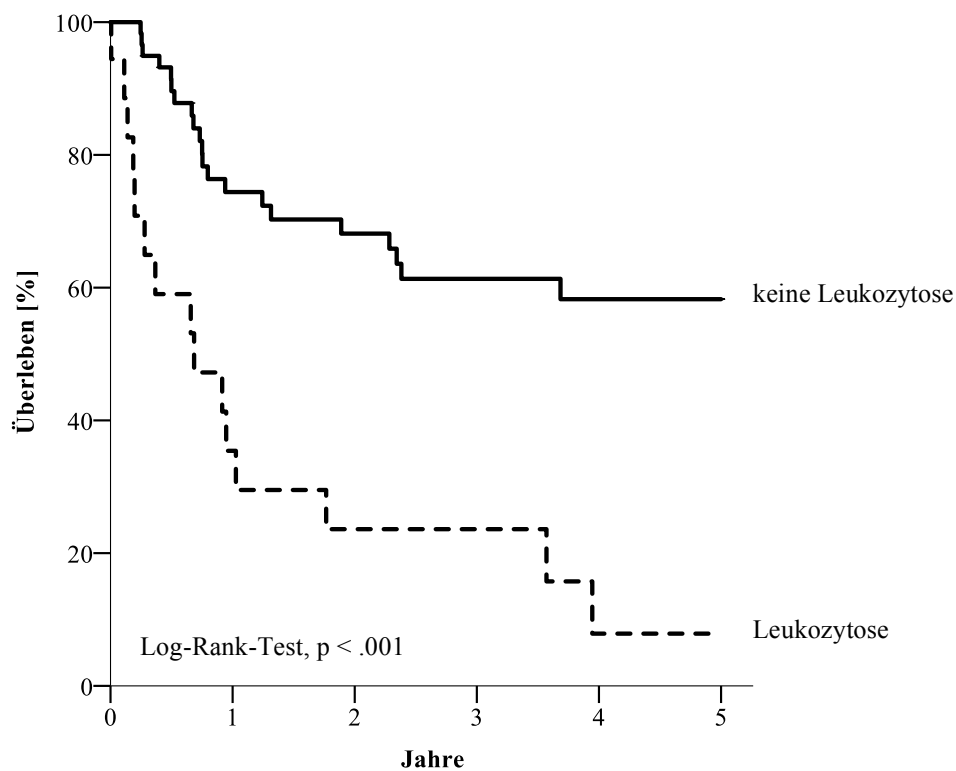


Abb. 19: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Leukozytenwerten (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit normwertigen Leukozytenwerten bei Diagnose liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei Patienten mit erhöhten Leukozytenwerten 0,7 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit normwertigen Leukozytenwerten 58,8 % und bei Patienten mit erhöhten Leukozytenwerten 7,9 % (Log-Rank-Test, p < .001).

Tab. 15: Einfluss der CRP-Werte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate.

CRP-Wert	n=78	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres-Überlebensrate (%)	Log-Rank-Test
im Normbereich	65	. ¹	50,1	p < .001
erhöht	8	0,3	12,5	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

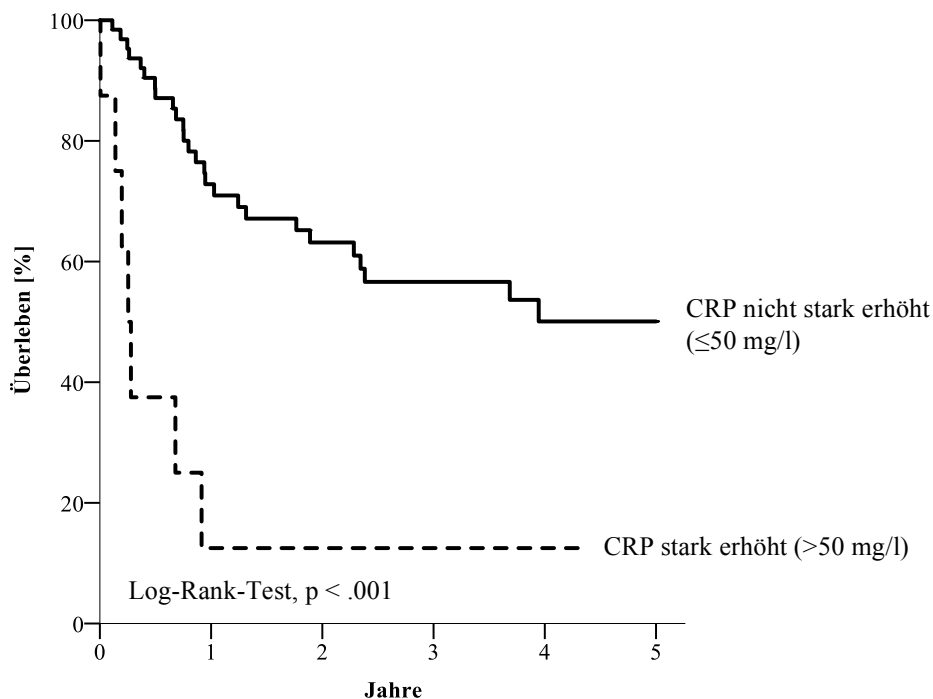


Abb. 20: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den CRP-Werten (Kaplan-Meier Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit normwertigen oder moderat erhöhten CRP-Werten (≤ 50 mg/l) bei Diagnose liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei Patienten mit stark erhöhten CRP-Werten (> 50 mg/l) 0,3 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit normwertigen oder moderat erhöhten CRP-Werten 50,1 % und bei Patienten mit stark erhöhten CRP-Werten 12,5 % (Log-Rank-Test, $p < .001$).

3.6.2 Signifikant schlechtere Prognose bei erniedrigten Erythrozytenwerten

Von 78 Patienten wiesen 17 Patienten (21,8 %) erniedrigte, 60 Patienten (76,9 %) normwertige und 1 Patient (1,3 %) erhöhte Erythrozytenwerte auf. Da nur 1 Patient einen erhöhten Erythrozytenwert hatte, wurde dieser der Gruppe mit Werten im Normbereich zugeordnet. So entstand eine Gruppe mit normwertigen (61 Patienten, 78,2 %) und eine mit erniedrigten (17 Patienten, 21,8 %) Erythrozytenwerten. Mittels univariater Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen von normwertigen Erythrozytenwerten zum Diagnosezeitpunkt das Überleben im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit erniedrigten Erythrozytenwerten statistisch signifikant besser war (Log-Rank-Test, $p = .039$). Die Patienten mit normwertigen Erythrozytenwerten wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 3,2 Jahren und unter Berücksichtigung der zensierten Fälle eine 5-Jahres-Überlebensrate von 48 % auf, wohingegen die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit erniedrigten Erythrozytenwerten nur 2,1 Jahre betrug und die 5-Jahres-Überlebensrate unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 35 %. Das mediane Überleben konnte bei der Gruppe von Patienten mit normwertigen Erythrozytenwerten nicht berechnet werden, da keine 50 % dieser Patientengruppe im Beobachtungszeitraum verstarben. Das mediane Überleben bei erniedrigten Erythrozytenwerten betrug 0,8 Jahre (Tabelle 16).

Tab. 16: Einfluss der Erythrozytenwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate.

Erythrozytenwert	n=78	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres-Überlebensrate (%)	Log-Rank-Test
im Normbereich	61	. ¹	48	p = .039
erniedrigt	17	0,8	35	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

3.6.3 Signifikant schlechtere Prognose bei erniedrigten Hämoglobin- und Hämatokritwerten

Von 78 Patienten wiesen 22 Patienten (28,2 %) erniedrigte, 53 Patienten (67,9 %) normwertige und 3 Patienten (3,8 %) erhöhte Hämoglobinwerte (Hb-Werte) auf. Da nur 3 Patienten einen erhöhten Hb-Wert hatten, wurden diese der Gruppe mit Werten im Normbereich zugerechnet. So entstand eine Gruppe mit normwertigen (56 Patienten, 71,8 %) und eine mit erniedrigten (22 Patienten, 28,2 %) Hb-Werten. Die Gruppe mit erniedrigten Hb-Werten wurde definiert als „Anämie ja“, die Gruppe mit normwertigen oder gar erhöhten Hb-Werten als „Anämie nein“. 19 Patienten (24,4 %) hatten erniedrigte, 58 Patienten (74,4 %) normwertige und 1 Patient (1,3 %) erhöhte Hämatokritwerte (Hkt-Werte). Auch hier wurde der einzige Patient mit erhöhten Werten der normwertigen Gruppe hinzugefügt, sodass diese 59 Patienten (75,6 %) umfasste. Mittels univariater Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Vorliegen von normwertigen Hb-Werten als auch Hkt-Werten zum Diagnosezeitpunkt das Überleben im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit erniedrigten Hb- bzw. Hkt-Werten statistisch signifikant besser war (Log-Rank-Test für Hb-Werte, $p = .001$, Log-Rank-Test für Hkt-Werte, $p < .001$) (Abbildung 21). Die Patienten ohne Anämie wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 3,4 Jahren und unter Berücksichtigung der zensierten Fälle eine 5-Jahres-Überlebensrate von 52,8 % auf, während die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit Anämie nur 1,7 Jahre betrug und die 5-Jahres-Überlebensrate unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 25,2 %. Das mediane Überleben konnte bei der Gruppe von Patienten mit normwertigen Hb-Werten nicht berechnet werden, da keine 50 % dieser Patientengruppe im Beobachtungszeitraum verstarben. Das mediane Überleben bei Patienten mit Anämie betrug 0,8 Jahre (Tabelle 17). Patienten mit normwertigen Hkt-Werten wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 3,5 Jahren und unter Berücksichtigung der zensierten Fälle eine 5-Jahres-Überlebensrate von 54,2 % auf. Bei erniedrigten Hkt-Werten betrug die mittlere Überlebenszeit 1,4 Jahre und die 5-Jahres-Überlebensrate unter Berücksichtigung der zensierten Fälle 19,7 %. Das mediane Überleben konnte bei Patienten mit normalen Hkt-Werten aufgrund der hohen Überlebensrate im Beobachtungszeitraum nicht bestimmt werden, betrug aber bei Patienten mit erniedrigten Werten 0,7 Jahre (Tabelle 18).

Tab. 17: Einfluss der Hämoglobinwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate.

Anämie?	n=78	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres-Überlebensrate (%)	Log-Rank-Test
nein	56	. ¹	52,8	p = .001
ja	22	0,8	25,2	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

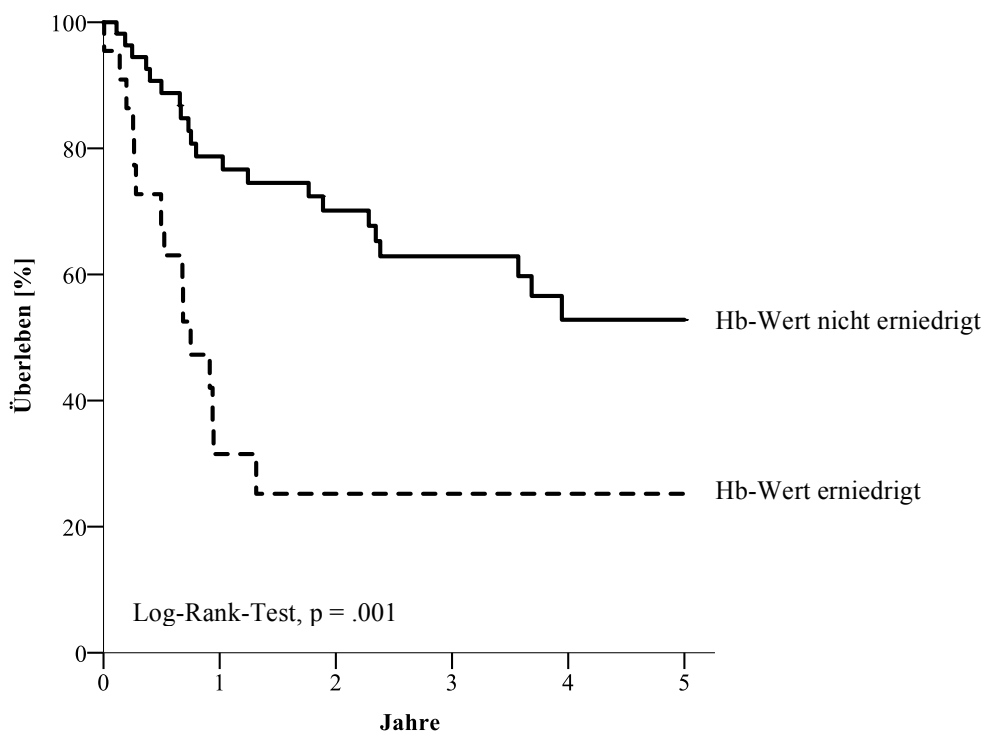


Abb. 21: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Hb-Werten (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit normwertigen oder erhöhten Hb-Werten bei Diagnose liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei Patienten mit erniedrigten Hb-Werten 0,8 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit normwertigen oder erhöhten Hb-Werten 52,8 % und bei Patienten mit erniedrigten Hb-Werten 25,2 % (Log-Rank-Test, p = .001).

Tab. 18: Einfluss der Hämatokritwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate.

Hämatokritwert	n=78	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-Jahres-Überlebensrate (%)	Log-Rank-Test
im Normbereich	59	. ¹	54,2	p < .001
erhöht	19	0,7	19,7	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

3.7 Prognose in Abhängigkeit des Geschlechts

Das Patientenkollektiv bestand aus 14 Frauen (17 %) und 68 Männern (83 %). Das weibliche Geschlecht korrelierte mit einem statistisch signifikant besseren Überleben (Log-Rank-Test, p = .044) (Abbildung 22). Bei Ausweitung des Beobachtungszeitraums auf 10 Jahre zeigt sich ebenfalls ein statistisch signifikant besseres Überleben der weiblichen Patienten gegenüber dem Überleben der männlichen Patienten (Log-Rank-Test, p = .044). Die mittlere Überlebenszeit der Frauen betrug 4,1 Jahre und ihre 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 62,7 %. Die mittlere Überlebenszeit der Männer lag hingegen bei 2,7 Jahren, ihr medianes Überleben bei 2,3 Jahren und ihre 5-Jahres-Überlebensrate bei 41,4 %.

