Mutationsprofil von Patienten mit Humanem Papillomvirus-induzierten Oropharynx-Plattenepithelkarzinom mit Therapieversagen und deren Kontrolle während der Nachsorge

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

vorgelegt von Henrike Simone Frauke Reder-Jung
geborene Reder

Gießen, 2022

Aus dem Fachbereich Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen

Kopf-Hals Tumorforschung, Klinik für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde

Gutachter: Prof. Dr. med. Jens Peter Klußmann
Gutachter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Jan-Falco Wilbrand

Tag der Disputation: 19. Dezember 2022

Für meinen Papa:
Der mich lehrte, mich nicht zu fragen,
ob etwas geht, sondern wie etwas geht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Humane Papillomviren 1
1.2. Kopf-Hals Tumore 5
1.2.1. Inzidenz und Epidemiologie 5
1.2.2. Klassifikation von Oropharynxkarzinomen 7
1.2.3. Standardtherapie für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx 9
1.3. Vergleich chromosomaler und genetischer Unterschiede zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC 11
1.3.1. Mutationssignaturen 11
1.3.2. Integration von HPV-DNA in das Wirtsgenom 12
1.3.3. Aberrationen in der Kopienzahl genomischer DNA in HPV-getriebenen Kopf-Hals-Tumoren 13
1.4. „Flüssigbiopsien“ (*Liquid Biopsy*) in der Tumordiagnostik 14
1.4.1. Eigenschaften zellfreier-DNA im Plasma 15
1.5. Hypothese und Ziele 16
2. Ergebnisse 18
2.1. Nachweis von HPV-DNA in Plasma von Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC vor und nach der Therapie 18
2.2. Identifizierung spezifischer Mutationen in HPV-getriebenen OPSCC von Patienten mit Therapieversagen 30
2.3. Mutationsmuster in HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC von Patienten mit Therapieversagen 38
2.4. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen im Plasma HPV-getriebener OPSCC Patienten im Verlauf 49
2.4.1. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen in Patienten ohne Therapieversagen im Krankheitsverlauf 49
2.4.2. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen in Patienten mit Lokalrezidiv/Fernmetastase im Krankheitsverlauf 52
3. Diskussion 53
3.1. Entwicklung des Genpanels 53
3.2. Einsatz nicht-invasiver Flüssigbiopsien im Klinikalltag 54
3.3. Identifikation genetischer Varianten bei HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC 55
3.3.1. Mutationsraten HPV-getriebener und HPV-negativer OPSCC 55
3.3.1.1. Mutationsrate von *TP53* in HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC 56

3.3.2. tNGS-identifizierte Mutationen in Patienten in Abhängigkeit des Therapieansprechens 56
3.3.2.1. Vergleich der Mutationen in HPV-getriebenen OPSCC unterteilt in Patienten mit und ohne Therapieversagen 57
3.3.2.2. Unterschiede der Mutationen in HPV-negativen OPSCC unterteilt in Patienten mit und ohne Therapieversagen 58
3.3.3. Zusammenfassung der Mutationsstudie zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC mit und ohne Therapieversagen 58
3.4. Die Konzentration der zell-freien HPV-DNA im Plasma korreliert mit dem Krankheitsverlauf 60
3.5. Detektion Tumor-spezifischer Mutationen HPV-getriebener OPSCC im Plasma während der Nachsorge 63
3.6. Zusammenfassung des Nachweises von cfHPV-DNA in Plasma 64
4. Ausblick 65
5. Verzeichnisse 69
5.1. Abkürzungsverzeichnis 69
5.2. Abbildungsverzeichnis 74
5.3. Tabellenverzeichnis 75
5.4. Literaturverzeichnis 76
6. Anhang ..... A
6.1. Methoden ..... A
6.1.1. Herstellung der Library zur Fragmentsequenzierung ..... A
6.2. Materialien ..... D
6.3. Angaben zum Eigenanteil ..... E
6.3.1. Plasma Cell-free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma ..... E
6.3.2. Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure ..... G
6.3.3. Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status I
6.4. Nutzungsgenehmigungen ..... K
6.5. Veröffentlichungen ..... M
6.5.1. Publikationen ..... M
6.5.2. Vorträge ..... M
6.5.3. Poster ..... N
7. Ehrenwörtliche Erklärung ..... O
8. Danksagung ..... P

Gender Disclaimer:

In der vorliegenden Arbeit wird zur besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Das schließt, sofern nicht explizit eingeschränkt, Personen jeden Geschlechts ein.

1. Einleitung

1.1. Humane Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) traten erstmals 1994 als Auslöser von Krebserkrankungen im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom in den Fokus der Öffentlichkeit (zur Hausen *et al.* 1994). Für diese Entdeckung erhielt Professor Harald zur Hausen 2008 den Nobelpreis für Medizin. In seiner Arbeit beschreibt er, dass für die Entwicklung des Zervixkarzinoms zu 50 % HPV Typ 16 und zu 20 % der Typ 18 verantwortlich sind (zur Hausen 2008).

Papillomviren sind eine Familie der DNA-Viren mit zirkulärer doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA), von denen der Großteil der humanen PV-Typen dem alpha-, beta- und gamma-Genus zugeordnet sind (Meiring *et al.* 2017) (Abb. 1A). Bis heute sind über 100 unterschiedliche Typen identifiziert, die nach ihrem Infektionsrisiko klassifiziert sind (de Villiers *et al.* 2004). Die sogenannten Hochrisiko-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82) sind für die Entstehung von Tumoren verantwortlich; eine Infektion mit einem Niedrigrisiko-Typ (z.B. 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 und 81) führt zur Ausbildung von Warzen (Munoz *et al.* 2003). In der Zervix und im Kopf-Hals Bereich sind die Mehrheit der HPV-getriebenen Karzinome mit den Hochrisiko-Typen 16 und 18 assoziiert (Berman *et al.* 2017).

Das circa 8 Kilobasen (kb) große Genom von HPV codiert sechs „frühe“ (*Early*, E) Virusproteine (E1, E2, E4, E5, E6 und E7), die die virale Replikation regulieren und zwei „späte“ (*Late*, L) Strukturproteine (L1, L2) (Zheng *et al.* 2006) (Abb. 1B). Die Strukturproteine bilden die Kapsid-Hülle des Virus. Einige der frühen Virusproteine sind für die karzinogene Veränderung von Zellen verantwortlich.

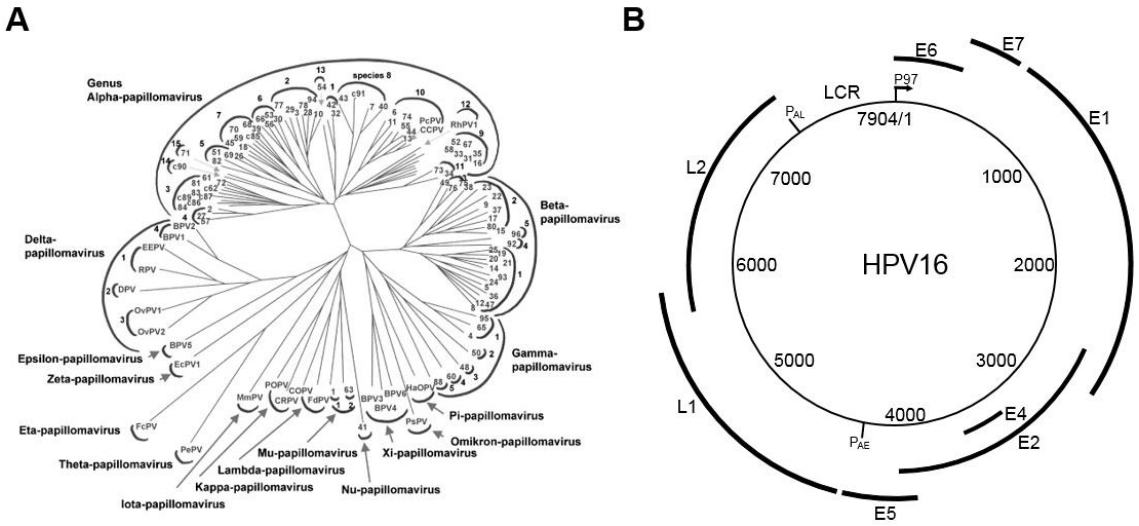


Abb. 1: Familie der Papillomviridae und Schema der genomischen Struktur von HPV Typ 16. (A) Phylogenetischer Baum der Familie der Papillomviren. Die äußersten Bezeichnungen definieren Arten, die inneren Bezeichnungen Spezies mit mehreren Typen. Die bedeutendsten humanen PV gehören in die Arten der alpha-, beta- und gamma-PV. Der HPV-Typ 16 gehört zur Spezies 9 der alpha-PV. (Herausgegeben von (de Villiers *et al.* 2004), mit Erlaubnis von Elsevier, Lizenznummer: 522477243166). (B) Genomische Struktur von HPV-Typ 16. Das zirkuläre Virus-Genom besteht aus 7904 Basen (innerer Kreis und Zahlen). Äußere Kreislinien symbolisieren die Lage der Gene (E1-E7, L1, L2) im Genom. Die lange Kontrollregion (*long control region*, LCR) enthält einen DNA Replikationsursprung und reguliert die Replikation. P97: Promoter; PAE und PAL: Polyadenylierungssignal. (Herausgegeben von (Beutner *et al.* 1997), mit Erlaubnis von Elsevier, Lizenznummer: 5224770637400).

Bei einer Infektion mit HPV dringt das Virus über eine Wunde in die Nähe der Basalzellschicht vor und infiziert dort prolieferierende Keratinozyten (Abb. 2) Nach dem Eindringen in die Wirtszelle und dem Transport in den Nukleus nutzt HPV den natürlichen Replikationsprozess der Zelle, um virale DNA zu transkribieren. In der frühen Phase der Virusreplikation werden E1 und E2 als Regulatoren der Onkogene E6 und E7 exprimiert. Aufgrund der Expression viraler Proteine in geringer Konzentration wird das Immunsystem nicht aktiviert und das Virus kann sich latent vermehren. Mit der Transkription von E6 und E7 geht die Zelle in die maligne Form über (der molekulare Mechanismus wird im folgenden Absatz erklärt). Erreichen HPV-infizierte Zellen mit der Differenzierung der Keratinozyten die oberen Zellschichten werden in der späten Phase des viralen Lebenszyklus Kapsidproteine exprimiert und infektiöse HP-Viruspartikel mit der Ablösung der oberen Zellen freigesetzt (Graham 2017).

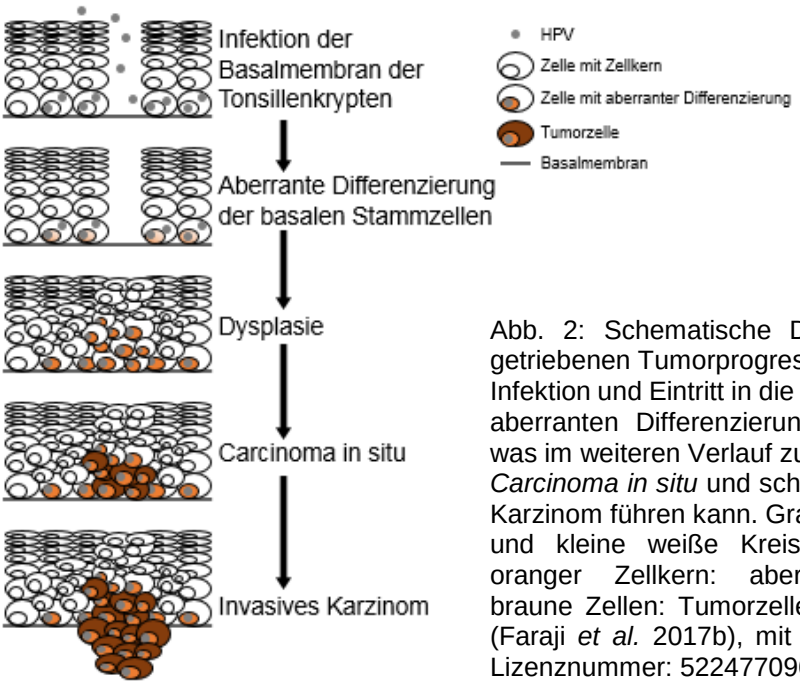


Abb. 2: Schematische Darstellung einer HPV-getriebenen Tumorprogression.
Infektion und Eintritt in die Zelle resultieren in einer aberranten Differenzierung basaler Stammzelle, was im weiteren Verlauf zu einer Dysplasie, einem *Carcinoma in situ* und schließlich einem invasiven Karzinom führen kann. Graue Punkte: HPV; große und kleine weiße Kreise: Zelle mit Zellkern; oranger Zellkern: aberrante Differenzierung; braune Zellen: Tumorzelle. (Herausgegeben von (Faraji *et al.* 2017b), mit Erlaubnis von Elsevier, Lizenznummer: 5224770963632)

Innerhalb einer gesunden Zellen finden bei der Replikation molekular folgende Prozesse statt: das Gen Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, *CDKN2A*) codiert für die Proteine $p14^{ARF}$ und $p16^{INK4A}$. $p14^{ARF}$ aktiviert als Antwort auf mitogene Stimuli über mehrere Zwischenschritte das Tumorprotein 53 (p53), welches wiederum p21 aktiviert (Abb. 3). Aktives p21 hemmt den Übergang des Zellzyklus aus der Wachstumsphase 2 (*growth phase 2*, G2-Phase) in die Mitose. $p16^{INK4A}$ dagegen inhibiert den Komplex aus Cyclin D1 und Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (*cyclin-dependent kinases 4 and 6*, CDK4/6). Aktiviert katalysiert dieser Komplex die Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins (pRb), und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und den Übergang des Zellzyklus in die Synthese (S)-Phase. Freies E2F regt über eine *Feedback*-Schleife die Expression von $p16^{INK4A}$ an, welches wiederum den Cyclin D1-CDK4/6-Komplex inhibiert (s. oben).

In HPV-infizierten Zellen interagiert E6 über ein assoziiertes Protein (E6AP) mit dem Tumorsuppressorprotein p53. Dabei wird p53 ubiquitiniert und daraufhin degradiert. Dadurch wird die Aktivierung von p21 unterbunden. Inaktives p21 greift somit nicht in den Zellzyklus ein und die Zelle geht unkontrolliert in die Mitosephase über. E7 dagegen bindet und löst das Rb-Protein und weitere Bindeproteine vom Transkriptionsfaktor E2F. E2F wird dadurch freigesetzt und initiiert den Übergang in die Synthesephase (Faraji *et al.* 2017b). Durch das Zusammenspiel von E6 und E7 werden die zellulären Kontrollmechanismen zur Apoptose außer Kraft gesetzt und die Zelle teilt sich unkontrolliert. Entsprechend dem Verlauf in gesunden Zellen regt freies E2F die Expression von $p16^{INK4A}$ an. Aufgrund des fehlenden Rb-Proteins wird E2F jedoch nicht mehr inhibiert und die Expression von $p16^{INK4A}$ infolgedessen nicht gestoppt, ohne dass

sich diese Anhäufung von $p16^{INK4A}$ negativ auf die Proliferation der Tumorzellen auswirkt, wie es bei gesunden Zellen der Fall wäre. $P16^{INK4A}$ fungiert in einer gesunden Zelle also als Tumorsuppressor und verhindert durch die Inhibition des Cyclin D1/CDK4/6-Komplex den Eintritt in die S-Phase. Liegen keine entsprechenden Stimuli vor, wird $p16^{INK4A}$ nicht aktiviert und dementsprechend nicht hoch exprimiert. Daher wird die Anhäufung von $p16^{INK4A}$ als Surrogatmarker für einen HPV-infizierten Tumor gewertet. Allerdings zeigten Studien, dass eine positive $p16^{INK4A}$ Färbung auch physiologisch auftreten kann und alleine nicht ausreicht, um eine HPV-Assoziation sicher festzustellen (Wagner *et al.* 2020). Deswegen sollte für eine sichere Diagnose einer HPV-Assoziation neben der $p16^{INK4A}$ Färbung auch immer HPV-DNA im Tumor nachgewiesen werden.

Das Virusprotein E2 wird üblicherweise als regulatorisches Protein beschrieben, das die Transkription der Onkogene E6 und E7 kontrolliert. Eine Deregulation der Onkogene kann durch die funktionelle Disruption des E2 Gens stattfinden. Dies geschieht häufig während einer Integration des HPV-Genoms in das Wirtsgenom, bei der durch eine Linearisierung des HPV-Genoms häufig ein Bruch innerhalb des E2 Gens stattfindet (Groves *et al.* 2018). Die Funktion der viralen Proteine E1, E4 und E5 ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird aber vermutet, dass es sich bei E1 um die virale Helikase und ein ATP-bindendes Protein handelt, das für die Replikation der viralen DNA von Bedeutung ist. Für HPV16 E4 wird eine Rolle bei der Virusfreisetzung vermutet, indem es die Kapsidzusammensetzung unterstützt (Graham 2017). Für HPV16 E5 hingegen wird vermutet, dass es nur eine schwache kanzerogene Funktion besitzt, aber hilft das Immunsystem zu umgehen, indem es die Präsentation viraler Protein am Haupthistokompatibilitätskomplex unterdrückt (Graham 2017; Stanley *et al.* 2007).

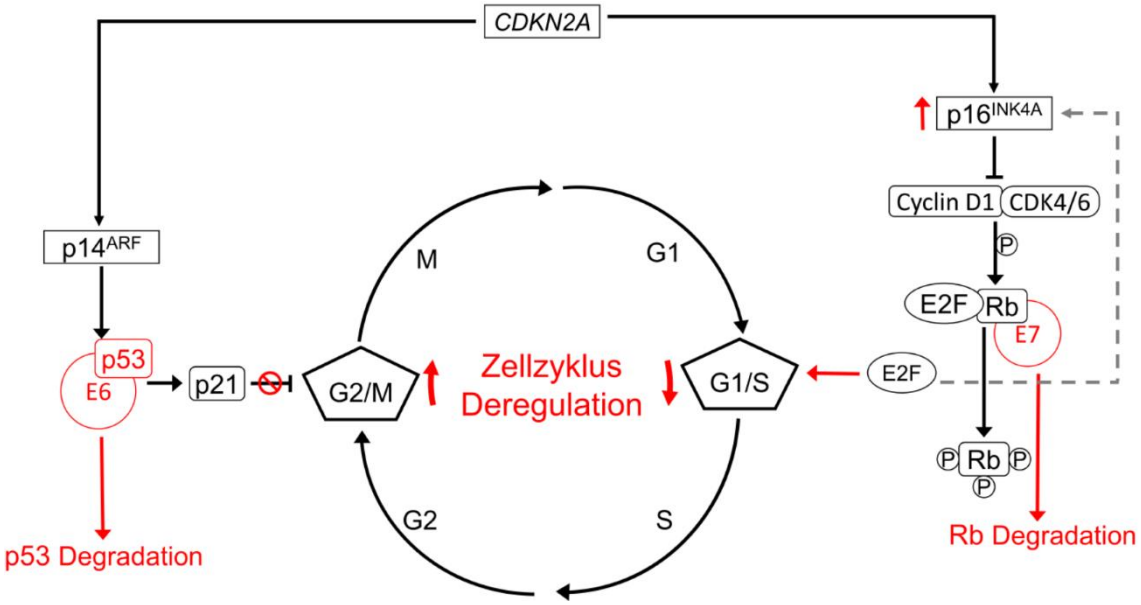


Abb. 3: Schematische Darstellung der molekularen Karzinogenese HPV-getriebener Tumore im Vergleich zu einer gesunden Zelle.
In einer gesunden Zelle (schwarz) codiert das Gen *CDKN2A* für die zwei Proteine $p14^{ARF}$ und $p16^{INK4A}$. Links: $p14^{ARF}$ aktiviert bei Replikationsfehlern über mehrere Zwischenschritte p53, welches p21 aktiviert und darüber den Übergang des Zellzyklus in die Mitose (M) inhibiert. Rechts: $p16^{INK4A}$ inhibiert die Aktivierung von CDK4/6 durch Cyclin D1, wodurch pRb unphosphoryliert bleibt, den Transkriptionsfaktor E2F bindet und den Übergang in die Synthesephase (S) verhindert. Durch Deaktivierung von pRb und Aktivierung von E2F (freies E2F) wird eine negative *Feedback*-Schleife aktiviert, die die Expression von $p16^{INK4A}$ anschaltet. Bei einer Infektion mit HPV (rot) interagiert das HPV-Onkoprotein E6 mit der Ubiquitin Ligase E6AP, was zur Ubiquitinierung und dem Abbau von p53 führt (links). Durch den Abbau von p53 bleibt p21 inaktiv und der Zellzyklus geht unkontrolliert in die Mitose über. Zusätzlich bindet und markiert E7 pRb für den Abbau, wodurch E2F freigesetzt und aktiviert wird – der Zellzyklus geht in die S-Phase über. Freies E2F aktiviert die Expression von $p16^{INK4A}$. G1: Wachstumsphase 1; G1/S: Kontrollpunkt zwischen Wachstumsphase 1 und Synthese-Phase; S: Synthese-Phase; G2: Wachstumsphase 2; G2/M: Kontrollpunkt zwischen Wachstumphase 2 und Mitosephase; M: Mitosephase. (Modifiziert nach (Faraji *et al.* 2017b), mit Erlaubnis von Elsevier, Lizenznummer: 5224770963632)

1.2. Kopf-Hals Tumore

1.2.1. Inzidenz und Epidemiologie

Karzinome des Kopf-Hals Bereichs umfassen die Mundhöhle, den Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx, Larynx und die Trachea. (Abb. 4A). Abgesehen von Tumoren im Oropharynx, wurde in den letzten Jahren von einer abnehmenden Inzidenz bei Kopf-Hals Tumoren berichtet (Marur *et al.* 2010). Trotzdem wurden im Jahr 2020 weltweit knapp 900.000 neue Kopf-Hals Tumorfälle diagnostiziert und ca. 444.000 Patienten starben an dieser Erkrankung (Sung *et al.* 2021). Die Hauptrisikofaktoren für Kopf-Hals Tumore sind Tabak- und Alkoholkonsum, Betelkauen und virale Infektionen (Eppstein-Barr Virus, Humane Papillomviren). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt, je nach Tumorlokalisation, zwischen 20 % und 80 % (Berrino *et al.* 1998; Carvalho *et al.* 2005; Guntinas-Lichius *et al.* 2010).

Plattenepithelkarzinome des Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) sind eine Untergruppe der Kopf-Hals-Tumore und umfassen den weichen Gaumen, die Tonsillen, die Rachen-Hinter- und Seitenwand sowie den Zungengrund (Abb. 4B).

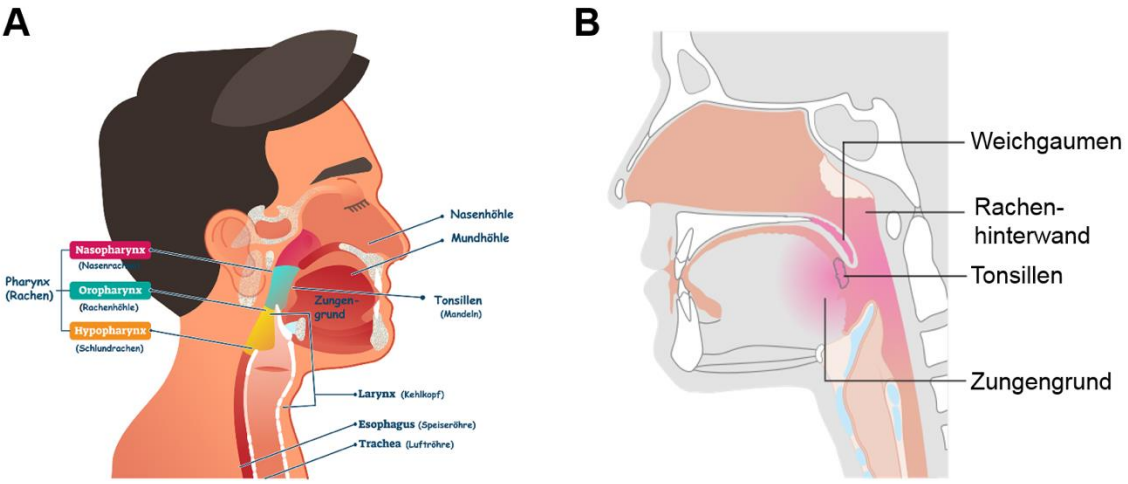


Abb. 4: Untereinheiten des Kopf-Hals Bereichs (A) sowie des Oropharynx (B).
((A) VectorMine/Shutterstock.com (Artikel ID: 1667954575), (B) (*Cancer Research UK* via wikimedia commons, 2015), Lizenznummer CC BY-SA 4.0)

Entgegen des allgemeinen rückläufigen Trends von Kopf-Hals Tumoren steigen die Inzidenzen im Oropharynx (98.400 neue Fälle in 2020), was vor allem der Infektion mit HPV zugeordnet wird (Sung *et al.* 2021). Der häufigste HPV-Typ ist dabei der Hochrisiko Typ 16 (Gillison *et al.* 2014). Der Anteil HPV-getriebener (HPV^+) OPSCC hat inzwischen den HPV-negativer (HPV^-) OPSCC übertroffen; zudem wird mit einem weiteren Anstieg gerechnet, der in Deutschland bis 2030 auch die Fallzahlen von Zervixkarzinomen überschritten haben soll (Wittekindt *et al.* 2019). Verglichen mit HPV^- OPSCC Patienten, zeigen Patienten mit HPV^+ OPSCC ein signifikant besseres Therapieansprechen und Überleben (Fakhry *et al.* 2008; Marur *et al.* 2010), was sich auch auf die Rückfallrate (Ausbildung von Lokalrezidiv/Fernmetasen, LR/MF) auswirkt. Trotz des verringerten Rezidivrisikos erleiden immer noch 13-25 % der Patienten mit HPV^+ OPSCC innerhalb der ersten zwei Jahre und bis zu 36 % innerhalb von acht Jahren einen Krankheitsrückfall (Faraji *et al.* 2017a). Ungeachtet der Unterschiede in klinischen und biologischen Eigenschaften, werden bisher alle OPSCC Patienten, unabhängig des HPV-Status, mit konventionellen Standard-Therapieleitlinien (primäre Chemoradiotherapie oder Operation mit adjuvanter Chemoradiotherapie) behandelt (Johnson *et al.* 2020). Daher werden über de-eskalierte Therapien diskutiert, mit beispielweise verringerter Strahlungsdosis für Patienten mit HPV^+ OPSCC, und entsprechende klinische Studien initiiert (z.B. NCT02908477, NCT03215719, NCT03777384, über https://clinicaltrials.gov/, Stand: 19.01.2022). Die in der Literatur

beschriebenen Eigenschaften bezüglich Inzidenz (Abb. 5A), Überlebensprognose (Abb. 5B) und Rückfallraten (Abb. 5C) konnten wir auch bei Patienten beobachten, die zwischen den Jahren 2000 und 2019 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren (HNO-)Heilkunde des Universitätsklinikums Gießen/Marburg, Standort Gießen behandelt wurden.