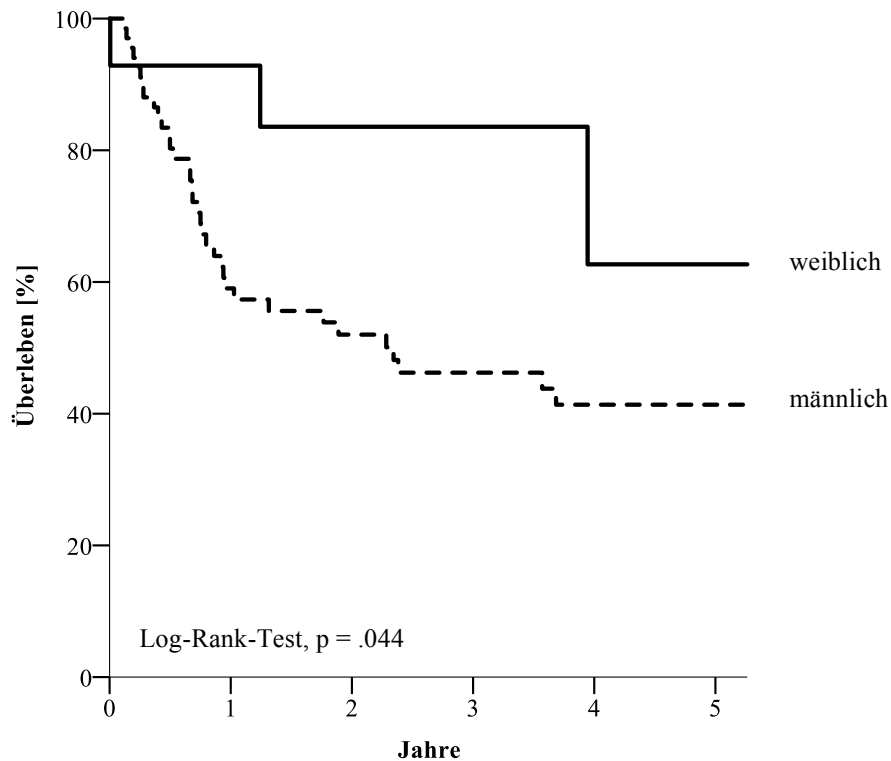


Abb. 22: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Geschlecht (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der weiblichen Patienten liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei den männlichen Patienten 2,3 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei den weiblichen Patienten 62,7 % und bei den männlichen Patienten 41,4 % (Log-Rank-Test, $p = .044$).

3.8 Prognose in Abhängigkeit von Nikotin- und Alkoholabusus

Bei Patienten mit Alkoholabusus (32 Patienten, 39 %) betrug die mittlere Überlebenszeit 2 Jahre und die 5-Jahres-Überlebensrate 25 %, das mediane Überleben lag bei 0,9 Jahren. Dies stellte im Vergleich zu nicht abhängigen Patienten (50 Patienten, 61 %) ein signifikant schlechteres Überleben dar (Log-Rank-Test, $p = .002$) (Abbildung 23). Bei diesen Patienten betrug die mittlere Überlebenszeit 3,6 Jahre und die 5-Jahres-Überlebensrate 59,3 %. Die mediane Überlebenszeit lag bei 6 Jahren. Zwischen Patienten mit Nikotinabusus (52 Patienten, 63,4 %) und Patienten ohne Nikotinabusus (30 Patienten, 36,6 %), zeigte sich kein signifikant schlechteres Überleben, jedoch ließ sich ein Trend hierhingehend nachweisen (Log-Rank-Test, $p = .094$). Mit Nikotinabusus lag die mittlere Überlebenszeit bei 4,3 Jahren und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 38,2 %. Das mediane Überleben lag bei 2,3 Jahren. Nichtraucher hatten eine mittlere Überlebenszeit von 4,6 Jahren und eine 5-Jahres-

Überlebensrate von 59,1 %. Ein medianes Überleben ließ sich nicht bestimmen, da zum Ende des Beobachtungszeitraums noch mehr als 50 % der Patienten lebten.

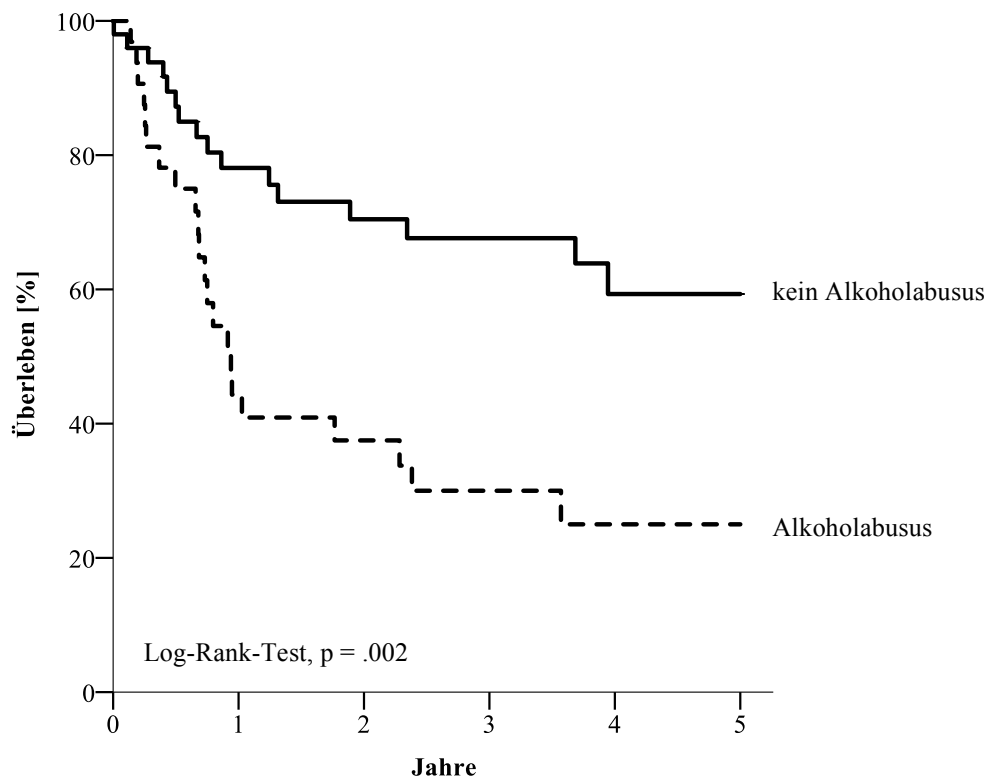


Abb. 23: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alkoholabusus (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der nicht abhängigen Patienten beträgt bei den nicht abhängigen Patienten 6 Jahre, bei den abhängigen Patienten 0,9 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei den nicht abhängigen Patienten bei 59,3 % und bei den abhängigen Patienten bei 25 % (Log-Rank-Test, $p = .002$).

3.9 Prognose in Abhängigkeit der Komorbidität

Bei Betrachtung der Komorbidität zum Diagnosezeitpunkt, quantifiziert als ECOG-Status, ließ sich feststellen, dass das Überleben signifikant abhängig von der Höhe des ECOG-Status war. Ein niedriger ECOG-Status wurde definiert als ECOG-Status < 2 (55 Patienten, 67 %) und ein hoher ECOG-Status als ≥ 2 (27 Patienten, 33 %). Ein niedriger ECOG-Status ging mit einer signifikant besseren Prognose einher (Log-Rank-Test, $p < .001$). Bei diesen Patienten betrug die mittlere Überlebenszeit 3,1 Jahre und die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 63,2 %, während die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit hohem ECOG-Status bei 1,6 Jahren und die 5-Jahres-Überlebensrate 14,8 % betrug. Das mediane Überleben bei hohem ECOG-Status lag bei 0,8 Jahren.

3.10 Prognose in Abhängigkeit der N-Kategorie

Die N-Kategorie zum Zeitpunkt der Diagnose war bei 80 Patienten bekannt. Lag die N-Kategorie bei N1 oder N2, war das Überleben der Patienten signifikant besser als bei Patienten mit einem N3-Status (Log-Rank-Test, $p = .001$) (Abbildung 24). Bei denjenigen Patienten, die einen N1- oder N2-Status (57 Patienten, 71 %) vorwiesen, lag die mittlere Überlebenszeit bei 3,4 Jahren und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 55,4 %. Bei Patienten mit einem N3-Status (23 Patienten, 29 %) betrug die mittlere Überlebenszeit 1,8 Jahre, die 5-Jahres-Überlebensrate 23,8 % und das mediane Überleben 0,8 Jahre.

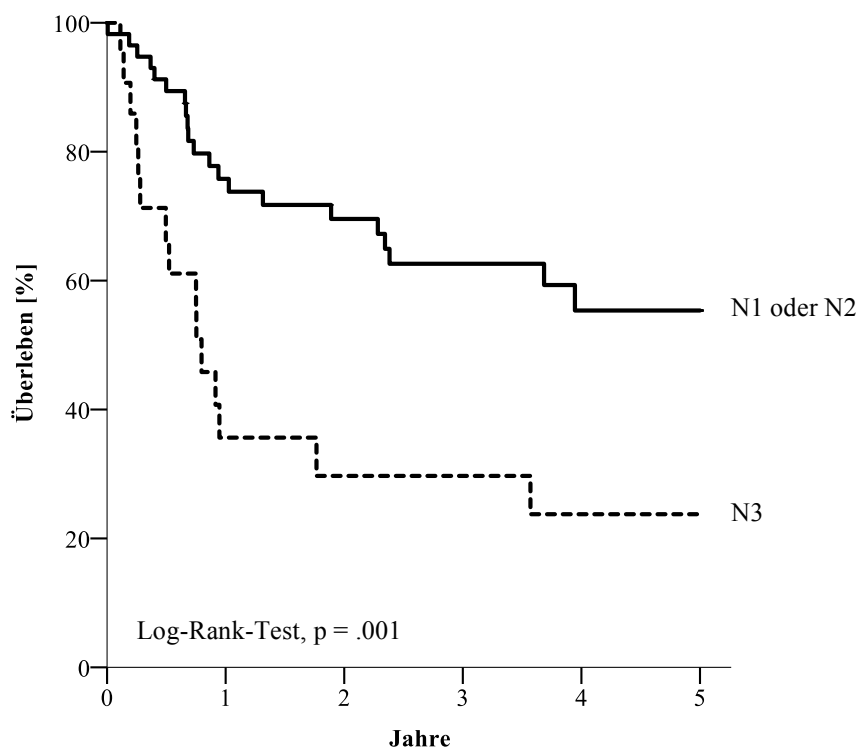


Abb. 24: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der N-Kategorie (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit einem N1- oder N2-Status liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei den Patienten mit N3-Status 0,8 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei den Patienten mit N1- oder N2-Status 55,4 % und bei den Patienten mit N3-Status 23,8 % (Log-Rank-Test, $p = .001$).

Prognostisch ebenfalls relevant war die Anzahl der betroffenen Lymphknoten. Diese Information lag von 65 Patienten vor. Bei 5 Patienten (7,7 %) waren 10 oder mehr Lymphknoten betroffen. Diese Patienten hatten ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit weniger betroffenen Lymphknoten (Log-Rank-Test, $p < .001$). Die mittlere Überlebenszeit betrug 0,5 Jahre, die 5-Jahres-Überlebensrate 0 % und das

mediane Überleben 0,4 Jahre. Bei den 60 Patienten (92,3 %), die weniger als 10 betroffene Lymphknoten vorwiesen, lag die mittlere Überlebenszeit bei 3,5 Jahren und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 56,2 %.

3.11 Prognose in Abhängigkeit von Fernmetastasen

Von Bedeutung war auch, ob zum Diagnosezeitpunkt nur zervikale Metastasen gefunden wurden oder auch andere Regionen des Körpers betroffen waren. 12 Patienten (15 %) wurden mit zusätzlichen Metastasen diagnostiziert. Ihr medianes Überleben betrug 0,7 Jahre. Dieses und die mittlere Überlebenszeit von 0,8 Jahren waren signifikant geringer als die mittlere Überlebenszeit der restlichen 70 Patienten (85 %) mit rein zervikalen Metastasen, die bei 3,3 Jahren lag. Bei diesen Patienten lag das mediane Überleben bei 5,6 Jahren (Log-Rank-Test, $p < .001$). Auch die 5-Jahres-Überlebensrate unterschied sich mit 0 % derjenigen Patienten, die mehrere Metastasen hatten, deutlich von der Rate mit 53,3 % derjenigen Patienten, die nur zervikale Metastasen hatten.

3.12 Einfluss der Therapie auf das Überleben

Ebenfalls Unterschiede im Hinblick auf die Überlebenszeit gab es bei der Therapie. Dabei profitierten Patienten mit einer Neck Dissection von einem signifikant besseren Überleben (Log-Rank-Test, $p < .001$) (Abbildung 25). Bei 58 Patienten (71 %) wurde im Rahmen ihrer Behandlung eine Neck Dissection durchgeführt. Ihre mittlere Überlebenszeit betrug 3,7 Jahre, die mediane Überlebenszeit 6 Jahre und ihre 5-Jahres-Überlebensrate 62,3 %. 24 Patienten (29 %) erhielten keine Neck Dissection. Die mittlere Überlebenszeit dieser Gruppe lag bei 1,2 Jahren, das mediane Überleben bei 0,7 Jahren und die 5-Jahres-Überlebenszeit bei 10 %.

Im Folgenden sind die Charakteristika des Kollektivs, das eine Neck Dissection erhielt, beschrieben (Tabelle 19): Signifikant häufiger wurde diese durchgeführt bei Patienten mit besserem ECOG, ohne Alkoholabusus, niedrigerer N-Kategorie, ohne Fernmetastasen und ohne Leukozytose sowie ohne Anämie (Chi-Quadrat-Test, $p < .001$, $p < .001$, $p = .002$, $p = .002$, $p = .030$ und $p = .053$). 9 der 11 HPV-positiven Patienten erhielten eine Neck-Dissection (81,8 %), während 44 der 57 HPV-negativen Patienten (77,2 %) eine solche erhielt, sodass sich an dieser Stelle kein signifikanter Unterschied nachweisen ließ (Chi-Quadrat-Test, $p = .735$).

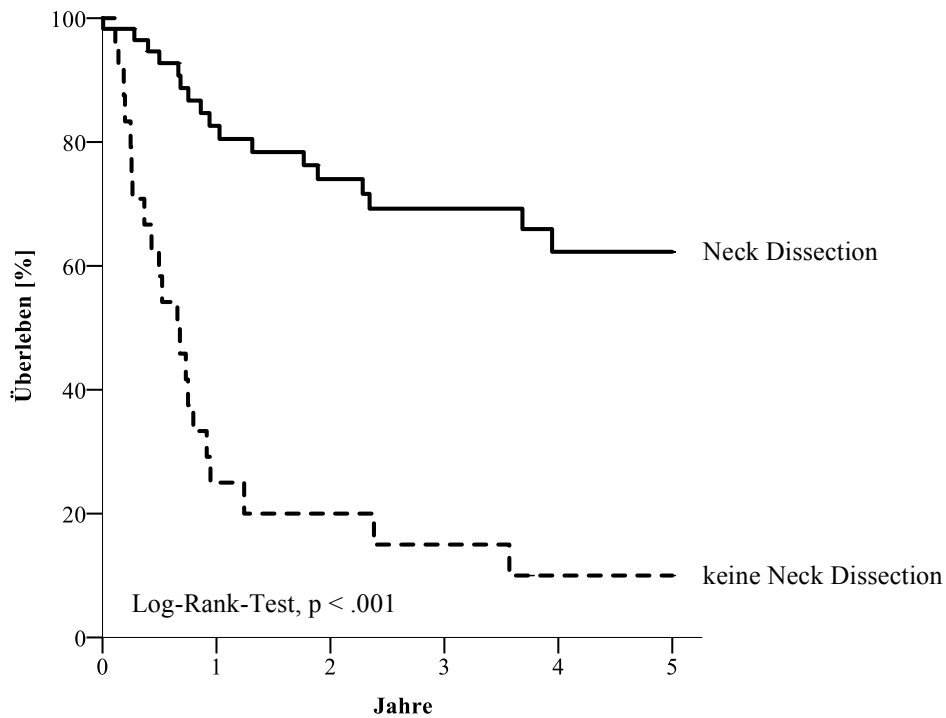


Abb. 25: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Therapie (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten, die eine Neck Dissection erhielten, liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums bei über 50 % und beträgt bei den Patienten ohne Neck Dissection 0,7 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei den Patienten mit Neck Dissection 62,3 % und bei den Patienten ohne Neck Dissection 10 % (Log-Rank-Test, $p = <.001$).

Tab. 19: Charakteristika der Patienten mit Neck Dissection.

Parameter	n (100 %)	Neck Dissection		Chi- Quadrat	
		ja	nein		
ECOG	< 2	55	48 (87,3 %)	7 (12,7 %)	< .001
	≥ 2	27	10 (37 %)	17 (63 %)	
Alkoholabusus	ja	32	15 (46,9 %)	17 (53,1 %)	< .001
	nein	50	43 (86 %)	7 (14 %)	
N-Kategorie	N1 oder N2	57	47 (82,5 %)	10 (17,5 %)	.002
	N3	23	11 (47,8 %)	12 (52,2 %)	
Fernmetastasen	ja	12	4 (33,3 %)	8 (66,7 %)	.002
	nein	70	54 (77,1 %)	16 (22,9 %)	
Leukozytose	ja	18	9 (50 %)	9 (50 %)	.030
	nein	60	46 (76,7 %)	14 (23,3 %)	
Anämie	ja	22	12 (54,5 %)	10 (45,5 %)	.053
	nein	56	43 (76,8 %)	13 (23,2 %)	
HPV-Status	positiv	11	9 (81,8 %)	2 (18,2 %)	.735
	negativ	57	44 (77,2 %)	13 (22,8 %)	

3.12.1 Einfluss der Therapie auf das Überleben in Abhängigkeit von Fernmetastasierung

Bei 12 Patienten (15 %) wurden zum Zeitpunkt der Diagnose auch Metastasen anderer Körperregionen festgestellt. Von diesen 12 Patienten, allesamt HPV-Status negativ, erhielten 8 (66,6 %) keine Neck Dissection und 4 Patienten wurden mittels Neck Dissection therapiert (33,3 %). Da alle Patienten innerhalb von weniger als 2 Jahren verstarben (1 Fall zensiert) konnte keine 5-Jahres-Überlebensrate bestimmt werden. Jedoch betrug die mediane Überlebenszeit bei Patienten, die trotz einer Fernmetastasierung eine Neck Dissection erhielten, 1 Jahr, wohingegen die mediane Überlebenszeit der Patienten ohne Neck Dissection bei nur 0,4 Jahren lag. Hier zeigt sich ein deutlicher, wenn auch nicht statistisch signifikanter, Trend (Log-Rank-Test, $p = .077$) (Abbildung 26).

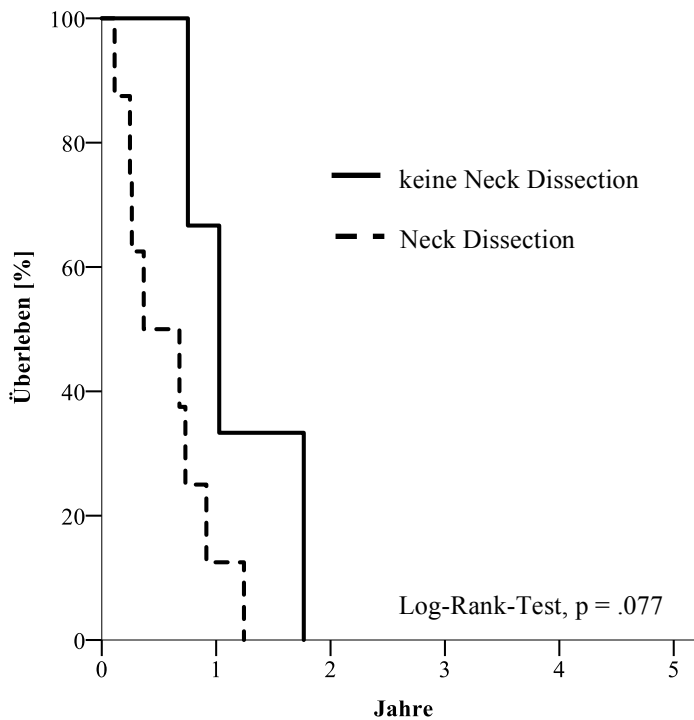


Abb. 26: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasierung und Therapie (Kaplan-Meier-Graph).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten, die trotz Fernmetastasierung eine Neck Dissection erhielten, liegt bei 1 Jahr und beträgt bei den Patienten ohne Neck Dissection 0,4 Jahre (Log-Rank-Test, $p = .077$).

3.13 Tabellarische Übersicht der Risikofaktoren

Als statistisch signifikant im gesamten Kollektiv zeigten sich folgende Parameter: HPV-Status, Geschlecht, Alkoholabusus, ECOG-Status, N-Kategorie, Fernmetastasierung, Neck Dissection sowie Leukozytose und Anämie (Tabelle 20, Log-Rank-Test jeweils $p < .050$)

Da die 5-Jahres-Überlebensrate der 11 HPV-positiven Patienten 100 % betrug und somit eine Verzerrung der prognostischen Parameter in Hinblick auf das Überleben der HPV-negativen Patientengruppe befürchtet wurde, wurde zusätzlich eine deskriptive Analyse unter Ausschluss der 11 HPV-positiven Patienten durchgeführt (Tabelle 21).

Tab. 20: Prognostische Faktoren bei CUP.

Parameter		n	Mediane Überlebens- zeit (Jahre)	5-Jahres- Überlebens- rate (%)	Log- Rank- Test
ECOG-Status	< 2	55	. ¹	63,2	p < .001
	> 2	27	0,8	14,8	
N-Kategorie	N1 oder N2	57	. ¹	55,4	p < .001
	N3	23	0,8	23,8	
Fernmetastasen	nein	70	5,6	53,3	p < .001
	ja	12	0,7	0	
Neck Dissection	ja	58	6	62,3	p < .001
	nein	24	0,7	10	
Leukozytose	nein	60	. ¹	58,3	p < .001
	ja	18	0,7	7,9	
CRP-Erhöhung	nein	65	. ¹	50,1	p < .001
	ja	8	0,3	12,5	
Anämie	nein	56	5,6	52,8	p = .001
	ja	22	0,8	25,2	
Alkoholabusus	nein	50	6	59,3	p = .002
	ja	32	0,9	25	
HPV-Status	positiv	11	. ¹	100	p = .007
	negativ	51	0,9 ²	43	
Geschlecht	weiblich	14	4,1	62,7	p = .044
	männlich	68	2,3	41,4	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

² Zur Berechnung der medianen Überlebenszeit wurde hier der Beobachtungszeitraum auf 10 Jahre erweitert, da innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 5 Jahren keine 50 % der Patienten verstarben.

Tab. 21: Prognostische Faktoren bei HPV-negativem CUP.

Parameter		n	Mediane Überlebens- zeit (Jahre)	5-Jahres- Überlebens- rate (%)	Log- Rank- Test
Neck Dissection	ja	57	44	5,6	p < .001
	nein		13	0,5	
Leukozytose	nein	54	40	5,6	p < .001
	ja		14	0,7	
ECOG-Status	< 2	57	40	5,6	p = .005
	> 2		17	1,2	
Fernmetastasen	nein	57	50	4	p = .005
	ja		7	1	
N-Kategorie	N1 oder N2	55	41	4	p = .015
	N3		14	0,9	
CRP-Erhöhung	nein	51	46	3,7	p = .019
	ja		5	0,1	
Anämie	nein	54	38	4	p = .052
	ja		16	0,9	
Alkoholabusus	nein	57	37	6	p = .059
	ja		20	1	
Geschlecht	weiblich	57	10	. ¹	p = .187
	männlich		47	2,3	

¹ Mediane Überlebenszeit konnte nicht bestimmt werden, da keine 50 % der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

3.13.1 Hazard Ratio der prognostischen Faktoren

Anhand der hier untersuchten Risikofaktoren wurde im Anschluss die Hazard Ratio berechnet, um die Überlebenszeiten der Gruppen zu vergleichen (Tabelle 22). Hierbei stellten sich die Parameter Fernmetastasen, ECOG-Status und Leukozytose mit einer Hazard Ratio zwischen 4.805 (Fernmetastasen) und 4.019 (Leukozytose) als hoch signifikant ($p < .001$) heraus. Auch hier wurde die Auswertung zudem unter Ausschluss der 11 HPV-positiven Patienten durchgeführt (Tabelle 23).

Tab. 22: Hazard Ratio der prognostischen Faktoren bei CUP.

Parameter	Signifikanz	HR	KI 95 %
CRP-Erhöhung	< .001	5.008	2.141–11.714
Fernmetastasen	< .001	4.805	2.267–10.184
ECOG-Status	< .001	4.124	2.188–7.774
Leukozytose	< .001	4.019	2.059–7.845
N-Kategorie	.001	3.081	1.598–5.941
Anämie	.002	2.877	1.475–5.612
Alkoholabusus	.003	2.641	1.404–4.968
Geschlecht	.057	.318	.098–1.033
Neck Dissection	< .001	.175	.091–.337

Tab. 23: Hazard Ratio der prognostischen Faktoren bei HPV-negativem CUP.

Parameter	Signifikanz	HR	KI 95 %
Leukozytose	< .001	5.048	2.270–11.225
Fernmetastasen	.008	3.639	1.399–9.466
CRP-Erhöhung	.027	3.385	1.147–9.990
ECOG-Status	.007	2.751	1.320–5.730
N-Kategorie	.020	2.636	1.169–5.947
Anämie	.057	2.167	.976–4.811
Alkoholabusus	.064	1.999	.960–4.164
Geschlecht	.455	.198	.137–1.509
Neck Dissection	< .001	.143	.062–.327

3.13.2 Verteilung der prognostischen Parameter im HPV-positiven und HPV-negativen Kollektiv

Tabelle 24 zeigt die Verteilung der prognostischen Parameter im Gesamtkollektiv sowie im HPV-positiven Kollektiv im Vergleich zum HPV-negativen Kollektiv. Dies kann helfen, die Unterschiede beider Kollektive herauszustellen, um Einflussfaktoren auf die abweichende Überlebensrate der beiden Kollektive zu ermitteln. Es lassen sich Trends ablesen, wie bspw. eine höhere Rate an Fernmetastasen und Neck Dissection, eine höhere N-Kategorie sowie eine häufiger aufgetretene Leukozytose im HPV-negativen Kollektiv im Vergleich zum HPV-positiven Kollektiv.

3. Ergebnisse

Tab. 24: Verteilung der prognostischen Parameter nach HPV-Status.