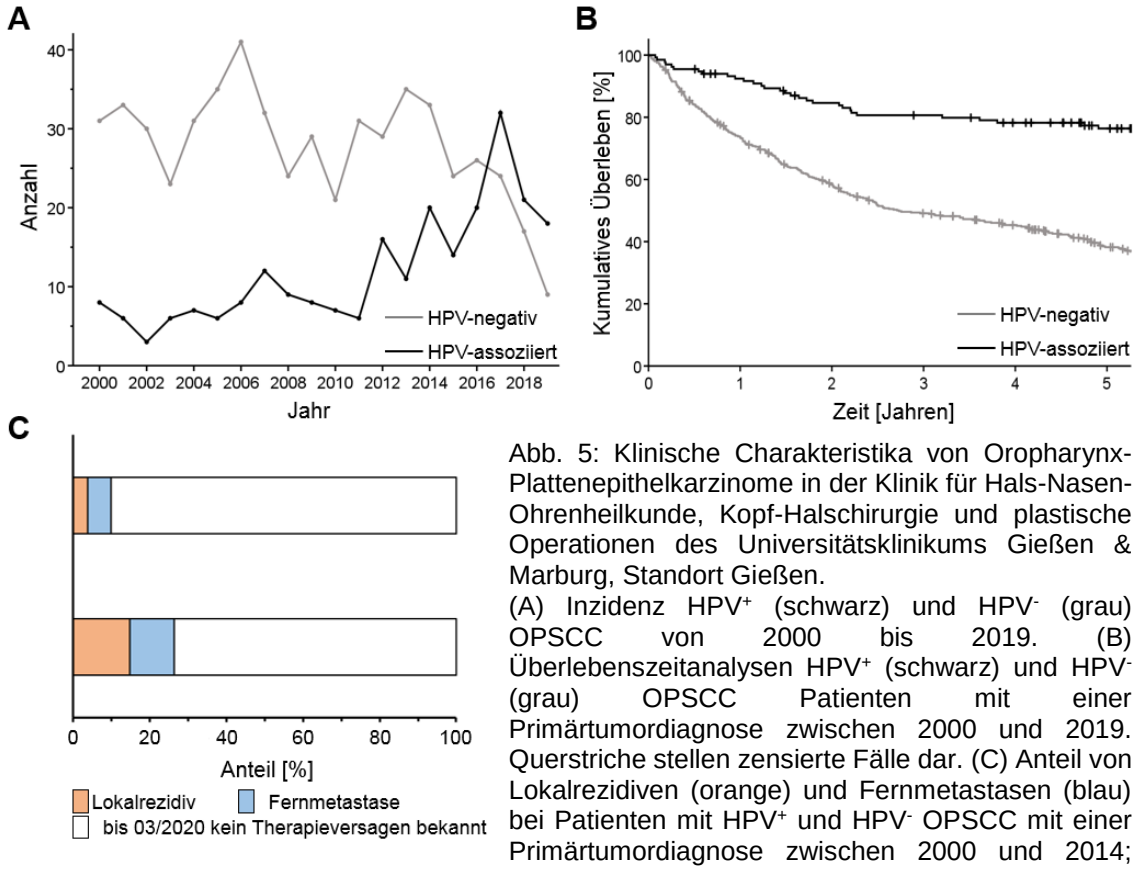


Abb. 5: Klinische Charakteristika von Oropharynx-Plattenepithelkarzinome in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf-Halschirurgie und plastische Operationen des Universitätsklinikums Gießen & Marburg, Standort Gießen.
(A) Inzidenz HPV^+ (schwarz) und HPV^- (grau) OPSCC von 2000 bis 2019. (B) Überlebenszeitanalysen HPV^+ (schwarz) und HPV^- (grau) OPSCC Patienten mit einer Primärtumordiagnose zwischen 2000 und 2019. Querstriche stellen zensierte Fälle dar. (C) Anteil von Lokalrezidiven (orange) und Fernmetastasen (blau) bei Patienten mit HPV^+ und HPV^- OPSCC mit einer Primärtumordiagnose zwischen 2000 und 2014; weiß: bis 03/2020 kein LR/FM bekannt.

1.2.2. Klassifikation von Oropharynxkarzinomen

Klinisch werden Erkrankungen anhand der „Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (*international statistical classification of diseases and related health problems ICD*, Ausgabe ICD-10, Version 19) der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) eingeteilt (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) 2020). Neoplasien des Oropharynx umfassen dabei die in Tabelle 1 gelisteten Bereiche und Codierungen.

Tabelle 1: ICD-10 Codierung zur bösartigen Neubildung des Oropharynx.

ICD-10 Code	Teilbereich
C01	Bösartige Neubildung des Zungengrunds
C05.1	Bösartige Neubildung des Weichgaumens
C05.2	Bösartige Neubildung der *Uvula*
C09	Bösartige Neubildung der Tonsille
C09.0	*Fossa tonsillaris*
C09.1	Vorderer und hinterer Gaumenbogen
C09.8	Mehrere Teilbereiche überlappend
C09.9	Nicht näher bezeichnet
C10	Bösartige Neubildung des Oropharynx (ohne Tonsillen)
C10.0	*Vallecula epiglottica*
C10.1	Voderfläche der Epiglottis
C10.2	Seitenwand
C10.3	Hinterwand
C10.4	Kiemengang
C10.8	Mehrere Teilbereiche überlappend
C10.9	Nicht näher bezeichnet

Adaptiert von (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) 2020)

Nach der Codierung der Erkrankung mittels ICD wird der Tumor und dessen Ausbreitung näher klassifiziert: dabei wird die Tumorgröße (T) sowie der Lymphknoten- (Nodus, N) und der Fernmetastasenstatus (M) berücksichtigt. Bei $p16^{INK4A}$-positiven OPSCC gibt es bezüglich der TNM-Klassifikation eine Unterscheidung zwischen klinischer und pathologischer Einteilung. In dieser Arbeit wird für die Beurteilung der analysierten OPSCC die pathologische Klassifizierung genutzt, da diese der biologischen Relevanz näher ist als die klinische Klassifizierung. Die pathologischen Einteilungen für $p16^{INK4A}$-positive und $p16^{INK4A}$-negative OPSCC sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Pathologische TNM-Kategorien für p16^{INK4A}-positive und p16^{INK4A}-negative OPSCC.

		p16^{INK4A}-negativ	**p16^{INK4A}-positiv**
T-Status	**T1**	≤2 cm	
	T2	>2 cm, ≤4 cm	
	T3	>4 cm, oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis	
	T4a	Infiltration Larynx, äußere Zungenmusk., Hartgaumen, Mandibula, *Lamina med. Processus pterygoideus*	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskel, *Lamina med./lat. Processus pterygoideus*, Hartgaumen, *Mandibula*, *M. pterygoideus lateralis*, Schädelbasis, *ACI*, lat. Nasopharynx (hier nur T4)
	T4b	Infiltration *M. pterygoideus lateralis*, Schädelbasis, *ACI*	
N-Status	**N0**	keine regionären Lymphknotenmetastasen	
	N1	Ipsilateral solitär, ≤3 cm	≤4 betroffene Lymphknoten
	N2a	Ipsilateral solitär, ≤3 cm mit ECS oder ≤6 cm ohne ECS	≥5 betroffene Lymphknoten (hier nur N2)
	N2b	Ipsilateral multipel, ≤6 cm, ohne ECS	
	N2c	Bilateral, kontralateral ≤6 cm ohne ECS	
	N3a	Metastasen >6 cm, kein ECS	
	N3b	Metastasen >3 cm mit ECS oder kontra-/bilateral mit ECS	
M-Status	**M0**	Keine Fernmetastase	
	M1	Fernmetastasen vorhanden	

ECS: *extracapsular spread* (extrakapsuläre Ausbreitung); M.: *Musculus* (Muskel); ACI: *aorta carotis interna* (innere Halsschlagader); med.: medial (mittig); lat.: lateral (seitlich). Adaptiert von (Brierley J. 2017)

Anhand der TNM-Klassifierung wird der Tumor mit Hilfe der Definition der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (*Union for international cancer control*, UICC) weiter in Stadien zur Krankheitsschwere eingeteilt. In dieser Einteilung wird ebenso zwischen p16^{INK4A}-positiven und p16^{INK4A}-negativen OPSCC unterschieden. Die UICC-Stadien und deren Herleitung sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: UICC-Stadien der Tumorklassifizierung.

	p16^{INK4A} - negativ			**p16^{INK4A} - positiv**		
Stadium	T-Status	N-Status	M-Status	T-Status	N-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0	T1, T2	N0, N1	M0
II	T2	N0	M0	T1, T2	N2	M0
				T3	N0, N1	M0
III	T3	N0	M0	T3, T4	N2	M0
	T1, T2, T3	N1	M0			
IVA	T4a	N0, N1	M0	Jedes T (hier nur Stadium IV)	Jedes N	M1
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0			
IVB	Jedes T	N3	M0			
	T4b	Jedes N	M0			
IVC	Jedes T	Jedes N	M1			

Tis: Tumor *in situ* (lokal begrenzt). Adaptiert von (Brierley J. 2017)

1.2.3. Standardtherapie für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx

Auf Basis des Leitlinienprogramms Onkologie für Mundhöhlenkarzinome der Deutschen Krebsgesellschaft (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft,

Deutsche Krebshilfe, AWMF 2021) und der individuellen Situation des Patienten wird eine geeignete Therapie gewählt. Unterschieden wird zwischen einer kurativen Behandlung mit der Möglichkeit zur vollständigen Heilung des Patienten, und einer palliativen Therapie, wenn eine Heilung aufgrund der vorliegenden Diagnose nicht mehr möglich erscheint. Bei kleinen Tumoren genügt häufig eine Operation zur vollständigen Entfernung des Tumors; bei größeren Tumoren wird in der Regel eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie angeschlossen. Bei bewiesenem Befall von Lymphknoten und um eine Metastasierung des Tumors über die Lymphbahnen zu verhindern, kann während der Operation eine Ausräumung der Halslymphknoten (*Neck-Dissection*) durchgeführt werden, bei der die Halslymphknoten, je nach Beurteilung ebenfalls entfernt werden. Hier werden verschiedene Abstufungen vorgenommen (Abb. 6 und Tabelle 4) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2021).

Tabelle 4: Abstufungen bei der Ausräumung der Halslymphknoten bei kurativer Behandlung.

Abstufung	**Gewebe, das entfernt wird**
Radikale Entfernung der Halslymphknoten	Lymphknoten Level I-V 11. Hirnnerv (*Nervus accessorius*) Innere Drosselvene (*Vena jugularis interna*) Großer Kopfwendemuskel (*M. sternocleidomastoideus*)
Modifizierte radikale Entfernung der Halslymphknoten	Lymphknoten Level I-V Erhalt einer oder mehrere Strukturen, die bei einer radikalen radikalen Ausräumung der Halslymphknoten entfernt werden
Selektive Entfernung der Halslymphknoten	Lymphknoten Level I-III
Erweiterte Entfernung der Halslymphknoten	Zusätzliche Lymphknotengruppen oder nicht lymphatische Strukturen

Adaptiert von: (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2021)).

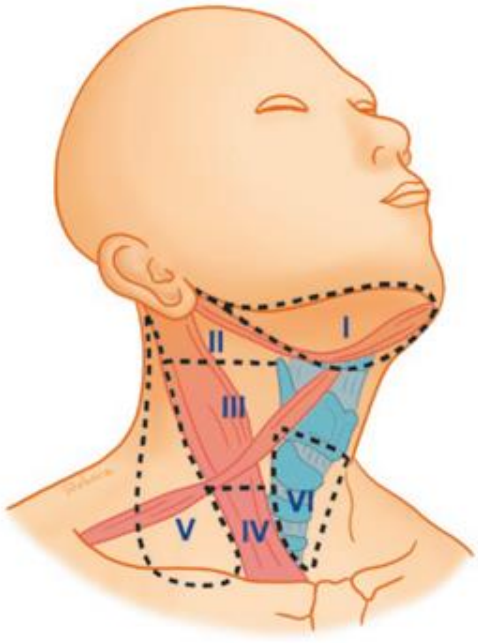


Abb. 6: Lymphknoten Level bei der Ausräumung der Halslymphknoten bei einer sanierenden Operation. Adaptiert aus: (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2021)).

1.3. Vergleich chromosomaler und genetischer Unterschiede zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC

1.3.1. Mutationssignaturen

Abhängig vom auslösenden Faktor der Tumorentstehung (HPV vs. Rauchen/Alkohol oder andere Noxen) unterscheiden sich die Tumorzellen im Mechanismus ihrer Kanzerogenese und in ihrem Mutationsprofil. Einige Studien beschrieben Unterschiede in den Mutationsraten zwischen HPV^+ und HPV^- Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), die den unterschiedlichen Mechanismen der Karzinogenese zugeschrieben wurden (Gaykalova *et al.* 2014; Stransky *et al.* 2011). Stransky *et al.* berechneten eine Mutationsrate von 2,28 Mutationen/Megabase (Mb) in HPV^+ HNSCC verglichen zu 4,83 Mutationen/Mb in HPV^- HNSCC (Stransky *et al.* 2011). Andere Studien dagegen konnten keinen Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der Mutationsfrequenz bei HNSCC finden (Cancer Genome Atlas 2015; Seiwert *et al.* 2015). 2015 untersuchten Wissenschaftler des *The Cancer Genome Atlas Network* (TCGA) Karzinome des Kopf-Hals Bereichs auf somatische Mutationen, Kopienzahl und weitere genetische Aberrationen (Cancer Genome Atlas 2015). Unter den 279 Kopf-Hals Karzinomen waren 33 Tumore aus dem Oropharynx, von denen 66,7 % positiv auf HPV getestet wurden. HPV^+ HNSCC / OPSCC zeigten selten Mutationen im Gen des Tumorproteins 53 (*TP53*) (2,8 % / <0,4 %) und *CDKN2A* (jeweils <0,4 %), aber häufig Mutationen in der helikalen Domäne der Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, katalytische Untereinheit alpha (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*, *PIK3CA*) (36,1 % / 40,9 %) (Cancer Genome Atlas 2015; Cerami *et al.* 2012; Gao *et al.* 2013). Hier sind vor allem die *Hotspot* Mutationen p.Glu542Lys und p.Glu545Lys beschrieben. In HPV^- HNSCC dagegen verteilten sich die Mutationen in *PIK3CA* über das gesamte Gen. Zudem lagen in HPV^- HNSCC in 84,8 % und 25,9 % (HPV^- OPSCC: 81,8% und 18,2%) Mutationen in *TP53* und *CDKN2A* vor (Cancer Genome Atlas 2015).

Eine *Whole-exome* Sequenzierungs (WES)-Studie von Lui *et al.* untersuchte Mutationen verschiedener Signalwege in 151 HNSCC (Lui *et al.* 2013). Dabei sind Komponenten des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs am häufigsten von Mutationen betroffen. Weiterhin waren in einer Subgruppe mit HPV^+ HNSCC *PIK3CA* und die regulatorische Untereinheit alpha der Phosphatidylinositol 3-Kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha, PIK3R1*) die einzigen mutierten Gene. Zudem waren alle Tumore mit Mutationen in mehreren Genen des PI3K-Signalwegs nach klinischer Einteilung mindestens Stadium IV (fortgeschrittenes Stadium). Dies lässt vermuten, dass Mutationen des PI3K-Signalweg zur Tumorprogression beitragen. Eine höhere Mutationslast der Gene *PIK3CA* und des

Phosphatase und Tensin Homologs (*PTEN*) des PI3K-Signalwegs in HPV$^+$ OPSCC wurde auch in einer Studie mit je 20 HPV$^-$ und HPV$^+$ OPSCC detektiert (Lechner *et al.* 2013). Zudem zeigte diese Kohorte eine höhere Mutationsrate des *F-box/WD repeat-containing protein 7* (*FBXW7*) in HPV$^+$ OPSCC. Eine weitere Sequenzierungsstudie mit 120 Tumor- und entsprechend gepaarten gesunden Gewebeproben zeigte eine Häufung von Mutationen in der *DEAD-box helicase 3 X-linked* (*DDX3X*) und der *Fibroblast growth factor receptors 2 and 3* (*FGFR2/3*) in HPV$^+$ HNSCC im Vergleich zu HPV$^-$ HNSCC (Seiwert *et al.* 2015). Weiterhin werden in HPV$^+$ HNSCC Mutationen in *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) beschrieben, obwohl diese generell selten in Plattenepithelkarzinomen detektiert werden (Hayes *et al.* 2015; Prigge *et al.* 2014).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass HPV$^+$ HNSCC weniger Mutationen tragen als Tumore, die durch andere Risikofaktoren bedingt sind. Weiterhin sind aufgrund der Kanzerogenese bei HPV$^+$ OPSCC Mutationen in *TP53* selten und es treten eher Mutation in Genen des PI3K-Sigalwegs auf.

1.3.2. Integration von HPV-DNA in das Wirtsgenom

Nach einer Infektion mit HPV kann die virale DNA im Nukleus episomal, als zirkuläre extrachromosomale DNA, integriert in die DNA der Wirtszelle oder als Hybrid aus episomal/integriert vorliegen (Balaji *et al.* 2021; Morgan *et al.* 2017). In der Literatur wird eine Integration der HPV-DNA bei 40 % bis 90 % der Zervix- und Oropharynxkarzinome beschrieben (Bodelon *et al.* 2016; Gao *et al.* 2019; Holmes *et al.* 2016; Nulton *et al.* 2017; Parfenov *et al.* 2014; Pinatti *et al.* 2021; Speel 2017).

Die Integration von HPV-DNA in das Wirtsgenom führt häufig zu einer Disruption des *E2* Leserahmens, was entsprechend zu einem Verlust der Transkriptionskontrolle der Onkogene *E6* und *E7* führt und als Treiber des neoplastischen Prozesses angesehen wird (Romanczuk *et al.* 1992). Aufgrund einer erhöhten Expression der viralen Onkogene, Veränderung kritischer zellulärer Gene (z.B. Funktionsverlust durch Disruption von Tumorsuppressorgenen oder DNA-Reparaturgenen), der Promotermethylierung und der Transkription durch die Integration können das Wachstum und Überleben der Zelle beeinflusst werden (Rusan *et al.* 2015). Analysen von Zelllinien und Patientenproben bezüglich der Integrationsstellen von HPV-DNA im humanen Genom zeigen Integration sowohl zwischen Gene (intergenisch), als auch innerhalb von (Karzinom-assoziierten) Genen (intragenisch) (Brant *et al.* 2019; Pinatti *et al.* 2018; Walline *et al.* 2016). Ergebniss von Nulton *et al.* und Koneva *et al.* zeigen ein verschlechteres Überleben für Patienten mit HPV-DNA integrierten HNSCC (Nulton *et al.* 2018; Walline *et al.* 2016). Dagegen konnten in anderen Studien kein signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens zwischen Patienten mit episomaler, integrierter

oder gemischt vorliegender HPV-DNA festgestellt werden (Lim *et al.* 2016; Vojtechova *et al.* 2016). Walline *et al.* untersuchten Integrationsstellen in zehn HPV^+ Oropharynxkarzinomen von Patienten mit gutem Therapieansprechen und solchen mit Therapieversagen (Walline *et al.* 2016). In Patienten mit gutem Therapieansprechen lag die Integration von HPV-DNA häufig zwischen zwei Genen, wohingegen bei Patienten mit Therapieversagen die HPV-DNA Integrationsstelle häufiger innerhalb eines Gens lag. Dabei waren Onkogene oder Tumorsuppressorgene häufig von Integration betroffen. In einer weiteren Studie war in 36 $p16^{INK4A}$-positiven HNSCC eine Integration von HPV-DNA mit einem verbesserten Überleben assoziiert (Pinatti *et al.* 2021).
Zusammenfassend liegen inkonsistente Ergebnisse bezüglich der Korrelation des HPV-DNA Integrationsstatus und der Prognose bei Patienten mit HPV^+ HNSCC vor. Anhand der vorliegendenden Daten kann vermutet werden, dass gegebenenfalls auch die Lokalisation der Integration eine Rolle spielt.

1.3.3. Aberrationen in der Kopienzahl genomischer DNA in HPV-getriebenen Kopf-Hals-Tumoren

Über das Genom verteilt, zeigen HPV^- und HPV^+ HNSCC eine ähnliche Verteilung der Kopienzahl genomischer DNA. Amplifikationen werden häufig auf dem langen Arm (q) von Chromosom 1 (1q), 3 (3q), und dem kurzen Arm (*petit*, p) von Chromosom 5 (5p) und 8 (8q) beobachtet, Deletionen häufig in 3p, 5q und 11q (Yang *et al.* 2020a). Allerdings werden auch auf genomischer Ebene Unterschiede zwischen HPV^- und HPV^+ HNSCC gefunden. Eine Inaktivierung des TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 3 (*TRAF3*) durch Deletionen oder Stopp-Codon Mutationen wurde besonders in HPV^+ HNSCC beobachtet, während eine Aberration dieser Region in HNSCC allgemein, ohne gezielte Betrachtung des HPV-Status, sehr selten bis nie detektiert wurde (Cancer Genome Atlas 2015; Hayes *et al.* 2015). Weiterhin wird die Deletion von 11q häufiger in HPV^+ HNSCC gefunden als in HPV^- (Hayes *et al.* 2015; Klussmann *et al.* 2009). Im Vergleich zu HPV^- HNSCC wird bei HPV^+ OPSCC keine Veränderung des Chromosomenabschnitts 9p21.3 beobachtet. In diesem liegt das Gen *CDKN2A*, welches in HPV^- HNSCC häufig deletiert ist (Cancer Genome Atlas 2015; Klussmann *et al.* 2009). Einer der bekanntesten Unterschiede betrifft Chromosom 7, auf dem in HPV^+ im Gegensatz zu HPV^- Tumoren bisher keine Amplifikationen beschrieben wurden (Cancer Genome Atlas 2015; Hayes *et al.* 2015). Hier liegt das *epidermal growth factor receptor* Gen (*EGFR*), welches bereits als Therapietarget genutzt wird (Hayes *et al.* 2015; Mandic *et al.* 2006). Ein weiterer großer Unterschied wird auf Chromosom 3q beschrieben, welches in fast allen HPV^+ HNSCC in der Region der Gene SRY-box 2 (*SOX2*), Tumorprotein 63 (*TP63*) und *PIK3CA* amplifiziert ist (Hayes *et al.* 2015).
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Unterschiede zwischen HPV^+ und HPV^-

HNSCC auf chromosomaler Ebene geringer sind als auf genetischer Ebene. Allerdings kommen Aberrationen weniger einzelner Genabschnitte (z. B. Deletion 11q, Amplifikation 3q) in einer Entität häufiger vor als in der anderen.

1.4. „Flüssigbiopsien“ (*Liquid Biopsy*) in der Tumordiagnostik

Gewebebiopsien sind bisher das verbreiteste Material für die Detektion, das *Staging* und die Prognosestellung von Karzinomen. Allerdings kann Tumorgewebe abhängig von der Lokalisation schwierig erreichbar sein und eine frühe Diagnose ist nicht möglich, wenn der Tumor noch nicht ausreichend ausgebildet und makroskopisch erkennbar ist. Um umfangreiche Krebsscreenings in gesunden Personen durchzuführen, wird ein allgemein-gültiger und kosten-effektiver Ansatz benötigt. In den letzten Jahren lag der Fokus dabei auf Flüssigbiopsien (Chen *et al.* 2019). Bei Flüssigbiopsien kann es sich dabei um jedes „nicht feste“ (ergo flüssiges) Material handeln, das durch nicht-invasive Methoden gewonnen wird. Sie können zur frühen Detektion von Tumoren und Residuen, zur Krankheitsüberwachung und zum Verständnis der Tumorevolution dienen. Das entsprechende Untersuchungsmaterial stammt aus Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel oder Blut und wird unter anderem auf Tumor-DNA und -Mutationen untersucht (Lo *et al.* 1999; Tian *et al.* 2019; Wang *et al.* 2015). In der Tumorforschung wird dabei am häufigsten peripheres Blut, in einigen Fällen auch Speichel, verwendet. Blutproben können zu verschiedenen Zeitpunkten auf zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC), zirkulierende zellfreie DNA (*(circulating) cell-free DNA*, (c)cfDNA oder; im Falle von Tumor-DNA in vielen Publikationen auch als zirkulierende Tumor-DNA (*circulating tumor DNA*, ctDNA) bezeichnet) oder Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) untersucht werden (Abb. 7). Etablierte Bereiche der Flüssigbiopsien sind die Detektion von *EGFR* Mutationen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small-cell lung cancer*, NSCLC) (Jenkins *et al.* 2017; Oxnard *et al.* 2016; Thress *et al.* 2015) und von Eppstein-Barr Virus (EBV)-DNA bei Nasopharynxtumoren (*nasopharyngeal carcinoma*, NPC) (Chen *et al.* 2020; Lo *et al.* 1999; Lv *et al.* 2019). Bei NSCLC wird Plasma cfDNA auf *EGFR* Mutationen als Biomarker für die Therapiesensitivität untersucht; cfEBV-DNA dagegen ist als Marker zur frühen Detektion und als Prognostikator nach der Therapie verifiziert.

Konkordant mit der Fachliteratur wird im weiteren Verlauf der Arbeit der englische Begriff *Liquid Biopsy* verwendet.

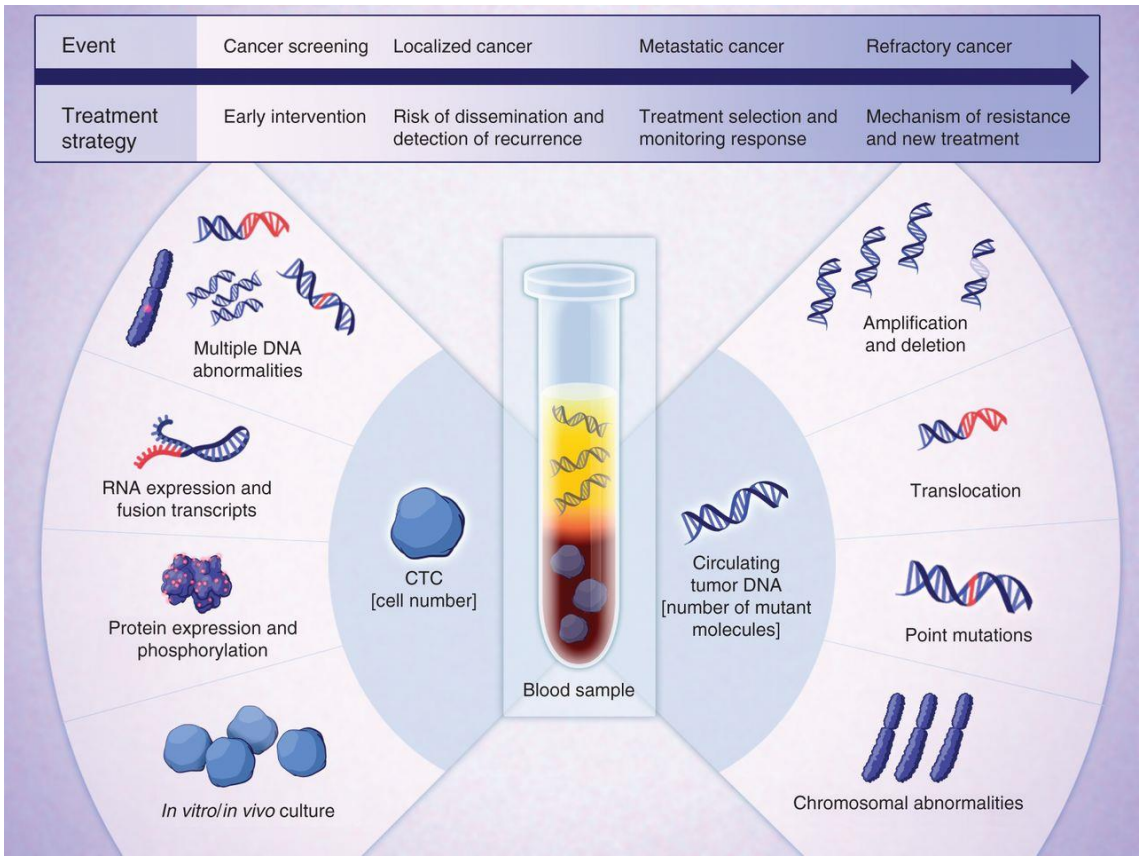


Abb. 7: Klinische Anwendung von CTC und cfDNA Analysen während der Tumortherapie. Darstellung der molekularen Analysen von CTC und cfDNA. Diese können angewendet werden, um Strategien zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Initialdiagnose oder der Therapie zu wählen. (Herausgegeben von (Haber *et al.* 2014)).