Parameter		n (%)	HPV-negativ	HPV-positiv	Exakter Test nach Fisher
Geschlecht	weiblich	13 (19,1 %)	10 (17,5 %)	3 (27,3 %)	p = .350
	männlich	55 (80,9 %)	47 (82,5 %)	8 (72,7 %)	
Alkoholabusus	nein	45 (66,2 %)	37 (64,9 %)	8 (72,7 %)	p = .450
	ja	23 (33,8 %)	20 (35,1 %)	3 (27,3 %)	
ECOG-Status	< 2	50 (73,5 %)	40 (70,2 %)	10 (90,9 %)	p = .145
	≥ 2	18 (26,5 %)	17 (29,8 %)	1 (9,1 %)	
N-Kategorie	N1 oder N2	51 (77,3 %)	41 (74,5 %)	10 (90,9 %)	p = .223
	N3	15 (22,7 %)	14 (25,5 %)	1 (9,1 %)	
Fernmetastasen	nein	61 (89,7 %)	50 (87,7 %)	11 (100 %)	p = .273
	ja	7 (10,3 %)	7 (12,3 %)	0 (0 %)	
Neck Dissection	ja	53 (77,9 %)	44 (77,2 %)	9 (81,8 %)	p = .544
	nein	15 (22,1 %)	13 (22,8 %)	2 (18,2 %)	
Leukozytose	nein	50 (76,9 %)	40 (74,1 %)	10 (90,9 %)	p = .214
	ja	15 (23,1 %)	14 (25,9 %)	1 (9,1 %)	
Anämie	nein	48 (73,8 %)	38 (70,4 %)	10 (90,9 %)	p = .149
	ja	17 (26,2 %)	16 (29,6 %)	1 (9,1 %)	
CRP-Erhöhung	nein	57 (91,9 %)	46 (90,2 %)	11 (100 %)	p = .363
	ja	5 (8,1 %)	5 (9,8 %)	0 (0 %)	

3.14 Multivariate Analysen

Im Rahmen multivariater Analysen können mehrere Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben berücksichtigt werden. Hierzu wurde das Cox-Regressionsmodell verwendet, um Parameter wie Fernmetastasierung, N-Kategorie und ECOG-Status auf ihre Relevanz für das Überleben der Patienten zu prüfen.

Neben der vorbestehenden Komorbidität ($p = .009$) war das Vorliegen einer Leukozytose zum Zeitpunkt der Diagnose ($p = .017$) von statistischer Signifikanz. Ein Trend ließ sich bei Vorliegen einer Anämie bei Diagnosestellung ($p = .057$), bei Therapie in Form einer Neck Dissection ($p = .069$) sowie beim Geschlecht ($p = .076$) nachweisen (Tabelle 25).

Tab. 25: Multivariate Analyse.

Parameter	Signifikanz	HR	KI 95 %
Geschlecht	.076	4.571	.851–24.547
ECOG-Status	.009	3.588	1.381–9.322
Leukozytose	.017	2.971	1.212–7.284
Anämie	.057	2.122	.977–4.609
Neck Dissection	.069	.445	.185–1.067

3.14.1 Abhängigkeit von Therapie und Komorbidität

Im Rahmen der multivariaten Analyse zeigte sich unter Hinzuziehen des Interaktionsterms Neck Dissection/ECOG-Status, dass es sich hier nicht um unabhängige Variablen handelt. Ohne Hinzuziehen des Interaktionsterms zeigten sich sowohl die Therapie in Form einer Neck Dissection ($p = .001$), als auch der ECOG-Status ($p = .034$) statistisch signifikant. Unter Berücksichtigung des Interaktionsterms Neck Dissection/ECOG-Status blieb die Signifikanz der Neck Dissection unverändert ($p = .001$), während sich der ECOG-Status nicht mehr signifikant zeigte ($p = .449$) (Tabelle 26).

3. Ergebnisse

Tab. 26: Neck Dissection und ECOG-Status mit und ohne Interaktionsterm.

Parameter	Signifikanz	HR	KI 95 %
Neck Dissection	.001	.271	.125–.585
ECOG-Status	.034	2.252	1.064–4.765
Parameter	Signifikanz	HR	KI 95 %
Neck Dissection	.001	.174	.060–.502
ECOG-Status	.449	1.478	.538–4.058
Neck Dissection/ ECOG-Status	.278	2.139	.541–8.460

4. Diskussion

Für diese Arbeit wurden bei 68 Gewebeproben von zervikalen Karzinommetastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP) die Proteine β -Catenin sowie p16^{INK4a} mittels β -Catenin- und p16^{INK4a}-Immunhistochemie angefärbt und ausgewertet. Es wurde eine Einteilung der Metastasen anhand der Lokalisation des β -Catenins in der Zelle durchgeführt, wobei in 19 der Gewebeproben (28 %) das β -Catenin nukleär lokalisiert werden konnte. Eine p16^{INK4a}-Überexpression wurde durch eine braune Färbung des Zytoplasmas sichtbar und fand wie unten geschildert Eingang in die Bestimmung des HPV-Status.

Des Weiteren erfolgte ein HPV-DNA-Nachweis mittels DNA-Extraktion und anschließender PCR. Metastasen, die sowohl HPV-DNA- als auch p16^{INK4a}-positiv waren, wurden als HPV-positiv definiert. Diese HPV-positiven Patienten hatten gegenüber den HPV-negativen Patienten eine signifikant längere Überlebenszeit wie eine Auswertung mithilfe der aus dem Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS) gewonnenen Daten zeigte (Log-Rank-Test, $p = .007$). Die HPV-positive Prävalenz lag hierbei nur bei 16,2 %.

Eine nukleäre Lokalisation des β -Catenins korrelierte signifikant mit einem positiven HPV-Status (Chi-Quadrat-Test, $p = .032$). Für eine nukleäre β -Catenin-Lokalisation im Vergleich zur nicht nukleären Lokalisation mittels univariater Überlebenszeitanalyse konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf das Überleben festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p = .582$). Somit konnte in diesem Kollektiv die β -Catenin-Lokalisation allein nicht als prognostischer Parameter herausgearbeitet werden.

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte die Auswertung anhand von Patientenakten. Insgesamt umfasste das Kollektiv 82 Patienten, von 78 der Patienten lagen u. a. folgende Laborwerte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Quick, INR, PTT, Na⁺ und K⁺ sowie CRP. Eine signifikant schlechtere Prognose hatten hierbei Patienten mit einem erhöhten CRP-Wert (Log-Rank-Test, $p < .001$), einer Leukozytose (Log-Rank-Test, $p = .032$), einem erniedrigten Erythrozytenwert (Log-Rank-Test, $p = .039$) sowie einem erniedrigten Hämoglobin- (Log-Rank-Test, $p = .001$) oder Hämatokritwert (Log-Rank-Test, $p < .001$). Somit konnten die zum Diagnosezeitpunkt vorliegenden Faktoren Inflammation und Anämie als weitere prognostische Faktoren herausgearbeitet werden.

Auch bei Auswertung der biometrischen Merkmale zeigten sich Einflüsse auf das Überleben. Eine signifikant schlechtere Prognose konnte für das männliche Geschlecht (Log-Rank-Test, $p = .044$) sowie Patienten mit Alkoholabusus (Log-Rank-Test, $p = .002$) gezeigt werden. Von besonderer Bedeutung scheinen niedrige Komorbidität (Log-Rank-Test, $p < .001$), niedrige N-Kategorie (Log-Rank-Test, $p = .001$) sowie das Fehlen von Fernmetastasen (Log-Rank-Test, $p < .001$) für eine bessere Prognose zu sein.

Bzgl. der Therapie zeigte sich, dass die Durchführung eine Neck Dissection mit einem signifikant besseren Überleben (Log-Rank-Test, $p < .001$) einherging.

Zusätzlich zu dem bereits bekannten prognostisch günstigen Faktor der operativen Therapie scheint vor allem ein weiterer prognostischer Marker von hoher Bedeutung zu sein: Der HPV-Status (Log-Rank-Test, $p = .007$). Eine wichtigere Rolle als die operative Therapie (Hazard Ratio Neck Dissection = .143) scheint wiederum zu spielen, ob zum Diagnosezeitpunkt eine Inflammation vorliegt (Hazard Ratio Leukozytose = 5.048) oder bspw. in welcher körperlichen Verfassung sich der Patient befindet (Hazard Ratio ECOG-Status = .2.751).

4.1 HPV-Prävalenz innerhalb des CUP-Kollektivs

Der HPV-Nachweis erfolgte durch Kombination zweier Verfahren. Zum einen mittels PCR, mithilfe derer auch eine Genotypisierung durchgeführt wurde, zum anderen durch Anwendung einer p16^{INK4a}-Immunhistochemie (IHC). Nur beim Nachweis von sowohl HPV-DNA als auch p16-Immunreaktivität wurde eine aktive HPV-Infektion angenommen (Sano et al., 1998; Wittekindt et al., 2005). Es erfolgte dann eine Einteilung entsprechender Metastasen in HPV-DNA-positiv.

Von den 68 hier untersuchten Gewebeproben waren 11 (16,2 %) HPV-DNA-positiv. Diese Zahl entspricht auch Ergebnissen anderer Studien, in denen bei durchschnittlich 16–30,9 % der HNSCC das Vorliegen einer HPV-Assoziation beschrieben wird (Kreimer et al., 2005). Auch die Spannweite der HPV-Prävalenz innerhalb der HNSCC ist interessant: Sie reicht von 16 % bei laryngealen SCCs bis hin zu 30,9 % bei oropharyngealen SCCs (Kreimer et al., 2005). Ebenso gibt es innerhalb der einzelnen Subtypen je nach Studie große Spannweiten, wie z. B. von 14,1 % HPV-positiven oropharyngealen Karzinomen (Lindel et al., 2001) hin bis zu 45 % (Klussmann et al., 2001). Im hier vorliegenden Kollektiv zeigt sich somit eine bemerkenswert niedrige HPV-Prävalenz, denn in anderen Studien wurde eine für das CUP-Syndrom im Vergleich zu anderen HNSCC höhere HPV-Prävalenz beschrieben (Desai et al., 2009;

Tribius et al., 2012), die sich im hier beschriebenen Kollektiv somit nicht zeigte. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei vielen Studien auch Patienten mit einem nachträglich gesicherten Primärtumor als CUP-Patienten aufgeführt werden, es sich bei den Studienkollektiven also nicht um wahre CUP-Populationen handelt (Tribius et al., 2012). Zudem differierten auch die Angaben der HPV-Prävalenz in solchen Fällen von 30 % (Begum et al., 2007) bis hin zu 80 % (Desai et al., 2009). Auch innerhalb einer großen Studie (Tribius et al., 2012) mit einer tatsächlichen CUP-Population zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede: So waren trotz gleicher Vorgehensweise 64 % der CUP-Patienten in Hamburg HPV-positiv, jedoch nur 40 % der CUP-Patienten in Kiel.

Interessanterweise zeigte sich in den Studien, die auch solche CUP-Fälle untersuchten, deren Primärtumor im Verlauf detektiert werden konnte, eine höhere HPV-Inzidenz dieser vermeintlichen CUP-Fälle als bei den verbliebenen wahren CUP-Patienten (Park et al., 2012; Yasui et al., 2014). Dies könnte bedeuten, dass die HPV-Inzidenz in unserem Kollektiv tatsächlich die im Vergleich zu Tumoren mit bekanntem Primarius niedrigere HPV-Inzidenz bei CUP-Fällen widerspiegelt und der Zusammenhang von CUP und HPV oftmals überschätzt wird.

Problematisch gestaltet sich beim Vergleich der Zahlen wie bereits erwähnt die Definition des Cancer of Unknown Primary bzw. die Unterteilung in Patienten mit einem, wenn auch erst im Verlauf, diagnostiziertem Primärtumor und sogenannten wahren CUP-Patienten, bei denen ein solcher Primärtumor zu keinem Zeitpunkt gefunden werden kann. Bei kritischer Betrachtung der Studien sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit, scheint eine höhere HPV-Prävalenz des Cancer of Unknown Primary im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich zu anderen HNSCC nicht sicher.

4.2 HPV-Status als Prognoseparameter

Im Rahmen der univariaten Überlebenszeitanalyse konnten wir eine signifikant bessere Überlebensrate der HPV-positiven Patienten im Vergleich zu den HPV-negativen Patienten feststellen (Log-Rank-Test, $p = .007$).

Dieser günstige Effekt einer HPV-Assoziation auf das Überleben wurde auch in weiteren Studien beschrieben (Mellin et al., 2000; Klussmann et al., 2004; Ang et al., 2010; Psyrri & Cohen, 2011; Boscolo-Rizzo et al., 2015).

Eine high-risk-HPV-Infektion begünstigt somit zwar die Genese eines Karzinoms (Münger et al., 2004), gleichzeitig geht ein so entstandenes Karzinom im Kopf-Hals-Bereich aber auch mit einer besseren Prognose nach der Therapie einher als bei vergleichbaren HPV-negativen Karzinomen. Diesbezüglich existieren mehrere Erklärungsansätze. Zum einen scheint die Bekämpfung des HPV-positiven Karzinoms durch Therapieansätze wie Radiatio und Chemotherapie effektiver als bei Karzinomen anderer Genese (Arenz et al., 2014; Ziemann et al., 2015), zum anderen scheint der Körper selbst über die Möglichkeit der Bekämpfung des virusinduzierten Tumors mittels immunologischer Reaktion zu verfügen (Wagner et al., 2016).

Ebenso wie bei anderen HNSCC lässt sich also auch beim zervikalen CUP mit HPV-Assoziation ein signifikant besseres Überleben zeigen. In unserem CUP-Kollektiv ergab sich wie oben beschrieben eine deutlich geringere HPV-Prävalenz als in vorangegangenen Studien aufgeführt. Dies könnte bedeuten, dass ein Zusammenhang von CUP und HPV-Infektion bis dato überschätzt wurde. Lag bei unserem CUP-Kollektiv jedoch eine HPV-Infektion vor, konnten wir ein overall survival von 100 % für diese Patienten zeigen. In der Konsequenz könnte sich hieraus ergeben, dass jene Patienten von einer Deeskalation der Therapie profitieren könnten.