1.4.1. Eigenschaften zellfreier-DNA im Plasma

Zell-freie DNA im Blut wurde erstmals 1948 von Mandel und Metais beschrieben (Mandel *et al.* 1948). Es kann sich dabei um genomische, mitochondriale Wirts-DNA, aber auch um Fremd-DNA, beispielsweise von Bakterien oder Viren, handeln. Sie wird von Blutzellen und apoptotischen oder nekrotischen Zellen des Gewebes in den Blutstrom freigesetzt (Abb. 8). Aufgrund des kontrollierten Abbaus der DNA bei der Apoptose durch Endonukleasen entstehen kleinere DNA-Fragmente (Grabuschnig *et al.* 2020) bis zu einer Länge von 70 bis 200 bp (Stroun *et al.* 1987; Ziegler *et al.* 2002). Aufgrund der Windung der DNA um ein Nukleosom ist der Großteil der cfDNA Fragmente 160-170 Basenpaare lang (Jiang *et al.* 2015; Lo *et al.* 2010; Wan *et al.* 2017). Wegen des schnellen, unkontrollierten Prozesses liegen hingegen bei der Nekrose häufiger größere Fragmente mit > 1000 bp vor (Grabuschnig *et al.* 2020). Abhängig von physiologischen und pathologischen Umständen und Methode wird für cfDNA eine Halbwertszeit zwischen 4 Minuten und 12 Stunden beschrieben (Khier *et al.* 2018).

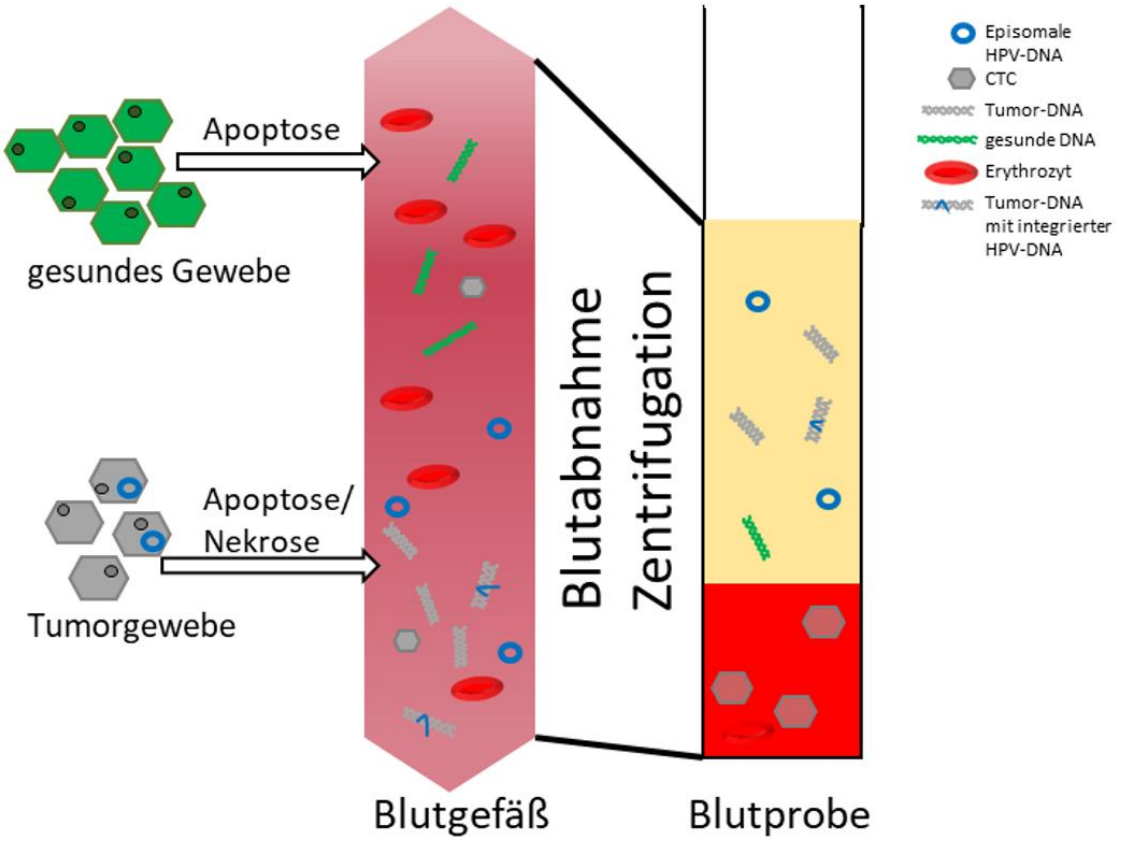


Abb. 8: Schematische Darstellung von Plasma als Flüssigbiopsie.
Zellfreie DNA kann aus gesundem (grüne Zellen) oder Tumorgewebe (graue Zellen) über Apoptose oder Nekrose freigesetzt werden und in den Blutstrom gelangen. Nach Zentrifugation des Bluts setzen sich die Erythrozyten und intakte (zirkulierende Tumor-) Zellen (roter Bereich im Röhrchen rechts) ab, wohingegen die zellfreie DNA im Plasma (gelber Bereich) verbleibt. CTC: zirkulierende Tumorzelle (Herausgegeben von (Wittekindt *et al.* 2018), mit Erlaubnis von © Georg Thieme Verlag KG, Lizenznummer: 5225220645668).

1.5. Hypothese und Ziele

Wir vermuten, dass Patienten mit HPV$^+$ OPSCC mit LR/FM mehr Mutationen in Tumor-assoziierten Genen aufweisen als Patienten mit HPV$^+$ OPSCC ohne LR/FM. Weiterhin nehmen wir an, dass Patienten mit HPV$^+$ OPSCC mit LR/FM aufgrund des reduzierten Therapieansprechens und des erhöhten Rezidivrisikos ein ähnliches Mutationsprofil aufweisen wie Patienten mit HPV$^-$ OPSCC. Demzufolge sollten Unterschiede zu finden sein, die spezifisch für die entsprechende Patientengruppe sind und für diagnostische Zwecke genutzt werden können. Weiterhin wollten wir analog zu hämatopoetischen Karzinomen Tumor-spezifische Mutationen und Virus-DNA im Blutplasma der Patienten mittels quantitativer Polymerasekettenreation (*polymerase chain reaction*, qPCR) und Sequenzierung detektieren und damit das Therapieansprechen und den Krankheitsverlauf monitorieren.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung spezifischer genetischer Tumormarker, die zur Überwachung der minimalen Resterkrankung (*minimal/measurable residual disease*,

MRD), sowie zur Identifizierung von Patienten mit OPSCC und einem erhöhtem Risiko für ein Rezidiv dienen könnten.

2. Ergebnisse

2.1. Nachweis von HPV-DNA in Plasma von Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC vor und nach der Therapie

Plasma Cell-free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Henrike Reder, Victor F. Taferner, Claus Wittekindt, Andreas Bräuninger, Ernst-Jan M. Speel, Stefan Gattenlöhner, Gregor Wolf, Jens P. Klussmann, Nora Würdemann, Steffen Wagner

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol 22 , No 10, November 2020
(doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002)

Als Grundlage für die weiteren Arbeiten wurde in dieser Studie retrospektiv der Nachweis viraler HPV-DNA im Plasma von Patienten mit HPV^+ OPSCC im Krankheitsverlauf untersucht. Wir zeigen mittels quantitativer *Real-Time* PCR, dass im Gegensatz zu Patienten mit HPV^- OPSCC HPV-DNA im Plasma der Patienten mit HPV^+ OPSCC nachweisbar ist. Durch Analyse der Grenzwertoptimierungskurve (*receiver operating characteristic*, ROC-Kurve) für *E6* und *E7* cfDNA Kopien pro Milliliter Plasma in prä-Therapie Proben von HPV^+ und HPV^- OPSCC Patienten wurde ein Schwellenwert für die Positivität der Proben bestimmt. Im zweiten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Virus-DNA Last im Plasma nach erfolgreicher Therapie signifikant abnahm und bei klinisch Karzinom-freien Patienten auf einem niedrigen Niveau blieb. Im Gegensatz dazu wurde bei Patienten, die einen klinisch dokumentierten Rückfall erlitten, retrospektiv in Proben, die zeitlich vor der klinischen Diagnose des Rezidivs abgenommen wurden, ein erneuter Anstieg der DNA-Viruslast nachgewiesen.

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 22, No. 11, November 2020

ELSEVIER

the Journal of Molecular Diagnostics
jmdjournal.org

Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene *E6* and *E7* DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Check for updates

Henrike Reder,* Victor F. Taferner,* Claus Wittekindt,* Andreas Bräuninger,† Ernst-Jan M. Speel,‡ Stefan Gattenlöhner,† Gregor Wolf,* Jens P. Klussmann,*§¶ Nora Wuerdemann,*§¶ and Steffen Wagner*

From the Departments of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery and Pathology,† Justus-Liebig University Giessen, Giessen, Germany; the Department of Pathology,‡ GROW School for Oncology and Developmental Biology, Maastricht University Medical Centre, Maastricht, the Netherlands; the Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery,§ Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany; and the Center for Molecular Medicine Cologne,¶ University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany*

Accepted for publication August 3, 2020.

Address correspondence to Steffen Wagner, Dr. rer. nat., Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Justus-Liebig University Giessen, Aulweg 128 (ForMED), Giessen 35392, Germany. E-mail: steffen.wagner@hno.med.uni-giessen.de.

Persistent human papillomavirus (HPV) infection is associated with the development of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC), and increasing incidences of OPSCC are reported. The generally favorable treatment outcome in patients with HPV-driven OPSCC has brought de-escalation of treatment into discussion. Nevertheless, 13% to 25% develop a relapse within two years after current standard treatment. New biomarkers are urgently required to monitor therapy response, tumor burden, and minimal residual disease during follow-up. This observational study examined 50 patients with OPSCC to investigate plasma cell-free (cf) HPV-DNA derived from tumor cells before therapy and during follow-up. Real-time quantitative PCR was applied to quantify the DNA concentration of HPV oncogenes *E6* and *E7*. A total of 85.7% of pretreatment samples from patients with HPV-driven OPSCC ($n = 28$) were positive for at least one marker, and cfHPV-DNA concentration increased with tumor size. Virtually no signals were detected in HPV-negative OPSCC patients ($n = 20$; $P \leq 0.001$). Patients without clinical evidence of recurrence had significantly reduced cfHPV-DNA concentrations after therapy ($P \leq 0.001$). Conversely, cfHPV-DNA levels increased or remained above threshold in five patients who had residual disease or developed recurrence. In conclusion, plasma cfHPV-DNA detection correlates with the clinical course of disease in patients with HPV-driven OPSCC. Consequently, extensive clinical investigation should be considered if cfHPV-DNA is detected during follow-up of patients with HPV-driven OPSCC. *(J Mol Diagn 2020, 22: 1333–1343; https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.002)*

The incidence of head and neck squamous cell carcinoma has decreased in recent years. Nevertheless, in 2018, around 700,000 cases (oropharynx, 92,900) were newly diagnosed worldwide, and a high mortality rate of around 50% is reported.[1] In contrast, incidences of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) are increasing in many developed countries, and infection with high-risk human papillomavirus (HPV) has been attributed to this increase.[2–5] Compared with patients with HPV-negative OPSCC, those with HPV-driven OPSCC have a significantly better prognosis regarding treatment response and overall survival.[6] This finding has led to the design of clinical trials to investigate treatment de-escalation in HPV-driven OPSCC. However, in phase 3 de-escalation chemoradiotherapy trials, in which the standard treatment cisplatin was replaced by the putatively less toxic monoclonal antibody cetuximab against the epidermal growth factor receptor, survival outcomes were inferior in the cetuximab arm.[7,8] It is unclear to this point if cetuximab presents an appropriate agent as

Supported by Rhön-Klinikum AG grant FL46 (J.P.K.) and the Verein zur Förderung der Krebsforschung in Gießen e.V. (C.W.). H.R. was employed by both funds.

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

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

Disclosures: None declared.

Copyright © 2020 Association for Molecular Pathology and American Society for Investigative Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.002

choice of therapy for de-escalation settings, whereas in patients with $p16^{INK4A}$-positive (see below) OPSCC, epidermal growth factor receptor overexpression is not a typical finding.[9] Even following current standard treatment, recurrence is observed within two years in 13% to 25% of patients with HPV-driven OPSCC.[10] When considering this recurrence rate and especially with regard to a potential de-escalation of treatment, valid biomarkers are required to monitor therapy response, identify minimal residual disease, and assist in early detection of recurrent cancer.