4.3 **β -Catenin-Lokalisation in den Zellkompartimenten bei HPV-positiven Proben**

Bei 19 von 68 untersuchten Metastasen (27,9 %) konnte eine vorwiegend nukleäre Lokalisation des β -Catenins festgestellt werden, bei den restlichen 49 konnte das β -Catenin nur zytoplasmatisch oder membranär lokalisiert werden. Die nukleäre β -Catenin-Lokalisation korrelierte dabei signifikant mit einem positiven HPV-Status (Chi-Quadrat-Test, $p = .032$): 54,6 % der HPV-positiven Metastasen wiesen eine nukleäre Lokalisation des β -Catenins auf, dies war jedoch nur bei 22,8 % der HPV-negativen Metastasen der Fall. Auch in anderen Studien konnte eine Korrelation von β -Catenin und HPV-positiven HNSCC gezeigt werden (Rampias et al., 2013).

Eine Ansammlung von β -Catenin im Zellkern kann festgestellt werden, wenn sich das β -Catenin aus seinem Cadherin-Catenin-Komplex in der Zellwand löst, wo es eine Funktion als Verbindungsprotein ausübt (Lee et al., 2010). Im Rahmen einer HPV-Infektion wird dieser Vorgang durch die Aktivierung des EGFR vermittelt (Hu et al., 2015). Diese Beobachtung legt nahe, dass eine Ansammlung von β -Catenin im Zellkern mit einer verminderten Fähigkeit der Zelle, im Zellverband zu verbleiben, einhergeht

bzw. mit einem vermehrten infiltrativem Wachstum des Tumors und in der Konsequenz einer höheren Metastasierungsrate (Lee et al., 2006). Zwar konnten wir einen signifikanten Zusammenhang von nukleärer β -Catenin-Lokalisation und HPV-Infektion feststellen, jedoch keinen im Vergleich zu anderen HNSCC erhöhten Anteil HPV-positiver Tumoren, was die Vermutung unterstützt hätte, dass es durch eine HPV-Infektion eher zu einem Metastasierungsprozess und damit auch der Entstehung eines CUP kommt.

In dieser Arbeit konnte β -Catenin nicht als prognostischer Marker identifiziert werden, da seine Lokalisation im Zellkern in der univariaten Überlebenszeitanalyse nicht mit einem signifikanten Einfluss auf das Überleben einherging (Log-Rank-Test, $p = .582$). Von Bedeutung ist hierbei vielleicht auch die relativ geringe Größe des hier untersuchten Kollektivs, bedingt durch die Kriterien des wahren CUP mit seiner geringen Inzidenz von 2 % aller Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (Grau et al., 2000).

Hu et al. (2015) legen hingegen in ihrem Kollektiv von Patienten mit einem oropharyngealem Karzinom einen direkten Einfluss der β -Catenin-Lokalisation auf das Überleben nahe. Hier wurde ein in der univariaten Lebenszeitanalyse signifikant schlechteres Überleben bei höherer membranären Konzentrationen von β -Catenin beschrieben und β -Catenin somit als direkter prognostischer Marker identifiziert.

Auch Xu et al. (2013) konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine erhöhte β -Catenin-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. Eine erhöhte β -Catenin-Konzentration ging einher mit einem schlechteren Überleben. Zudem wurden signifikant höhere Konzentrationen von β -Catenin in solchen Tumoren gefunden, die Lymphknotenmetastasen verursacht hatten. Dies untermauert die Theorie, dass eine Anreicherung von β -Catenin in der Zelle mit einer Lösung der Zelle aus dem Zellverband und folgender Metastasierung einhergeht (Lee et al., 2006).

Rampias et al. (2013) untersuchten ebenfalls die β -Catenin-Konzentration in p16- und HPV-DNA-positiven Zellen (im hier vorliegenden Kollektiv als HPV-positiv bezeichnet). Hier konnte eine signifikant höhere Konzentration von β -Catenin in den p16-positiven Zellen festgestellt werden, jedoch ohne dass eine Aussage bezüglich des Überlebens getroffen wurde.

Pentheroudakis et al. (2014) gingen anhand ihres Kollektivs von Patienten mit CUP der Frage nach dem Einfluss einer Mutation des CTNNB1-Gens auf das Überleben nach. Eine Aktivierung dieses auf Chromosom 3p22 gelegenen Gens, das für das Protein β -Catenin kodiert, führt ebenso wie eine HPV-Infektion zu einer höheren Konzentration von β -Catenin. Jedoch konnte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen kein

statistischer Zusammenhang zwischen einer CTNNB1-Mutation – und somit erhöhter β -Catenin-Konzentration – und dem Überleben bei CUP-Patienten festgestellt werden.

Die drei zuerst genannten Arbeiten von Hu et al. (2015), Xu et al. (2013) und Rampias et al. (2013) setzten sich nicht mit der Lokalisation von β -Catenin in der Zelle speziell im Zusammenhang mit CUP auseinander. Lediglich das Kollektiv von Pentheroudakis et al. (2014) bestand ebenfalls aus CUP-Patienten, jedoch nicht nur aus solchen mit einem zervikalem Befund. Wahrscheinlich ist ein Grund dafür, dass es vergleichsweise wenige Studien gibt, in denen das Kollektiv aus Patienten mit einem zervikalen CUP besteht, da es sich hierbei um eine relativ seltene Entität handelt (Grau et al., 2000).

Eine multizentrische Studie, einhergehend mit einer größeren Fallzahl, könnte ggf. zu weiteren Erkenntnissen bzgl. der Rolle des β -Catenins beim Vorliegen eines CUP führen. Interessant wäre nicht nur weitere Untersuchungen seiner Funktion als prognostischer Marker, sondern im Falle eines signifikanten Zusammenhangs auch Untersuchungen, ob und inwiefern es als Angriffspunkt einer spezifischen Therapie dienen könnte.

Eine Zusammenfassung der hier erwähnten Studien ist in Tabelle 27 aufgelistet.

Tab. 27: Zusammenfassung von Studiendesign sowie Ergebnissen der Autoren Hu et al., Xu et al, Rampias et al., Pentheroudakis et al.

Autoren	Kollektiv	Methodik	Ergebnis
Hu et al. (2015)	n = 191 Patienten mit oropharyngealem Karzinom	IHC-Nachweis von β -Catenin mittels Antikörper + Immunfluoreszenzfärbung mittels primärem und sekundärem Antikörper	Signifikant schlechteres Überleben von Patienten mit hoher Konzentration von membranär lokalisiertem β -Catenin im Vergleich zu Patienten mit niedriger Konzentration von β -Catenin (p < .001)
Xu et al. (2013)	n = 148 Patienten mit oropharyngealem Karzinom	IHC-Nachweis von β -Catenin mittels Antikörper	Signifikant schlechteres Überleben bei Überexpression von β -Catenin (p = .005) Signifikant höhere Konzentration von β -Catenin in Karzinomen mit Lymphknoten-Metastasen (p < .001)
Rampias et al. (2013)	n = 102 Patienten mit HNSCC	IHC-Nachweis von β -Catenin mittels Antikörper	Signifikant höhere Konzentration von β -Catenin in p16/HPV-positiven Zellen (p = .07) Signifikant besseres Überleben bei Patienten mit p16+/HPV+ Tumoren (p = .001)
Pentheroudakis et al. (2014)	n = 87 Patienten mit CUP	Nachweis des für β -Catenin codierenden CTNNB1-Gens mittels PCR	Kein signifikanter Einfluss einer Aktivierung des CTNNB1-Gens auf das Überleben (p = .46)

4.4 Zervikales CUP und prognostische Faktoren

Ein statistisch signifikant schlechteres Überleben konnte in diesem Kollektiv nicht nur für HPV-negative Tumoren festgestellt werden, sondern auch für weitere Faktoren, wie z. B. einen vorangegangenen oder bestehenden Alkoholabusus sowie einen schlechteren Performance- bzw. ECOG-Status zum Zeitpunkt der Diagnose. Diese Faktoren hatten auch Einfluss auf die Compliance der Patienten bzw. die angebotenen Therapieoptionen bei z. B. vorliegender Korsakow-Demenz. Entscheidenden Einfluss auf die Überlebenszeit hatte die zum Diagnosezeitpunkt vorliegende N-Kategorie (Log-Rank-Test, $p < .001$ im gesamten Kollektiv bzw. $p = .015$ im HPV-negativen Kollektiv), was auch in anderen Studien beschrieben wurde (Grau et al., 2000; Beldi et al., 2007). Ebenso hatte die Therapie signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. Zwar gibt es keine einheitliche Therapieempfehlung für das zervikale CUP (Guntinas-Lichius et al., 2006), jedoch gehen die Ergebnisse der Arbeit, dass die Neck Dissection diejenige Therapieform darstellt, die signifikant mit einem besseren Überleben korreliert (Log-Rank-Test, $p < .001$), mit den evidenzbasierten Empfehlungen der French National Federation of Cancer Centers konform (Bugat et al., 2003). Auch die Leitlinien des National Comprehensive Cancer Networks (NCCN) empfehlen je nach N-Kategorie eine primäre Neck Dissection (N1) oder primäre Radiochemotherapie ($\geq N2$) mit folgender Neck Dissection bei Vorliegen eines Tumorresiduums. Eine ergänzende Radiotherapie hatte in unserem Kollektiv keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit der CUP-Patienten (Log-Rank-Test, $p = .253$ im gesamten Kollektiv bzw. $p = .178$ im HPV-negativen Kollektiv). Es ist im Sinne sogenannter „selection bias“ denkbar, dass nur solche Patienten eine Radiotherapie erhielten, deren Krankheit weiter fortgeschritten war, was naturgemäß mit einem schlechteren Überleben einhergeht. Zum anderen stellten zwar schon Grau et al. (2000) in ihrer mit 325 Patienten größten Studie fest, dass sich eine Radiotherapie positiv auf die Überlebenszeit auswirkt, was in einer neueren Studie bestätigt wurde (Beldi et al., 2007), andere Studien können dieses Ergebnis jedoch nicht belegen, sodass bis heute keine konkrete Aussage bzgl. des Nutzens einer Radiotherapie in Kombination mit einer Neck Dissection getroffen werden oder gar eine konkrete Empfehlung hierzu gegeben werden kann (Gani et al., 2013; Zhuang et al., 2014). Auch hier gestalten sich Studien problematisch. Dies liegt an der relativ geringen Fallzahl und der somit begrenzten Möglichkeit, die Therapie anhand von Kollektiven mit möglichst ähnlichen Krankheitsmerkmalen durchzuführen. Dies wäre jedoch nötig, um Verzerrungen

entgegenzuwirken. Wie schon erwähnt, wird laut Leitlinie des National Comprehensive Cancer Network (NCCN) eine Radiochemotherapie nur bei fortgeschrittenen Erkrankungen ($\geq N2$) empfohlen. Eine Radiotherapie alleine wird zwar als Alternative für Tumoren mit der N-Kategorie N1 in den Leitlinien aufgeführt, jedoch sei die Neck Dissection zu bevorzugen.

Im Rahmen dieser Arbeit und unter Berücksichtigung der Gesamtheit multipler biometrischer Daten sowie Informationen zum Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose und Therapie konnten nicht nur bekannte Risikofaktoren für CUP bestätigt und neue identifiziert, sondern auch ihre Bedeutsamkeit bewertet werden.

Als wichtigster Risikofaktor im Gesamtkollektiv stellte sich die HPV-Infektion (Log-Rank-Test, $p < .001$, overall survival 100 %) heraus. Die drei weiteren wichtigsten Risikofaktoren waren in absteigender Reihenfolge: Das Vorliegen von Fernmetastasen (Hazard Ratio 4.805, $p < .001$), die Komorbidität, d. h. der ECOG-Status (Hazard Ratio 4.124, $p < .001$), sowie das Vorliegen einer Leukozytose (Hazard Ratio 4.019, $p < .001$).

Diese drei Risikofaktoren stellten auch die wichtigsten Risikofaktoren im HPV-negativen Kollektiv dar, wobei sich die Reihenfolge hier unterschied: An erster Stelle stand das Vorliegen einer Leukozytose (Hazard Ratio 5.048, $p < .001$), an zweiter Stelle das Vorliegen von Fernmetastasen (Hazard Ratio 3.639, $p = .008$), an dritter die Komorbidität (Hazard Ratio 2.751, $p = .007$).

Die hier gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten anderer Autoren überein. Dass das Vorliegen einer Leukozytose, d. h. die Inflammation, als negativer prognostischer Marker bei CUP dient, zeigen bspw. auch die Arbeiten von Mohamed et al. (2014) sowie Petrakis et al. (2013). Letzterer beschreibt in seiner Arbeit auch den ECOG-Status als unabhängigen Risikofaktor (Petrakis et al., 2013), ebenso wie die Arbeitsgruppe um Trivanovic (Trivanovic et al., 2009). Auch das Vorliegen von Fernmetastasen bei CUP korreliert nicht nur in der hier vorliegenden Arbeit signifikant mit einem schlechteren Überleben. In der Arbeit von Su et al. (2016) zeigt sich das Vorliegen weiterer Metastasen ebenfalls als unabhängiger Risikofaktor bei CUP im Kopf-Hals-Bereich.

Da das overall survival der HPV-positiven Patienten bei 100 % lag, ließen sich hier keine Risikofaktoren ausmachen. Bei diesem relativ kleinen Studienkollektiv (11 HPV-positive Patienten) wäre durchaus denkbar, dass es hier zu Verzerrungen gekommen ist und bei einem größeren Kollektiv kein so eindeutig besseres overall survival zu verzeichnen wäre. Jedoch zeigen auch Arbeiten mit einem größeren Kollektiv ein

signifikant besseres Überleben für HPV-positive Fälle. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bspw. 80 % vs. 36,7 % bei Sivars et al. (2014) und die 3 Jahres-Überlebensrate bei HPV-positiven vs. HPV-negativen oropharyngealen Tumoren liegt bei Ang et al. (2010) bei 82,4 % vs. 57,1 %. Dies bestätigt zum einen, dass es sich bei dem HPV-Status um einen relevanten Prognosefaktor zu handeln scheint und lässt zum anderen den Schluss zu, dass eine Arbeit mit einem größeren Kollektiv und dementsprechend auch mehr HPV-positiven Fällen in Zukunft wünschenswert wäre, um eine Untersuchung bzgl. prognostischer Faktoren im HPV-positiven Kollektiv zu ermöglichen, sofern das Survival dann nicht wie in diesem Fall bei 100 % liegt.

Eine weitere Überprüfung der hier gewonnenen Ergebnisse erscheint von besonderer Bedeutung in Hinblick auf die bestmögliche Therapie bei Patienten mit CUP nicht nur in Abhängigkeit von den hier dargestellten Risikofaktoren, sondern ggf. auch in Abhängigkeit vom HPV-Status zum Zeitpunkt der Diagnose. Die HPV-Status-Bestimmung als Teil des Stagings bei CUP-Patienten könnte für einen Teil der Patienten, nämlich jene mit einem HPV-positiven Status, sollten sich die hier gewonnenen Erkenntnisse erhärten lassen, eine Änderung des Therapieregimes bedeuten. Bei Deeskalation der Therapie könnten den Patienten somit eventuelle Nebenwirkungen oder Komplikationen wie bspw. eine Strahlendermatitis bei Radiatio erspart bleiben. Dies wiederum würde nicht nur die Lebensqualität des Patienten positiv beeinflussen, sondern könnte auch unter gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten relevant sein.

5. Zusammenfassung

Als gesicherter günstiger Prognosefaktor beim Vorliegen eines zervikalen Cancer of Unknown Primary (CUP) gilt die Assoziation mit einer Infektion durch Humane Papillomaviren (HPV). Eine solche Infektion führt u. a. zu einer Migration des sich normalerweise in der Zellwand befindlichen β -Catenins in den Zellkern, wo dieses als Coaktivator für Transkriptionsfaktoren fungiert, sodass es zu Zellwachstum kommt. In dieser Arbeit wurden die wichtigsten Prognosefaktoren untersucht, da über diese bis jetzt nur wenig bekannt ist. Zudem wurde untersucht, ob und inwiefern β -Catenin beim zervikalen CUP als prognostischer Faktor dienen kann, da dieses als EMT-Marker in Zusammenhang mit der Metastasierung, die bei allen Patienten mit CUP-Syndrom gegeben ist, von Bedeutung ist.

Es konnte auf die Daten von 82 Patienten, die im Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS) erfasst worden waren, zugegriffen werden. Anhand dieser Daten wurde eine IBM-SPSS-Datei erstellt, in die aus den Patientenakten extrahierte Risikofaktoren eingetragen wurden. Es wurden zudem 68 formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben (FFPE) auf das Vorliegen einer aktiven HPV-Infektion sowie der Lokalisation des β -Catenins im Zellkern untersucht. Darauf folgte die statistische Auswertung einzelner Prognoseparameter, insbesondere der Einfluss einer HPV-Infektion sowie der β -Catenin-Lokalisation in der Zelle, mittels univariater sowie multivariater Überlebenszeitanalysen.

11 von 68 (16,2 %) der CUP-Patienten wiesen eine HPV-Assoziation auf. Diese ging verglichen mit HPV-negativen Patienten mit einer signifikant längeren Überlebenszeit (Log-Rank-Test, $p < .001$) einher und stellte den bedeutendsten Prognosefaktor dar. Eine nukleäre Lokalisation von β -Catenin korrelierte dabei signifikant mit einem positiven HPV-Status (Log-Rank-Test, $p = .032$). Ein statistisch signifikanter Einfluss von β -Catenin auf das Überleben und somit eine Funktion als prognostischer Marker konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden (Log-Rank-Test, $p = .582$). Es konnten jedoch für das verbliebene Kollektiv weitere signifikante prognostische Faktoren in folgender Reihenfolge, absteigend nach ihrer Hazard Ratio, ermittelt werden: Leukozytose (HR 5.048, $p < .001$), Fernmetastasierung (HR 3.639, $p = .008$), hoher ECOG-Status (HR 2.751, $p = .007$), hohe N-Kategorie (HR 2.636, $p = .020$) sowie Therapie mittels Neck Dissection (HR .143, $p < .001$). Somit konnten auch für HPV-negative Karzinome simple, jedoch statistisch hoch signifikante prognostische Faktoren ermittelt werden.

6. Summary

It is well-known that a human papilloma virus (HPV) infection plays an important role in the prognosis of cervical cancer of unknown primary (CUP). Such an infection amongst other things leads to a migration of β -catenin from its usual position in the cell wall to the cell core, where it functions as a transcription factor. This subsequently induces cell growth. In this study we analyzed if and how β -catenin could function as a prognostic factor in cervical CUP. In addition we investigated what other factors operate as important prognostic parameters, since only little is known about those so far. We had access to the information of 82 patients that were registered in the Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS). Based on these data an IBM-SPSS-file was created, consisting of risk factors that were extracted from the patient files. In addition 68 formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples (FFPE) were tested for the presence of an active HPV infection. Following that a classification into HPV-positive was performed when there was proof of both HPV-DNA via luminex-PCR and p16 via immunohistochemical (IHC)-staining (p16^{INK4A} protein antibody, CINtec[®]). Afterwards the FFPEs were tested for the localization of β -catenin within the cell via IHC-staining. A classification into nuclear localization and non-nuclear localization of β -catenin was performed. We then conducted a statistical analysis of prognostic parameters, the influence of HPV-infection and β -catenin localization within the cell, via univariate and multivariate survival analysis.

11 of the 68 CUP patients (16,2 %) showed a HPV-association. This came along with a significantly longer survival compared to the HPV-negative patients (log-rank-test, $p < .001$). A nuclear localization of β -catenin correlated significantly with a positive HPV-status (log-rank-test, $p = .032$). We were not able to show a statistically significant impact of β -catenin on survival and we therefore couldn't identify β -catenin as a prognostic marker in this study (log-rank-test, $p = .582$). However we could spot other statistically significant factors for a good prognosis, such as leukocytosis (HR 5.048, $p < .001$), distant metastasis (HR 3.639, $p = .008$), high ECOG-status (HR 2.751, $p = .007$), high N-category (HR 2.636, $p = .020$) and therapy with neck dissection (HR .143, $p < .001$). Therefore it was possible to identify simple yet statistically very significant prognostic factors for HPV-negative carcinomas.

7. Abkürzungsverzeichnis

APC-Gen	Adenomatous Polyposis Coli-Gen
BDI	Bund Deutscher Internisten
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CDK	Cyclinabhängige Kinase
CKII	Casein-Kinase II
CRP	C-reaktives Protein
CUP	Karzinommetastasen bei unbekanntem Primärtumor (engl. Cancer of Unknown Primary)
Dnmt1	DNA-Methyltransferase 1
Dsh	Phosphoprotein Dishevelled
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. Epidermal growth factor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
E-Region	Early-Region
ESMO	European Society for Medical Oncology
EtOH	Ethanol
FDG-PET/CT	¹⁸ F-Fluoro-2-Deoxyglucose Positronen-Emissions-Tomographie /Computer-Tomographie
FFPE Gewebe	Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe
FNCLCC	French National Federation of Cancer Centres
Fz-Rezeptor	Frizzled-Rezeptor

7. Abkürzungsverzeichnis

GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HNSCC	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (engl. Head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
KI	Konfidenzintervall
LK	Lymphknoten
L-Region	Late-Region
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NICE	National Institute for Health and Clinical Excellence
OT	Objektträger
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pRb	Retinoblastomprotein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Ser/Thr	Serin/Threonin
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween
TCF/LEF1	T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor-1
TRS	Target Retrieval Solution
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (frz. Union internationale contre le cancer)

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomische Darstellung der zervikalen Lymphknotenregionen (Level I bis VI).....	6
Abb. 2: Zellzyklus.....	11
Abb. 3: Lebenszyklus des humanen Papillomavirus (HPV).....	14
Abb. 4: β -Catenin als Strukturprotein.....	17
Abb. 5: Wnt-Signalweg.....	20
Abb. 6: Altersverteilung innerhalb des Patientenkollektivs.....	26
Abb. 7: N-Kategorie bei Diagnose:.....	28
Abb. 8: PCR.....	35
Abb. 9: HPV-Status:.....	42
Abb. 10: Anzahl der HPV-pos./neg./“unbekannten“ Metastasen (n=68):.....	43
Abb. 11: Anzahl der Diagnosen (n=68):.....	44
Abb. 12: Inzidenz HPV-DNA-positiver Patienten (n=16):.....	44
Abb. 13: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom HPV-Status (Kaplan-Meier-Graph)....	46
Abb. 14: Histologisches Bilder der Anfärbung von β -Catenin mittels IHC.....	47
Abb. 15: Histologisches Bild β -Catenin-Immunfluoreszenz-Färbung (40x).....	48
Abb. 16: Histologisches Bild β -Catenin-Immunfluoreszenz-Färbung (100x).....	49
Abb. 17: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der β -Catenin-Lokalisation bei HPV-Status-negativem CUP (Kaplan-Meier-Graph).....	51
Abb. 18: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der β -Catenin-Lokalisation bei CUP (Kaplan-Meier-Graph).....	52
Abb. 19: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Leukozytenwerten (Kaplan-Meier-Graph).....	54
Abb. 20: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den CRP-Werten (Kaplan-Meier Graph).....	55
Abb. 21: Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Hb-Werten (Kaplan-Meier-Graph).....	58
Abb. 22: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Geschlecht (Kaplan-Meier-Graph)....	60
Abb. 23: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alkoholabusus (Kaplan-Meier-Graph).....	61

Abb. 24: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der N-Kategorie (Kaplan-Meier-Graph).	62
Abb. 25: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Therapie (Kaplan-Meier-Graph). ...	64
Abb. 26: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasierung und Therapie (Kaplan-Meier-Graph).....	66

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: N-Kategorie nach UICC (7. Aufl., 2010).....	3
Tab. 2: CUP-Klassifikation nach NICE-guidelines (2010).....	4
Tab. 3: CUP-Klassifikation nach ICD-10 (2013).....	4
Tab. 4: Grading nach UICC (7. Aufl., 2010).....	4
Tab. 5: Arbeiten zu Cancer of Unknown Primary und Humanes Papillomavirus.....	15
Tab. 6: BMI, ECOG, Nikotinkonsum, Alkoholabusus (n=82).....	27
Tab. 7: Laborparameter.	29
Tab. 8: Häufigkeitsverteilung von Therapieverfahren (n=82).....	30
Tab. 9: Prognoseparameter Rezidiv.....	31
Tab. 10: Mastermix.....	34
Tab. 11: PCR-Programm.	34
Tab. 12: Einfluss des HPV-Status auf die mediane Überlebenszeit und 5 Jahres Überlebensrate.	45
Tab. 13: β -Catenin-Lokalisation in Abhängigkeit vom HPV-Status.....	50
Tab. 14: Einfluss der Leukozytenwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5 Jahres-Überlebensrate.	54
Tab. 15: Einfluss der CRP-Werte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5 Jahres-Überlebensrate.....	55
Tab. 16: Einfluss der Erythrozytenwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5 Jahres-Überlebensrate.	56
Tab. 17: Einfluss der Hämoglobinwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5 Jahres-Überlebensrate.	58
Tab. 18: Einfluss der Hämatokritwerte bei Diagnose auf die mediane Überlebenszeit sowie die 5 Jahres-Überlebensrate.	59
Tab. 19: Charakteristika der Patienten mit Neck Dissection.....	65
Tab. 20: Prognostische Faktoren bei CUP.....	67
Tab. 21: Prognostische Faktoren bei HPV-Status-negativem CUP.....	68
Tab. 22: Hazard Ratio der prognostischen Faktoren bei CUP.....	69
Tab. 23: Hazard Ratio der prognostischen Faktoren bei HPV-Status-negativem CUP. 70	
Tab. 24: Verteilung der prognostischen Parameter nach HPV-Status.....	71
Tab. 25: Multivariate Analyse.	72

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 26: Neck Dissection und ECOG-Status mit und ohne Interaktionsterm.	73
Tab. 27: Zusammenfassung von Studiendesign sowie Ergebnissen der Autoren Hu et al, Xu et al, Rampias et al, Pentheroudakis et al.	80

10. Literaturverzeichnis

Abbruzzese, J., Abbruzzese, M., Lenzi, R., Hess, K., & Raber, M. (1995):
Analysis of a Diagnostic Strategy for Patients With Suspected Tumors of Unknown Origin. *J Clin Oncol* (13), 2094-2103.

Adams, J., & O'Brien, C. (2002):
Unknown Primary Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Review of Diagnosis, Treatment and Outcomes. *Asian Journal of Surgery* (25), 188-193.

Akhter, M., Hossain, S., Rahman, Q., & Molla, M. (2011):
A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its corelationship with regional metastasis. *Journal of Oral an Maxillofacial Pathology* (15), 168-176.

Alani, RM, & Münger, K. (1998):
Human Papillomavirus and Associated Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* (16), 330-337.

Altman, E., & Cadman, E. (1986):
An analysis of 1539 patients with cancer of unknown primary site. (57), 120-124.

Ang, K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D., Nguyen-Tan, et al. (2010):
Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine* (363), 24-35.

Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., et al. (2014):
Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol* (190), 839-846.

Barker, C., Morris, C., & Mendenhall, W. (2005):
Larynx-Sparing Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma From an Unknown Head and Neck Primary Site. *American Journal of Clinical Oncology* (28), 445-448.

Bechtold, V., Beard, P., & Raj, K. (2003):
Human Papillomavirus Type 16 E2 Protein Has No Effect on Transcription from Episomal Viral DNA. *Journal of Virology* (77), 2021-2028.

Begum, S., Gillison, M., Nicol, T., & Westra, W. (2007):
Detection of Human Papillomavirus-16 in Fine-Needle Aspirates to Determine Tumor Origin in Patients with Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* (13), 1186-1191.

Behrens, J., von Kries, J., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., et al. (1996):
Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* (382), 638-642.

Bei, R., Budillon, A., Masuelli, L., Cereda, V., Vitolo, D., Di Gennaro, E., et al. (2004):

Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *Journal of Pathology* (204), 317-325.