HPV infects undifferentiated cells in the basal layer of epithelia (basal stem cells) or transiently dividing cells of wounded epithelia.[11] In its replication cycle, HPV does not cross the basement membrane, and viral particles or HPV-derived DNA are usually absent in the blood during noncancerous HPV infections.[12,13] HPV type 16 (HPV_{16}) is detected in about 90% of HPV-driven OPSCC.[2] HPV_{16}-DNA encodes two structural proteins (L1 and L2) that form the viral capsid and are only expressed in differentiated cells of upper epithelial layers. Among six regulatory proteins, E6 and E7 have prominent oncogenic activity. E6 targets p53 for ubiquitination and subsequent degradation.[14] E7 binds the retinoblastoma protein, inhibiting the interaction with the transcription factor E2F and inducing uncontrolled transition into the cell cycle synthesis phase.[14] Both oncogenic activities are hallmarks of HPV-induced carcinogenesis, and in particular the activity of E7 is associated with overexpression of the tumor suppressor protein cyclin-dependent kinase inhibitor 2A ($p16^{INK4A}$),[15] a surrogate marker for HPV-driven cancers.

Cell-free DNA (cfDNA) in the blood was first described by Mandel and Metais[16] in 1948. It is released into the bloodstream from nucleated blood cells and apoptotic and necrotic tissue cells. The size of circulating cfDNA varies from relatively small to large fragments of up to 21 kb.[17,18] Most cfDNA fragments are approximately 70 to 200 bp in size, which corresponds to the length of DNA wrapped around a nucleosome and the histone H1.[18] The total cfDNA concentration is elevated in patients of different cancer entities compared with healthy controls.[17,19,20] Today, minimally invasive sampling of urine, saliva, or blood, also called a liquid biopsy, is used to examine cfDNA, focusing on the identification of tumor-specific DNA mutations.[21–26] Because of its size and foreign nature, cell-free (cf) HPV-DNA is also an easily detectable tumor-specific DNA that can be readily distinguished from cellular DNA. Therefore, cfHPV-DNA is a promising biomarker to monitor therapy response in HPV-driven cancer. In a recent study, multianalyte digital PCR assays were used to quantify circulating tumor HPV-DNA in plasma, demonstrating a rapid clearance of HPV-DNA in patients with HPV-driven OPSCC treated with definitive chemoradiotherapy.[27] This study investigates the clinical utility of cfHPV-DNA in plasma of patients with HPV-driven OPSCC to monitor cancer progression in a multimodal treatment setting, including surgery. It is hypothesized that the concentration of cfHPV-DNA decreases and/or disappears after successful treatment. Accordingly, an increase during follow-up care is expected in case of residual disease and/or local or distant recurrence of disease.

Materials and Methods

Patient Selection

This pilot observational study included 30 patients with HPV_{16}-driven OPSCC and an additional 20 patients with HPV-negative OPSCC as control. Regardless of HPV status, all patients received conventional treatment according to local guidelines (chemoradiation or surgery, followed by adjuvant therapy) between July 2014 and December 2017 at the University Hospital of Giessen (Figure 1A). Clinical information was retrieved from patient's records and the local cancer registry. Tumor staging was performed according to American Joint Committee on Cancer manual, eighth edition.[28]

Blood samples were collected following treatment of 30 patients diagnosed with a $p16^{INK4A-}$ and HPV_{16}-DNA− positive OPSCC; in 28 of these cases, pretreatment samples were also available (Figure 1A). Of two patients with recurrence, only post-treatment blood samples were available. In these two cases, the measurement of the first available post-treatment sample was included as substitute for pretreatment sample as these patients experienced residual disease. HPV-negative OPSCC patients ($n = 20$) with pretreatment blood sample were randomly selected as control. HPV status was determined in routine diagnostics by immunohistochemical staining of $p16^{INK4A}$ (E6H4 clone; CINtec Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)[29–31] and detection of HPV-DNA using PCR and reverse hybridization with the RDB2270 HPV Easy-Typing kit, according to the manufacturer's recommendations (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany).[32] HPV-driven OPSCC was defined by positivity for $p16^{INK4A}$ and high-risk HPV_{16} DNA; HPV negativity was defined by negativity for both $p16^{INK4A}$ and HPV-DNA. OPSCC cases with discordant test results were excluded from this study. The study was approved by the local institutional review board (votes of the ethics committee; reference number 95/15).

Plasma Sampling and Cell-Free DNA Isolation

Whole blood from 28 patients (except two, see above) was collected before primary treatment. Additional blood samples were drawn from patients with HPV-driven OPSCC at varying time points after treatment, depending on patient's follow-up schedule. Blood was drawn in Cell-Free DNA BCT (Streck, La Vista, NE) and centrifuged at $515 \times g$ for 10 minutes at room temperature within 24 hours. Plasma aliquots were stored below −80°C until further analysis.

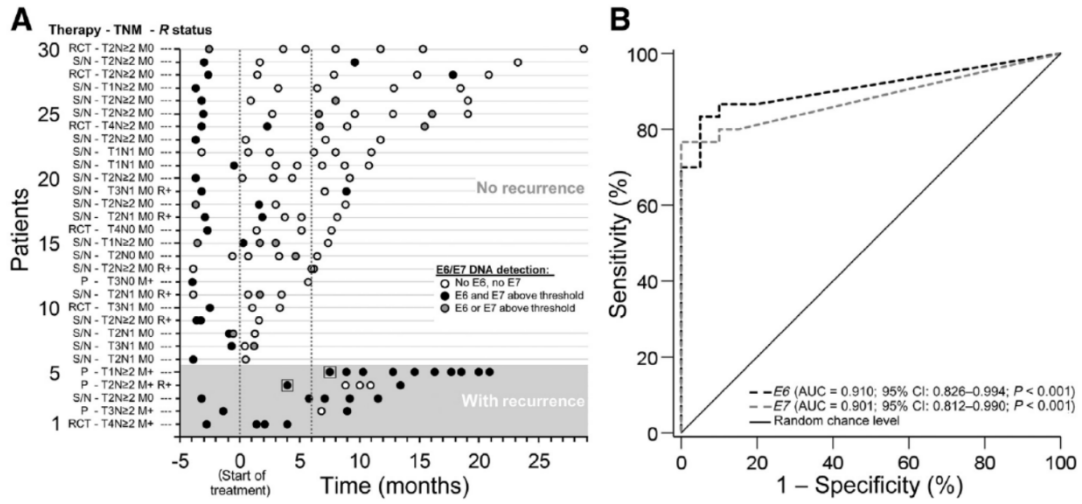


Figure 1 Sampling time points of patients with human papillomavirus (HPV)–driven oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) and receiver operating characteristic (ROC) curve analyses of pretreatment *E6* and *E7* detection to differentiate between HPV-driven and HPV-negative OPSCC. **A:** Sampling time points are given for all patients with HPV-associated OPSCC included in the study. Samples taken under active treatment were not analyzed. Patient's therapy and tumor characteristic [tumor-node-metastasis (TNM)] is indicated. **Vertical dashed lines** indicate time points used in further investigations (Figure 3). Closed/open circles correspond to samples with/without HPV *E6* and/or *E7* cell-free DNA (cfDNA) copies/mL above threshold, determined by ROC curve analyses (Figure 1B). Two time points (circles surrounded by boxes) were investigated as substitute for missing pretreatment samples (details in *Materials and Methods*). **B:** ROC curve analyses of HPV *E6* and *E7* cfDNA copies/mL in pretreatment liquid biopsies from patients with HPV-driven and HPV-negative OPSCC detected by real-time quantitative PCR. The area under the curve (AUC) values generated by ROC curve analysis for *E6* and *E7* are displayed. The maximum of the Youden index accounts for threshold values of >66 (*E6*) and >272 (*E7*) copies of HPV-DNA per mL plasma for HPV positivity of OPSCC. $n = 30$ patients with HPV-driven OPSCC, $n = 20$ patients with HPV-negative OPSCC (**B**). P, palliative treatment; R+, incomplete tumor resection documented; RCT, definitive chemoradiotherapy; S/N, upfront surgery, including neck dissection.

Circulating cfDNA was isolated from 500 μL plasma with the Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada) following manufacturer's protocol. DNA was eluted in 30 μL of supplied elution buffer. cfDNA was stored at −20°C until further processing.

qPCR

Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the Luna Universal Probe qPCR Master Mix (NEB, Ipswich, MA) in a final volume of 15 μL per reaction, all in triplicates. The β-globin (*HBB*) gene was used as marker to ensure DNA integrity for each sample, and no-template controls were included as negative control. Briefly, 2× Luna Universal Probe qPCR Master Mix was diluted to 1× by adding primers, probes, and 4 μL template (final concentrations, 200 nmol/L for *E6* and *E7* primers, 300 nmol/L for β-globin primer, and 166 nmol/L for each probe). qPCR primers and probes were synthesized by Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), and sequences can be retrieved from Table 1. Optimal annealing temperature

Table 1 Primer and Probe Sequences with Respective Melting Temperature and Amplicon Size of the qPCR Assay

Description	Sequence	Melting temperature, °C	Product length, bp
HPV_{16} *E6* forward primer	5′-GCACCAAAAGAGAACTGCAATG-3′	55.1	81
HPV_{16} *E6* reverse primer	5′-GTTTGCAGCTCTGTGCATAACTG-3′	56.9	
HPV_{16} *E6* probe	5′-**JOE**-AGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC-**BHQ1**-3′	65.8	
HPV_{16} *E7* forward primer	5′-CAGCTCAGAGGAGGAGGATG-3′	56.7	67
HPV_{16} *E7* reverse primer	5′-GTAATGGGCTCTGTCCGGT-3′	57.0	
HPV_{16} *E7* probe	5′-**FAM**-AGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG-**BHQ1**-3′	66.7	
β-Globin forward primer	5′-GACACCATGGTGCATCTGAC-3′	56.1	137
β-Globin reverse primer	5′-TTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTGT-3′	56.0	
β-Globin probe	5′-**TAMRA**-AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTG-**BHQ2**-3′	63.8	

The 5′ and 3′ modifications of qPCR probes are in bold.

BHQ, black hole quencher dye; FAM, carboxyfluorescein (fluorescent dye); HPV_{16}, human papillomavirus type 16; JOE, 6-carboxy-4′,5′-dichloro-2′,7′-dimethoxyfluorescein (fluorescent dye); qPCR, real-time quantitative PCR; TAMRA, carboxytetramethylrhodamine (fluorescent dye).

Table 2 Characteristics of Patients with HPV-Driven ($n = 30$) and HPV-Negative ($n = 20$) OPSCC

	HPV-driven OPSCC		HPV-negative OPSCC		
Characteristic	*n*	%	*n*	%	*P* value
Age, years					
≥60	18	60	10	50.0	0.485
<60	12	40	10	50.0	
Median	64.9		59.9		0.181*
Mean	65.1		61.3		
Max	91.7		75.2		
Min	47.3		46.5		
Sex					
Male	24	80.0	17	85.0	0.724†
Female	6	20.0	3	15.0	
Tumor stage					
T1/T2	22	73.3	11	55.0	0.180
T3/T4	8	26.6	9	45.0	
Node stage					
N0	3	10.0	6	30.0	0.195
N1	9	30.0	5	25.0	
N ≥ 2	18	60.0	9	45.0	
Metastasis stage					
M0	25	83.3	16	80.0	1.0†
M+	5	16.6	4	20.0	
Tumor grade (AJCC manual, 8th edition)					
1	11	36.7	2	10.0	**0.012**
2	9	30.0	2	10.0	
3	3	10.0	3	15.0	
4	7	23.3	13	65.0	
Smoking					
Yes (≥10 pack-years)	13	46.4	18	100.0	**<0.001**
No (<10 pack-years)	15	53.6	0	0.0	
Missing	2		2		
Alcohol					
Yes (≥2 glasses/day)	2	9.1	5	38.5	0.075†
No (<2 glasses/day)	20	90.9	8	61.5	
Missing	8		7		
Palliative treatment					
Yes	4	13.3	2	10.0	1.000†
No	26	86.7	18	90.0	
Surgery of primary tumor					
Yes	19	63.3	15	75.0	0.386
No	11	36.7	5	25.0	
Curative treatment type					
Upfront surgery without ND	0	0.0	1	5.6	0.292
Upfront surgery including ND	20	76.9	14	77.8	
Definitive radiotherapy	0	0.0	1	5.6	
Definitive chemoradiotherapy	6	23.1	2	11.1	
Resection status of surgery					
R0	13	76.5	8	66.7	0.683
R+	4	23.5	4	33.3	
Unknown	2		3		

P values for comparison of HPV-negative versus HPV-driven OPSCC (asymptotic, two sided); significant *P* values ($P \leq 0.05$) are in bold. Values calculated by χ^2 test unless otherwise noted.

*Calculated by *t*-test.

†Calculated by Fisher exact test.

AJCC, American Joint Committee on Cancer; HPV, human papillomavirus; Max, maximum; Min, minimum; ND, neck dissection; OPSCC, oropharyngeal squamous cell carcinoma.

was established by gradient PCR. Cycling conditions were as follows: 95°C for 1 minute, followed by 48 cycles of a two-step thermal profile of 15 seconds at 95°C and 30 seconds at 59°C. qPCR data were analyzed with QuantStudio Design & Analysis Software version 1.4.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). At least two of the triple measurements had to be positive, with a Ct value above standard for one copy/reaction and an SD of ≤0.25.

The cell line UM-SCC-104[33] (kindly provided by Dr. Thomas E. Carey, University of Michigan, Ann Arbor, MI) carries one copy of HPV[34] and was used as standard. It was cultured under standard conditions [RPMI 1640 medium with L-glutamine (both from Sigma-Aldrich) and 10% fetal bovine serum, 5% CO_2, 37°C), was *Mycoplasma* free, and was authenticated in July 2019. DNA was isolated using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) and quantified with the NanoDrop 2000c spectral photometer (Thermo Fisher Scientific), and measured DNA concentration was calculated into diploid human genome copies (one copy equals 6.61 pg). Extracted DNA was diluted to 1, 10, 100, 1000, and 10,000 copies per reaction, which equals 2.5×10^2, 2.5×10^3, 2.5×10^4, 2.5×10^5, and 2.5×10^6 copies per milliliter (Supplemental Figure S1). Standard dilutions were run in parallel for each experiment. The concentration of cfHPV-DNA of patient's samples was calculated in comparison to the standard and indicated in copies per milliliter plasma.

The expected size of the amplicons was confirmed by electrophoretic separation using 14% polyacrylamide 0.5× Tris-borate-EDTA gels and staining of the DNA (Midori Green Advance DNA Stain; Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany), and by capillary gel electrophoreses with the High Sensitivity DNA Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies Germany GmbH & Co., Frankfurt am Main, Germany).

Statistical Analysis

Statistics were performed using the SPSS statistical software version 26 (IBM, Chicago, IL). Qualitative and quantitative data were compared using *U*-test for independent samples and Wilcoxon-rank test for dependent samples. A receiver operating characteristic curve analysis of pretreatment *E6* and *E7* cfDNA levels in liquid biopsies was performed in relation to HPV status of the OPSCC (Figure 1B). A threshold for *E6* and *E7* cfDNA positivity in liquid biopsies was set to the maximum of the Youden index. Significance of results was expected for $P \leq 0.05$.

Results

Patient Characteristics and Liquid Biopsy Samples

Patient characteristics regarding stage, risk factors, and treatment are summarized in Table 2.

Samples were received from 28 patients with HPV-driven OPSCC before treatment and during follow-up (Figure 1A). Of two patients, only follow-up samples were included retroactively. For these cases, the first available post-treatment sample was included as substitute for the pre-treatment sample, because these patients had a tumor recurrence at the time of blood sampling and were not free of disease. The median time to the first collected post-treatment sample is 4.4 months (range, 1.1 to 10.3 months after end of treatment). On average, 3.4 (range, 1 to 7) follow-up samples with a median of 8.1 (range, 1.1 to 31.3) months after the end of treatment were collected.

Pretreatment Cell-Free HPV-DNA Concentrations

Receiver operating characteristic curve analysis of cfHPV *E6* and *E7* DNA detection by qPCR in pretreatment liquid biopsies demonstrates that qPCR is able to efficiently discriminate between patients with HPV-driven and HPV-negative OPSCC. Area under the curve values are 0.910 for *E6* and 0.901 for *E7* (Figure 1B). Maximum of the Youden index indicates threshold values of >66 (*E6*) and >272 (*E7*) copies of HPV-DNA per mL plasma for HPV positivity of OPSCC to maximize sensitivity and specificity. Using these values, all measurements were classified pretreatment and during follow-up (Figure 1A). The performance of *E6* and *E7* cfDNA detection by qPCR in

Table 3 Performance of *E6* and *E7* cfDNA Detection by qPCR in Pretreatment Liquid Biopsies in Comparison to HPV Status Assessment on OPSCC Tissue by HPV-DNA Detection and $p16^{INK4A}$ Immunohistochemistry

Liquid biopsy (pretreatment) cfHPV-DNA qPCR test	OPSCC tissue HPV status (HPV-DNA and $p16^{INK4A}$ immunohistochemistry)		Specificity, %	Sensitivity, %	Accuracy, %
	Negative (n = 20)	Positive (n = 30)			
E6, positive/negative	1/19	25/5	95	83	88
E7, positive/negative	0/20	24/6	100	80	88
E6 and *E7*, positive/negative	0/20	23/7	100	77	86
E6 or *E7*, positive/negative	1/19	26/4	95	87	90

Cf, cell free; HPV, human papillomavirus; OPSCC, oropharyngeal squamous cell carcinoma; qPCR, real-time quantitative PCR.

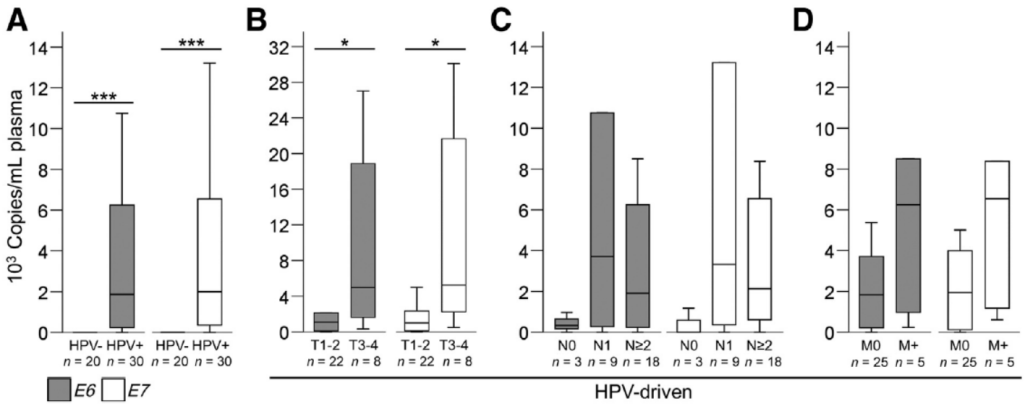


Figure 2 Comparison of human papillomavirus (HPV) type 16 *E6* and *E7* cell-free DNA (cfDNA) levels in different patient groups. Concentration of *E6* and *E7* cfDNA in pretreatment plasma of patients with HPV-driven and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC; **A**) and patients with HPV-driven OPSCC stratified by tumor size (T1-2 versus T3-4; **B**), lymph node status (N0 versus N1 versus N ≥ 2; **C**), and distant metastasis (M0 versus M+; **D**). Gray (*E6*) and white bars (*E7*) indicate the 25th and 75th percentiles; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles. *P* values were calculated using *U*-test for independent samples. $*P \leq 0.05$, $***P \leq 0.001$.

pretreatment liquid biopsies was tested in comparison to HPV status determination (Table 3). All patients with HPV-negative OPSCC had no *E6* and *E7* cfDNA levels above threshold pretreatment except one case, which was positive for *E6* (292 copies/mL). Conversely, *E6* and/or *E7* cfDNA levels above threshold were detected in 24 of 28 patients (85.7%) with HPV-driven OPSCC before treatment and in 2 of 2 additional patients (100%) with known residual disease at the first post-treatment sampling point [in total, 26/30 (86.7%); $P \leq 0.001$] (Figure 2A). Before treatment, neither *E6* nor *E7* cfDNA was detected in four patients with HPV-driven OPSCC, and only one HPV target was detected in three patients (Figure 1A).

Regarding tumor characteristics, the median copy numbers of *E6* and *E7* cfDNA per mL plasma were significantly higher in larger tumors (*E6*: $P = 0.035$; *E7*: $P = 0.031$) (Figure 2B). Also, in lymph node–positive patients (Figure 2C) and in patients with distant metastases (Figure 2D), the mean copy numbers of *E6* and *E7* cfDNA per mL plasma were higher than in patients without metastases, although not reaching statistical significance. Seven patients with either *E6* or *E7* or none of the HPV targets detected pretreatment did not have remarkably lower tumor burden (each with either tumor > T1 or node positive) (Figure 1A).

Cell-Free HPV-DNA in Patients with Tumor Control during Follow-Up

E6 and *E7* cfDNA concentrations were investigated in follow-up samples from patients with HPV-driven OPSCC who presented without evidence of disease at routine examination, and the values were compared with those of plasma samples before treatment. Overall, levels of *E6* and *E7* cfDNA in pretreatment samples were significantly higher than the average of all respective post-treatment samples [*E6* mean (range): 9283 (0 to 79,850) versus 99 (0 to 756) copies/mL plasma ($P \leq 0.001$); *E7* mean (range): 12,699 (0 to 150838) versus 162 (0 to 1533) copies/mL plasma ($P \leq 0.001$)] (Figure 3). At the level of the individual patient, *E6* and *E7* cfDNA copy numbers dropped below threshold in most cases after treatment (Figure 1A). In only four cases (numbers 15, 17, 18, and 24), positivity for both

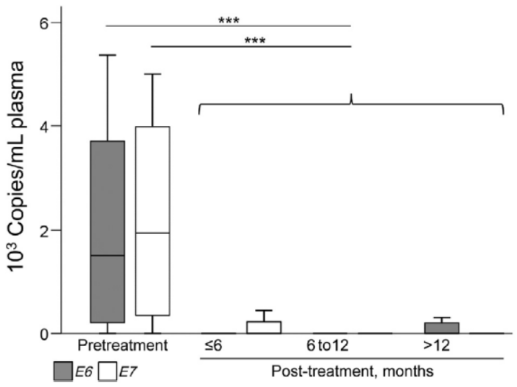


Figure 3 Comparison of human papillomavirus (HPV) type 16 *E6* and *E7* cell-free DNA levels pretreatment and post-treatment in patients with HPV-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma without recurrence. Plasma samples from 25 patients who were disease free after treatment, according to routine clinical examination, were investigated. Post-treatment samples are summarized in three time periods, as indicated in Figure 1A. Gray (*E6*) and white (*E7*) bars indicate the 25th and 75th percentiles; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles. *P* values were calculated using Wilcoxon rank test for dependent samples (with an average of respective samples for the post-treatment period in comparison to pretreatment). $***P \leq 0.001$.

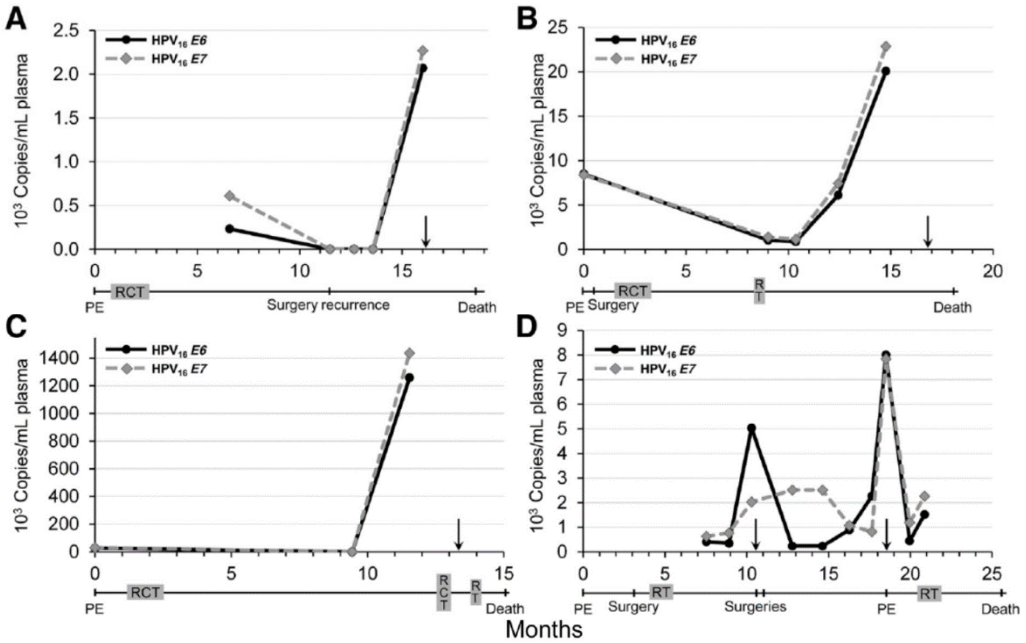


Figure 4 *E6* and *E7* cell-free DNA copy numbers in relation to the treatment schedule of patients with human papillomavirus (HPV)–driven oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) with recurrence. **Arrows** indicate the time of relapse diagnosed by routine examination. **A:** This patient developed recurrent disease in neck nodes 16 months after treatment of the primary OPSCC. **B:** A case with HPV-positive lung, liver, and bone metastases 17 months after the diagnosis of OPSCC. **C:** A case with pre-existing lymph node and lung metastasis that developed cranial metastasis in the course of the disease. **D:** A case with lymph node metastasis 10.6 months and HPV-driven lung metastasis 18.5 months after primary diagnosis. **Solid black line:** *E6*; **dashed gray line:** *E7*. HPV_{16}, HPV type 16; PE, time of first biopsy; RCT, radiochemotherapy; RT, radiotherapy.

DNA markers was detected in the first post-treatment sample, whereas in all cases, signals dropped below the threshold of both markers at the next sampling point. Eight cases showed sporadic positivity of one or two of the cfHPV-DNA targets in a post-treatment sample, before or after one or two negative liquid biopsies. The last post-treatment plasma sample was positive for one or two cfHPV-DNA targets in 3 of 25 patients (12%; Patients 7, 19, and 24). However, this occurred with a limited follow-up time for Patient 7 (Figure 1A). Two patients (Patients 15 and 24) had persistent positivity of one or both cfHPV-DNA targets within the first 6 months after treatment. Patient 24 had high tumor burden (T4aN2b) and was treated without surgery, whereas Patient 15 had a small primary tumor as well as a lymph node metastasis (T1N2), including extracapsular spread.