Bek, S., & Kemler, R. (2002):

Protein kinase CKII regulates the interaction of β -catenin with α -catenin and its protein stability. *Journal of Cell Science* (115), 4743-4753.

Beldi, D., Jereczek-Fossa, B., D'Onofrio, A., Gambaro, G., Fiore, M., Pia, F., et al. (2007):

Role of Radiotherapy in the Treatment of Cervical Lymph Node Metastases from an Unknown Primary Site: Retrospective Analysis of 113 Patients. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* (69), 1051-1058.

Bhanot, P., Brink, M., Harryman Samos, C., Hsieh, J.-C., Wand, Y., Macke, J., et al. (1996):

A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* (382), 225-230.

Bohlius, J., Wilson, J., Seidenfeld, J., Piper, M., Schwarzer, G., Sandercock, J., et al. (2006):

Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patient. *J Natl Cancer Inst* (98), 708-714.

Boscolo-Rizzo, P.; Schroeder, L., Romeo, S.; Pawlita, M. (2015):

The prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of unknown primary site metastatic to neck lymph nodes: a systematic review. *Clin Exp Metastasis* (32), 835-845.

Boyer, S., Wazer, D., & Band, V. (1996):

E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer Res* (56), 4620-4624.

Briasoulis, E., Tolis, C., Bergh, J., & Pavlidis, N. (2005):

ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of cancer of unknown primary site (CUP). *Annals of Oncology* (16), i75-i76.

Bubus (06.07.2013):

Wikipedia, β -Catenin. Abgerufen am 01. 07 2015 von <https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-catenin#/media/File:Beta-catenin-moonlighting.png>

Bugat, R., Bataillard, A., Lesimple, T., Voigt, J., Culine, S., Lortholary, A., et al. (2003):

Summary of the Standards, Options and Recommendations for the management of patients with carcinoma of unknown primary site (2002). *British Journal of Cancer* (89), 59-66.

Burdsal, C., Damsky, C., & Pedersen, R. (1993).

The role of E-cadherine and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* (118), 829-844.

Burgess, A. (2008):

EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* (26), 263-274.

Bussiere, D., Kong, X., Egan, D., Walter, K., Holzman, T., Lindh, F., et al. (1989):

Structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus serotype 31 at 2.4 Å. *Biol Crystallogr* (54), 1367-1376.

Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. (1996):

Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Research* (56), 2488-2492.

Chellappan, S., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J., & Nevins, J. (1991):

The E2F Transcription Factor Is a Cellular Target for the RB Protein. *Cell* (65), 1053-1061.

Chen, S., Tsao, Y., Lee, J., Sheu, W., & Liu, Y. (1993):

Characterization and analysis of human papillomavirus of skin warts. *Arch Dermatol Res* (285), 460-465.

Clevers, H., & Nusse, R. (2012):

Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* (149), 1192-1205.

Clevers, H., & van de Wetering, M. (1997):

TCF/LEF factors earn their wings. *TIG* (13), 485-489.

Cole, S., & Danos, O. (1987):

Nucleotide Sequence and Comparative Analysis of the Human Papillomavirus Type 18 Genome. *Journal of Molecular Biology* (193), 599-608.

Culine, S. (2009):

Prognostic factors in unknown primary cancer. *Semin Oncol* (36), 60-64.

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

Glucocorticoid-Enhanced Neoplastic Transformation of Human Keratinocytes by Human Papillomavirus Type 16 and an Activated ras Oncogene. *Virology* (173), 767-771.

Day, P., Baker, C., Lowy, D., & Schiller, J. (2004):

Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proceedings of the National Academy of Science* (101), 14252-14257.

Day, P., Lowy, D., & Schiller, J. (2003):

Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* (307), 1-11.

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004):

Classification of papillomaviruses. *Virology* (324), 17-27.

DeCaprio, J., Ludlow, J., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., et al. (1989):

The Product of the Retinoblastoma Susceptibility Gene Has Properties of a Cell Cycle Regulatory Element. *Cell* (58), 1085-1095.

Desai, P., Jaglal, M., Gopal, P., Ghim, S.-J., Miller, D., Farghaly, H., et al. (2009):

Human papillomavirus in metastatic squamous carcinoma from unknown primary in the head and neck: A retrospective 7 year study. *Experimental and Molecular Pathology* (87), 94-98.

Doorbar, J. (2006):

Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* (110), 525-541.

Doorbar, J. (2013):

The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* (445), 80-98.

Drenckhahn, D. (2008):

Zellenlehre. In D. Benninghoff, *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* (Bd. 17., S. 28). München: Elsevier.

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

The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to Retinoblastoma Gene Product. *Science* (243), 934-937.

Enzoklop (05.04.2014):

Wikipedia, PCR. Abgerufen am 01. 07 2015 von https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#media/File:Polymerase_chain_reaction.svg

Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., et al. (2006):

Signaling via ErbB2 and ErbB3 Associates with Resistance and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplification with Sensitivity to EGFR Inhibitor Gefitinib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research* (12), 4203-4111.

Fencl, P., Belohlavek, O., Skopalova, M., Jaruskova, M., Kantorova, I., & Simonova, K. (2007):

Prognostic and diagnostic accuracy of [18F]FDG-PET/CT in 190 patients with carcinoma of unknown primary. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (34), 1783-1792.

Ferté, C., Penel, N., Bonnetterre, J., & Adenis, A. (2010):

Individual Life Expectancy Estimation Using Validated Prognostic Scores for Patients with Cancer of Unknown Primary. *Oncology* (78), 87-93.

Fisch, Sabine (2009):

Tumoranämie - Vielfache Ursachen möglich. *Österreichische Ärztezeitung* (11).

Fleming, A., Smith, S., Paul, C., Hall, N., Daly, B., Agrawal, A., et al. (2007):

Impact of [18F]-2-Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography/Computed Tomography on Previously Untreated Head and Neck Cancer Patients. *The Laryngoscope* (117), 1173-1179.

Foord, S., Bonner, T., Neubig, R., Rosser, E., Pin, J.-P., Davenport, A., et al. (2005):

International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacological Reviews* (57), 279-288.

Gani, C., Eckert, F., Müller, A.-C., Mauz, P.-S., Thiericke, J., Bamberg, M., et al. (2013):

Cervical Squamous Cell Lymph Node Metastases from an Unknown Primary Site: Survival and Patterns of Recurrence after Radiotherapy. *Clinical Medicine Insights: Oncology* (7), 173-180.

Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P., et al. (2003):

Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* (63), 2658-2664.

Gilles, C., Polette, M., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., Volders, L., Foidart, J.-M., et al. (1999):

Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *Journal of Cell Science* (112), 4615-4625.

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

Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* (92), 709-720

Grana, X., & Reddy, E. (1995):

Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* (11), 211-219.

Grau, C., Johansen, L., Jakobsen, J., Geertsen, P., Andersen, E., & Jensen, B. (2000):

Cervical lymph node metastases from unknown primary tumours: Results from a national survey by the Danish Society for Head and Neck Oncology. *Radiotherapy & Oncology* (55), 121-129.

Greco, F. (2013):

Cancer of Unknown Primary Site: Improved Patient Management with Molecular and Immunohistochemical Diagnosis. (A. A. faculty, Hrsg.) *ASCO Educational Book* , 175-181.

Grossman, S., & Laimins, L. (1989):

E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* (9), 1089-1093.

Guntinas-Lichius, O., Klusmann, J., Dinh, S., Dinh, M., Schmidt, M., Semrau, R., et al. (2006):

Diagnostic work-up and outcome of cervical metastases from an unknown primary. *Acta Oto-Laryngologica* (126), 536-544.

Hübner, G. (12.05.2005):

ONKODIN: *Onkologie, Hämatologie - Daten und Informationen*. Abgerufen am 01.07.2015 von www.onkodin.de/e2/e30015/e30499/

Hershko, A., & Ciechanover, A. (1992):

The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* (61), 761-807.

Hoffmann, T., Arsov, C., Schirlau, K., Bas, M., Friebe-Hoffmann, U., Klusmann, J., et al. (2006):

T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer* (118), 1984-1991.

Hoste, G., Vossaert, K., & Poppe, W. (2013):

The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. *Obstetrics and Gynecology International* (Artikel ID 610373), 7 Seiten.

Hu, Z., Müller, S., Qian, G., Xu, J., Kim, S., Chen, Z., et al. (2015):

Human Papillomavirus 16 Oncoprotein Regulates the Translocation of β -Catenin via the Activation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer* (121), 214-225.

Hubbert, N., Sedman, S., & Schiller, J. (1992):

Human Papillomavirus Type 16 E6 Increases the Degradation Rate of p53 in Human Keratinocytes. *Journal of Virology* (66), 6237-6241.

Huibregtse, J., Scheffner, M., & Howley, P. (1993):

Localization of the E6-AP Regions That Direct Human Papillomavirus E6 Binding, Association with p53, and Ubiquitination of Associated Proteins. *Molecular and Cellular Biology* (13), 4918-4927.

National Center for Biotechnology Information (12.09.2017):

NCBI, Catenin. Abgerufen am 17.09.2017 von www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499

National Center for Biotechnology Information (10.09.2017):

NCBI, CRP. Abgerufen am 17.09.2017 von www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1401

National Center for Biotechnology Information (10.09.2017):

NCBI, Cyclin D1. Abgerufen am 17.09.2017 von www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/595

National Center for Biotechnology Information (10.09.2017):

NCBI, EGF. Abgerufen am 17.09.2017 von www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1950

- Jereczek-Fossa, B., Jassem, J., & Orecchia, R. (2004):**
Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary. *Cancer Treatment Reviews* (30), 153-164.
- Kanai, Y., Ochiai, A., Shibata, T., Oyama, T., Ushijima, S., Akimoto, S., et al. (1995):**
c-erbB-2 Gene Product Directly Associates with β -Catenin and Plakoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (208), 1067-1072.
- Karsai, S., Abel, U., Roesch-Ely, M., Affolter, A., Hofele, C., Joos, S., et al. (2007):**
Comparison of p16INK4a, expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. *Journal of Pathology* (211), 314-322.
- Keilholz, U. (10.09.2013).**
Deutsche Krebsgesellschaft. Abgerufen am 01.08.2015 von <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/definition-und-haeufigkeit.html>
- Kessis, T., Slebos, R., Nelson, W., Kastan, M., Plunkett, B., Han, S., et al. (1993):**
Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* (90), 3988-3992.
- Klussmann, J., Dinh, S., Guntinas-Lichius, O., Wittekindt, C., Weißenborn, C., Wieland, U., et al. (2004):**
HPV-assoziierte Tonsillenkarzinome. *HNO* (52), 208-218.
- Klussmann, J., Weissenborn, S., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., et al. (2001):**
Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* (92), 2875-2884.
- Ko, L., & Prives, C. (1996):**
p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development* (10), 1054-1072.
- Krämer, A., Hübner, G., Schneeweiss, A., Folprecht, G., & Neben, K. (2008):**
Carcinoma of Unknown Primary - an Orphan Disease? *Breast Care* (3), 164-170.
- Kreimer, A., Clifford, G., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005):**
Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (14), 467-475.
- Krementz, E., Cerise, E., Foster, D., & Jr., M. L. (1979):**
Metastases of undetermined source. *Curr Probl Cancer* (4(5):4), 4-37.
- Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K., & Raj, K. (2010):**
Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* (31), 918-926.

Lechner, M., & Laimins, L. (1994):

Inhibition of p53 DNA Binding by Human Papillomavirus E6 Proteins. (68), 4262-4273.

Lee, C.-H., Hung, H.-W., Hung, P.-H., & Shieh, Y.-S. (2010):

Epidermal growth factor receptor regulates β -catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Molecular Cancer* (64), 12 Seiten.

Lee, J., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. (2006):

The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology* (172), 973-981.

Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., & Matlashewski, G. (1992):

The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* (7), 19-25.

Levi, F., Te, V.-C., Erler, G., Randimbison, L., & La Vecchia, C. (2002):

Epidemiology of unknown primary tumours. *European Journal of Cancer* (38), 1810-1812.

Li, J., Poi, M., & Tsai, M.-D. (2011):

The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor p16INK4A and Relevance to Cancer. *Biochemistry* (50), 5566-5582.

Lindel, K., Beer, K., Laissue, J., Greiner, R., & Aebersold, D. (2001):

Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* (92), 805-813.

Lizano, M., Berumen, J., & A, G.-C. (2009):

HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. *Archives of Medical Research* (40), 428-434.

Logan, C., & Nusse, R. (2004):

The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* (20), 781-810.

Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K., Hayakawa, H., Nguyen, C., Owens, M., et al. (2004):

Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology* (78), 11451-11460.

Münger, K., Werness, B., Dyson, N., Phelps, W., Harlow, E., & Howley, P. (1989):

Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal* (13), 4099-4105.

McBride, A., Byrne, J., & Howley, P. (1989):

E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: Transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* (86), 510-514.

McKaig, R., Baric, R., & Olshan, A. (1998):

Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: Epidemiology and Molecular Biology. *Head Neck* (20), 250-265.

Mellin, H., Friesland, S., Lewensohn, R., Dalianis, T., & Munck-Wikland, E. (2000):

Human Papillomavirus (HPV) DNA in Tonsillar Cancer: Clinical Correlates, Risk of Relapse, and Survival. *Int J Cancer* (89), 300-304.

Mendenhall, W., Mancuso, A., Amdur, R., Stringer, S., Villaret, D., & Cassisi, N. (2001):

Squamous Cell Carcinoma Metastatic to the Neck from an Unknown Head and Neck Primary Site. *American Journal of Otolaryngology* (22), 261-267.

Mendenhall, W., Million, R., & Cassisi, N. (1986):

Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck treated with Radiation Therapy: The role of Neck Dissection for clinically positive neck nodes. *Int. J. Radiation Oncology* (12), 733-740.

Mohamed, Z., Pinato, D., Mauri, F., Chen, K.-W., Chang, P., Sharma, R. (2014):

Inflammation as a validated prognostic determinant in carcinoma of unknown primary site. *British Journal of Cancer* (110), 208-213.

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., et al. (1996):

XTcf-3 Transcription Factor Mediates β -Catenin-Induced Axis Formation in Xenopus Embryos. *Cell* (86), 391-399.

Neben, K., Hübner, G., Folprecht, G., Jäger, D., & Krämer, A. (2008):

Metastasen ohne Primärtumor. *Deutsches Ärzteblatt* (43), 733-740.

Northcott, C., Florian, J., Dorrance, A., & Watts, S. (2001):

Arterial Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension. *Hypertension* (38), 1337-1341.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., et al. (2002):

Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* (110), 775-787.

Osborne, R. (03/04.2011):

Cancer of Unknown Primary Foundation. Abgerufen am 01.07.2015 von www.cupfoundjo.org/wp-content/uploads/2013/12/Richard_Osborne_Oncology.pdf

Palmeri, S., Lorusso, V., Palmeri, L., Vaglica, M., Porta, C., Nortilli, R., et al. (2006):

Cisplatin and Gemcitabine With Either Vinorelbin or Paclitaxel in the Treatment of Carcinomas of Unknown Primary Site. *CANCER* (107), 2898-2905.

Park, G., Lee, M., Roh, J.-L., Yu, MS, Choi, S.-H., et al. (2012):
Human papillomavirus and p16 detection in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor. *Oral Oncology* (48), 1250-1256.

Park, J., Yim, J.-J., WJ, K., Chung, J.-K., Yoo, C.-G., Kim, Y., et al. (2011):
Detection of primary sites in unknown primary tumors using FDG-PET or FDG-PET/CT. *BMC Research Notes* (4), 56-62.

Pavlidis, N. & Pentheroudakis, G. (2012):
Cancer of unknown primary site. *Lancet* (379), 1428-1435

Pavlidis, N., & K, F. (2009):
Carcinoma of unknown primary (CUP). *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (69), 271-278.

Pavlidis, N., Briasoulis, E., Hainsworth, J., & FA, G. (2003):
Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *European Journal of Cancer* (39), 1990-2005.

Paz, I., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y., Wilczynski, S. (1997):
Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* (79), 595-604.

Pentheroudakis, G., Golfopoulos, V., & N., P. (2007):
Switching benchmarks in cancer of unknown primary: From autopsy to microarray. *European Journal of Cancer* (43), 2026-2036.

Pentheroudakis, G., Kotteas, E., Kotoula, V., Papadopoulou, K., Charalambous, E., Cervantes, A., et al. (2014):
Mutational profiling of the RAS, PI3K, MET, and b-catenin pathways in cancer of unknown primary: a retrospective study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Clin Exp Metastasis* (31), 761-769.

Petrakis, D., Pentheroudakis, G., Voulgaris, E., Pavlidis, N. (2013):
Prognostication in cancer of unknown primary (CUP): Development of a prognostic algorithm in 311 cases and review of literature. *Cancer Treatment Reviews* (39), 701-708.

Phelps, W., & Alexander, K. (1995):
Antiviral Therapy for Human Papillomaviruses: Rationale and Prospects. *Ann Intern Med* (123), 368-382.

Psyrris, A., & Cohen, E. (2011).
Oropharyngeal Cancer: clinical implications of the HPV connection. *Annals of Oncology* (22), 997-999.

Rampias, T., Pectasides, E., Prasad, M., Sasaki, C., Gouveris, P., Dimou, A., et al. (2013).
Molecular profile of head and neck squamous cell carcinomas bearing p16 high phenotype. *Annals of Oncology* (24), 2124-2131.

Rao, T., & Kühl, M. (2010):

An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways. *Circulation Research* (106), 1798-1806.

Reuter, P. (2007):

Klinisches Wörterbuch 2007/2008. (Auflage 1, S. 547, S. 725, S. 729, S. 1049). Heidelberg: Springer.

Robbins, K., Clayman, G., Levine, P., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., et al. (2002):

Neck Dissection Classification Update. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (128), 751-758.

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., de Herreros, A., & Dunach, M. (1999):

Regulation of E-cadherin/Catenin Association by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* (274), 36734-36740.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., & Polakis, P. (1997):

Stabilization of β -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines. *Science* (275), 1790-1792.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S., Masiarz, F., et al. (1993):

Association of the APC- Gene Product with β -Catenin. *Science* (262), 1731-1734.

Rusthoven, K., Koshy, M., & Paulino, A. (2004):

The Role of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Cervical Lymph Node Metastases from an Unknown Primary Tumor. *CANCER*, 101 (11), 2641-2649.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., et al. (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (239), 487-491.

Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., & Nakajima, T. (1998):

Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. *American Journal of Pathology* (153), 1741-1748.

Scheffner, M., Takahashi, T., Huibregtse, J., Minna, J., & Howley, P. (1992):

Interaction of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein with Wild-Type and Mutant Human p53 Proteins. *Journal of Virology* (66), 5100-5105.

Scheffner, M., Werness, B. H., Levine, A., & Howley, P. (1990):

The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell* (63), 1129-1136.

Schmalbach, C., & Miller, F. (2007):

Occult Primary Head and Neck Carcinoma. *Current Oncology Reports* (9), 139-146.

Schmitt, M., Bravo, I., Snijders, P., Gissmann, L., Pawlita, M., & Waterboer, T. (2006):

Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* (44), 504-512.

Schulte, G., & Bryja, V. (2007):

The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* (28), 518- 525.

Schwartz, S., Daling, J., Doody, D., Wipf, G., Carter, J., Madeleine, M., et al. (1998):

Oral Cancer Risk in Relation to Sexual History and Evidence of Human Papillomavirus Infection. *Journal of the National Cancer Institute* (90), 1626-1636.

Sedman, J., & Stenlund, A. (1995):

Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *The EMBO Journal* (14), 6218-6228.

Seo, Y.-S., Müller, F., Lusky, M., & Hurwitz, J. (1993):

Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* (90), 702-706.

Serrano, M., Hannon, G., & Beach, D. (1993):

A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* (366), 704-707.

Sève, P., Billotey, C., Broussolle, C., Dumontet, C., & Mackey, J. (2007):

The Role of 2-Deoxy-2-[F-18]Fluoro-D-Glucose Positron Emission Tomography in Disseminated Carcinoma of Unknown Primary Site. *CANCER* , 109 (2), 292-299.

Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K., & Kirnbauer, R. (2003):

Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *Journal of Virology* (77), 13125-13135.

Sher, D., Balboni, T., Haddad, R., Norris, C., Posner, M., Wirth, L., et al. (2011):

Efficacy and Toxicity of Chemoradiotherapy using intensity-modulated Radiotherapy for Unknown Primary of Head and Neck. *Int. J. Radiation Oncology* (80), 1405-1411.

Sherr, C. (1996):

Cancer Cell Cycles. *Science* (274), 1672-1677.

Shrotriya, S., Walsh, D., Bennani-Baiti, N., Thomas, S., Lorton, C. (2015):

C-Reactive Protein is an important biomarker for prognosis tumor recurrence and treatment response in adult solid tumors: a systematic review. *PLoS ONE* (12), e0143080. doi:10.1371.

Sinnathamby, K., Peters, L., Laidlaw, C., & Hughes, P. (1997):

The occult head and neck primary: to treat or not to treat? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (9), 322.

Sivars, L., Näsman, A., Tertipis, N., Vlastos, A., Ramqvist, T., Dalianis, T., et al. (2014):

Human papillomavirus and p53 expression in cancer of unknown primary in the head and neck region in relation to clinical outcome. *Cancer Medicine* (2), 376-384.

Sloan, P. (2009):

Head and Neck Sentinel Lymph Node Biopsy: Current State of the Art. *Head and Neck Pathol* (3), 231-237.

Snijders, P., Scholes, A., Hart, C., Jones, A., Vaughan, E., Woolgar, J., et al. (1996):

Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* (66), 464-469.

Stasche, N., & Schmieder, A. (2010):

Kopf-Hals-Karzinome. In W. Dornoff, F.-G. Hagemann, J. Preiß, & A. Schmieder, *Taschenbuch Onkologie 2010: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011* (S. 137-144). München: Zuckerschwerdt-Verlag.

Su, Y.-Y., Chen, S.-S., Hsieh, C.-H., Liao, C.-T., Lin, C.-Y., Kang, C.-J., Yen, T.-C. (2016):

Defining risk groups of patients with cancer of unknown primary site and cervical nodal metastases by F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography imagin. *Kaohsiung Journal of Medical Science* (32), 407-413.

Tang, A., Amagai, M., Granger, L., Stanley, J., & Udey, M. (1993):

Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* (361), 82-85.

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

The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* (18), 7690-7700.

Tribius, S., Hoffmann, A., Bastrop, S., Görögh, T., Haag, J., Röcken, C., et al. (2012):

HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome. *Oral Oncology* (48), 1178-1184.

Tribius, S., Ihloff, A., Rieckmann, T., Petersen, C., & Hoffmann, M. (2011):

Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: What we know and what we need to know. *Cancer Letters* (304), 71-79.

Trivanovic, D., Petkovic, M. & Stimac, D. (2009):

New prognostic index to predict survival in patients with cancer of unknown primary site with unfavourable prognosis. *Clinical Oncology* (21), 43-48.

Uraguchi, M., Morikawa, M., Shirakawa, M., Sanada, K., & Imai, K. (2004): Activation of WNT Family Expression and Signaling in Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. *J Dent Res* (83), 327-332.

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., et al. (1997): Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene dTCF. *Cell* (88), 789-799.

van de Wouw, A., Janssen-Heijnen, M., Coebergh, J., & HFP, H. (2002): Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984-1992. *European Journal of Cancer* (38), 409-413.

Vent, J., Haidle, B., Wedmeyer, I., Huebbers, C., Siefer, O., Semrau, R., et al. (2013): p16 Expression in carcinoma of unknown primary: Diagnostic indicator and prognostic marker. *Head Neck*, 6 Seiten.

Vestweber, D., & Kemler, R. (1984): Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ* (15), 269-273.

Wagner, S., Wittekindt, C., Reuschenbach, M., Hennig, B., Thevarajah M., et al. (2016): CD45-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* (138), 2263-2273.

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shah, K., et al. (1999): Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *Journal of Pathology* (189), 12-19.

Wallace, A., Richards, G., Harari, P., Kirwan, J., Morris, C., Katakam, H., et al. (2011): Head and neck squamous cell carcinoma from an unknown primary site. *American Journal of Otolaryngology* (32), 286-290.

Wazer, D., Liu, X.-L., Chu, Q., Gao, Q., & Band, V. (1995): Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci USA* (92), 3687-3691.

Weinberg, R. (1995): The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* (81), 323-330.

Weiss, D., Koopman, M., & Rudack, C. (2010): Prevalence and Impact on Clinicopathological Characteristics of Human Papillomavirus-16 DNA in Cervical Lymph Node Metastases of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck* (33), 856-862.

Werness, B., Levine, A., & Howley, P. (1990):

Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Science* (248), 76-79.

Wittekindt, C., Gültekin, E., Weissenborn, S., Dienes, H., Pfister, H., & Klussmann, J. (2005):

Expression of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Status in Tonsillar Carcinomas and Has Implications on Survival. *Adv Otorhinolaryngol* (62), 72-80.

Wittekindt, C., Wagner, S., & Klußmann, J. (2011):

Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO*, 8 Seiten.

Xing, Y., Clements, W., Kimelman, D., & Xu, W. (2003):

Crystal structure of β -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the β -catenin destruction complex. *Genes & Development* (17), 2753-2764.

Xu, L., Jiang, Y., Zheng, J., Xie, G., Li, J., Shi, L., et al. (2013):

Aberrant expression of β -catenin and E-cadherin is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer. *Human Pathology* (44), 1357-1364.

Yang, J., Mani, S., Donaher, J., Ramaswamy, S., Itzykson, R., Come, C., et al. (2004):

Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell* (117), 927-939.

Yasui, T., Morii, E., Yamamoto, Y., Yoshii, T., Takenaka, Y., Nakahara, S., et al. (2014):

Human Papillomavirus and Cystic Node Metastasis in Oropharyngeal Cancer of Unknown Primary Origin. *PLOS ONE* (9), 8 Seiten.

Yost, C., Torres, M., Miller, J., Huang, E., Kimelman, D., & Moon, R. (1996):

The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & Development* (10), 1443-1454.

Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T., Perry, W., et al. (1997):

The Mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation. *Cell* (90), 181-192.

Zengel, P., Assman, G., Mollenhauer, M., Jung, A., Sotlar, K., Kirchner, T., et al. (2012):

Cancer of unknown primary origin from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. *Virchows Arch* (461), 283-290.

Zhuang, S., Wu, X.-F., Li, J.-J., & Zhang, G.-H. (2014):

Management of lymph node metastases from an unknown primary site to the head and neck (Review). *Molecular and Clinical Oncology* (2), 917-922.

Ziegert, C., Wentzensen, N., Vinokurova, S., Kissel'ov, F., Eienkel, J., Hoeckel, M., et al. (2003):

A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* (22), 3977-3984.

Ziemann, F., Arenz, A., Preising, S., Wittekindt, C., Klussmann, J., Engenhardt-Cabillic, R., et al. (2015):

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* (5), 1017-1031.

zur Hausen, H. (1996): Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* (2), 55-78.

zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application. *Nature* (2), 342-350.

zur Hausen, H. (1989):

Papillomaviruses in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of Viruses in Human Cancers. *Cancer Res* (49), 4677-4681.

11. Anhang

11.1 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

11.2 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Dr. Steffen Wagner, der stets ein offenes Ohr hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. Claus Wittekindt, der die Arbeit geduldig von Anfang an begleitet und stets hilfreiche Ansätze zur Verbesserung geliefert hat.

Ein Dank gilt ebenso meiner Familie, die mich in all den Jahren immer wieder motiviert und auf vielfältige Art und Weise unterstützt hat. Insbesondere danken möchte ich meinen Eltern, meinem Mann sowie meinem Großvater, Dr. Rolf Lange.