Cell-Free HPV-DNA in Patients with Recurrence

An increase or continuity in *E6* and *E7* cfDNA levels in sequential samples was observed during follow-up in 5 of 30 patients (16.7%) with HPV-driven OPSCC. As depicted in Figure 4, four patients (Patients 2 to 5) (Figure 1A) were diagnosed with local or distant recurrence during routine examinations. Three patients showed a decrease in *E6* and *E7* cfDNA concentration after treatment and an increase before recurrence was diagnosed (Figure 4, A–C). The fourth patient exhibited a more erratic course of plasma viral oncogene levels (Figure 4D). However, this case developed lymph node metastases 10.6 and 18.5 months after diagnosis of the primary tumor, which corresponded to peaks in the measured *E6* and *E7* cfDNA concentration. One patient with recurrence (Patient 1) (Figure 1A) showed positivity for *E6* and *E7* cfDNA above threshold in all post-treatment blood samples, with a decrease at the last data point for both cfHPV-DNA targets (not shown). Unfortunately, no additional data are available before death of the patient (month 6.6 after treatment).

Discussion

The outcome of HPV-driven OPSCC is much more favorable than that of HPV-negative OPSCC following current therapy standards. This is the rationale for the investigation of treatment de-escalation to spare treatment-related toxicity in patients with HPV-driven OPSCC. However, the failure of two phase 3 de-escalation chemoradiotherapy trials[7,8] demonstrates the need to monitor treatment response to identify early on during treatment those patients who do not benefit from de-escalation. In addition, there is a relevant subgroup of patients with HPV-driven OPSCC who develop recurrence following current standard treatment.

Noninvasive liquid biopsies are a growing field of research and can be used to monitor treatment response and tumor burden/minimal residual disease during follow-up as well as to understand cancer evolution.[18,35–38] An established field for cfDNA detection in liquid biopsies is testing for epidermal growth factor receptor mutations in patients with non–small-cell lung cancer for treatment decision (eg, when tissue biopsies are not available).[24–26] Respective tests have reached Food and Drug Administration approval and are in clinical use.

An important problem in the analysis of liquid biopsies is the selection of suitable genetic markers to be monitored. In leukemia, it has been shown that somatic mutations can serve as such markers.[39] However, tumors are heterogeneous, and selection processes during therapy may promote the outgrowth of cell clones that were underrepresented in the primary disease. As a consequence, genetic markers of these clones could not be selected for further monitoring because of underrepresentation. Compared with somatic mutations and in terms of clonal selection, the DNA of a tumorigenic virus is a more stable marker, as tumor growth usually depends on the activity of the encoded viral oncoproteins. Liquid biopsies might therefore be particularly suitable for patients with virus-driven malignancies. In patients with nasopharyngeal carcinoma, the detection of Epstein-Barr virus cfDNA in plasma is an established biomarker and a prognosticator after therapy.[40,41] The current study investigated whether cfHPV-DNA in plasma of patients with HPV-driven OPSCC is a useful tool to monitor the course of the disease and possibly detect recurrence before classic diagnostics. *E6* or *E7* cfDNA was detected in 86.7% of patients with HPV-driven OPSCC (26/30) in pretreatment liquid biopsies [24/28 (85.7%)], and in patients with known residual disease [2/2 (100%)] at the first post-treatment blood sampling point. Only one case with HPV-negative OPSCC showed *E6* cfDNA levels above threshold. This OPSCC did not overexpress $p16^{INK4A}$ and was HPV-DNA negative by type-specific hybridization for HPV 16, 18, 45, 6, 11, and the 30 and 50 subgroups. The lifestyle and clinical data of this patient (T4b; heavy smoking and drinking) are also consistent with an HPV-unrelated OPSCC. Eight patients showed positive HPV oncogene signals in at least two samples after treatment. Among these patients, five developed a recurrence. In line with published data,[27,42] an increase of cfHPV-DNA was observed in four of these five patients with recurrence before the recurrence was diagnosed by routine examination. In one patient, however, the values remained above threshold, but did not increase noticeably after treatment. Of the remaining three patients, one had high tumor burden and was treated with definitive chemoradiotherapy. The remaining two had lower tumor burden, one with reported extracapsular spread. All three patients had presented with the primary tumor between 2015 and 2017, which is within the follow-up time in which recurrence rates are still high.[10] Nevertheless, all three are currently (3.7 to 3.9 years after end of treatment) alive with no tumor-related events reported (Patient 29: 44.5 months; Patient 28: 45.5 months; and Patient 19: 45.2 months) (Figure 2A). The positive measurement in these cases could refer to a minimal residual disease that is not progressive or has cleared without further intervention. Note that the detection of cfHPV-DNA in plasma is not intended to provide information about resistance mechanisms, but only about the fact that a resistance mechanism (of whatever kind) is present when the cfHPV-DNA in the plasma rises again.

Overall, the performance of both cfHPV-DNA qPCR tests used in this study was similar (Table 3). Nevertheless, there was a discrepancy in positivity between *E6* and *E7*, with a slightly higher sensitivity for *E6* and seemingly more specific test results for *E7*. Also, the combination of both tests results in a reasonable performance.

Previously, it was demonstrated that circulating cfHPV-DNA levels before first-line treatment and after therapy have prognostic significance in HPV-driven, advanced anal carcinoma treated with chemotherapy.[43,44] The current study shows that the cfHPV-DNA levels in HPV-driven OPSCC patients correlate with the size of the primary tumors (tumor stage) before treatment (Figure 2B) and with the disease course after treatment (reduction in patients without relapse and a renewed increase in patients who developed relapse). These data thus show that cfHPV-DNA levels reflect a measure of the current tumor burden in patients with HPV-driven OPSCC.

Another study reported a correlation between pretreatment concentration of cfHPV-DNA, nodal stage, and overall disease stage graded by the American Joint Committee on Cancer manual, sixth edition.[45] Results of the current study also found an association between pretreatment cfHPV-DNA and nodal stage as well as the presence of distant metastasis, but not with overall disease burden. These data did not reach statistical significance, likely because most patients with HPV-driven OPSCC presented with node-positive disease (except $n = 3$) and only $n = 5$ had distant metastasis. The lack of an association of the data with the tumor staging according to American Joint Committee on Cancer might indicate that total tumor volume/burden is not adequately implicated in the current tumor staging.

Lee et al[46] investigated locally advanced, HPV-associated head and neck cancer for circulating cfHPV-DNA by next-generation sequencing. Their next-generation sequencing assay *HPV16-detect* could reliably detect HPV relapse in combination with positron emission tomography/computed tomography. However, apart from specific applications and optimized workflows, next-generation sequencing is still a relatively time-consuming and costly method. A fast and less expensive qPCR test may be sufficient to prove the presence or absence of such a clearly defined target, like cfHPV-DNA, in plasma of patients with OPSCC. In contrast to tumor-specific mutations, the detection of cfHPV-DNA does not require knowledge of the presence of individual

mutations that serve as markers, neither known ones for which commercial tests are available nor unknown ones that require sequencing and detailed analysis of the primary tumor in advance. Another weakness regarding tumor-specific mutations is tumor heterogeneity mentioned above: even within one tumor, cells carry different mutational profiles[47] and selected mutations might not occur in the recurrent tumor, which is generally not the case for viral DNA in HPV-driven cancers.

Limitations of this pilot study include the small sample size and inconsistent sampling, which is a concession to the study design. Furthermore, recurrence is a rare event in HPV-driven OPSCC. As a result, this study relied on retroactively collected samples, which is also the reason for inconsistent sampling times. Despite these limitations, the results are consistent with previously published data for HPV-driven OPSCC investigated with digital PCR.[27,42] This underlines the suitability of cfHPV-DNA testing in liquid biopsies independent from experimental techniques used for the analysis. The strengths of the current study are the longitudinal sample collection in relation to treatment and the fact that >75% of the patients received primary surgery, which was not the case in previous studies.[27,42] Consequently, prospective studies with larger cohorts and defined sampling schedules are needed to verify these findings for cfHPV-DNA testing in liquid biopsies from patients with HPV-driven cancers.

Conclusions

Changes in cfHPV-DNA concentration were shown to correlate with the course of disease in HPV-driven OPSCC. Detection of cfHPV-DNA in the plasma of patients with OPSCC is a valid and suitable method to monitor viral oncogene burden in OPSCC and may be considered to monitor response to therapy and identify patients with HPV-driven OPSCC at risk of recurrence. In conclusion, this exploratory study has generated valuable data suggesting that cfHPV-DNA in liquid biopsies is a promising biomarker in HPV-driven OPSCC. Nevertheless, larger cohort studies are needed to verify these findings.

Acknowledgments

We thank Maike Roth for excellent technical support; Magnus von Knebel-Doeberitz, Elena-Sophie Prigge, and colleagues (University Hospital Heidelberg); Stefanie Rudloff, Katharina Sack, Cindy Arnold, and Sebastian Schäfer (University of Giessen) for performing $p16^{INK4A}$ staining and human papillomavirus diagnostics; and Hartwig Gerlach, Markus Kranz, Constanze Georgi, and Hatice Sahinler (University Hospital of Giessen) for support in collecting blood samples.

Author Contributions

S.W., N.W., J.P.K., and C.W. conceptualized the research; S.W. and H.R. developed the methods; V.F.T. performed validation; V.F.T. and H.R. conducted formal analysis; V.F.T. conducted the investigation; H.R., V.F.T., S.W., N.W., and C.W. contributed resources; H.R. wrote the original draft; V.F.T., S.W., N.W., C.W., J.P.K., E.-J.M.S., and G.W. wrote, reviewed, and edited the draft; A.B. and S.G. wrote, reviewed, and edited the draft and contributed resources; H.R., V.F.T., and S.W. conducted visualization; S.W., C.W., and J.P.K. supervised the research; S.W., C.W., N.W., and J.P.K. administered the project; J.P.K., C.W., and S.W. acquired funding; and H.R. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at *http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.002*.

References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F: Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer 2019, 144:1941–1953
2. Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Wurdemann N, Bernhardt K, Pons-Kuhnemann J, Maulbecker-Armstrong C, Klussmann JP: Increasing incidence rates of oropharyngeal squamous cell carcinoma in Germany and significance of disease burden attributed to human papillomavirus. Cancer Prev Res (Phila) 2019, 12:375–382
3. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S: Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. Int J Cancer 2017, 141:664–670
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML: Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. J Clin Oncol 2011, 29:4294–4301
5. Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, Wagner S, Klussmann JP: A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. Cancer Med 2019, 8:1908–1918
6. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst 2008, 100:261–269
7. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Jordan RCK, Zhao W, Sturgis EM, Burtness B, Ridge JA, Ringash J, Galvin J, Yao M, Koyfman SA, Blakaj DM, Razaq MA, Colevas AD, Beitler JJ, Jones CU, Dunlap NE, Seaward SA, Spencer S, Galloway TJ, Phan J, Dignam JJ, Le QT: Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. Lancet 2019, 393:40–50

8. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, McConkey C, Gray A, Dunn J; De-ESCALaTE HPV Trial Group: Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. Lancet 2019, 393:51–60
9. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP: Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. Int J Cancer 2007, 120:1731–1738
10. Faraji F, Eisele DW, Fakhry C: Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope Investig Otolaryngol 2017, 2:10–18
11. Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, Iftner T: The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. J Virol 1996, 70:1912–1922
12. Stanley M: Immunobiology of HPV and HPV vaccines. Gynecol Oncol 2008, 109:S15–S21
13. Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R: Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). J Dtsch Dermatol Ges 2009, 7: 453–466. quiz 466, 467
14. Chung CH, Gillison ML: Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clin Cancer Res 2009, 15:6758–6762
15. McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K: Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 2013, 110:16175–16180
16. Mandel P, Metais P: Nucleic acids in human blood plasma [French]. C R Seances Soc Biol Fil 1948, 142:241–243
17. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA: Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? Cancer Treat Rev 2002, 28:255–271
18. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S: The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. Biomol Detect Quantif 2019, 17:100087
19. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Califano J: Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. Int J Cancer 2006, 119:2673–2676
20. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M: Circulating nucleic acids in plasma or serum. Clin Chim Acta 2001, 313:143–146
21. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N: Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer 2017, 17:223–238
22. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, Bishop JA, Chung CH, Califano JA, Eisele DW, Fakhry C, Gourin CG, Ha PK, Kang H, Kiess A, Koch WM, Myers JN, Quon H, Richmon JD, Sidransky D, Tufano RP, Westra WH, Bettegowda C, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Agrawal N: Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. Sci Transl Med 2015, 7:293ra104
23. Tian J, Geng Y, Lv D, Li P, Cordova M, Liao Y, Tian X, Zhang X, Zhang Q, Zou K, Zhang Y, Li Y, Zhang J, Ma Z, Shao Y, Song L, Owen GI, Li T, Liu R, Liu Q, Zou L, Zhang Z, Li Z: Using plasma cell free DNA to monitor the chemo-radiotherapy course of cervical cancer. Int J Cancer 2019, 145:2547–2557
24. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohe C, Yokoi T, Morabito A, Novello S, Arriola E, Molinier O, McCormack R, Ratcliffe M, Normanno N: ctDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: the ASSESS study. J Thorac Oncol 2016, 11:1682–1689
25. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, Walker J, Dearden S, Webster A, Milenkova T, McCormack R: Gefitinib treatment in EGFR mutated Caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. J Thorac Oncol 2014, 9:1345–1353
26. Webb S: The cancer bloodhounds. Nat Biotechnol 2016, 34: 1090–1094
27. Chera BS, Kumar S, Beaty BT, Marron D, Jefferys S, Green R, Goldman EC, Amdur R, Sheets N, Dagan R, Hayes DN, Weiss J, Grilley-Olson JE, Zanation A, Hackman T, Blumberg JM, Patel S, Weissler M, Tan XM, Parker JS, Mendenhall W, Gupta GP: Rapid clearance profile of plasma circulating tumor HPV type 16 DNA during chemoradiotherapy correlates with disease control in HPV-associated oropharyngeal cancer. Clin Cancer Res 2019, 25: 4682–4690
28. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LRE: AJCC Cancer Staging Manual. Basel, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2017
29. Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M: Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: a systematic review and meta-analysis. Int J Cancer 2017, 140:1186–1198
30. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T: Usefulness of CINtec(R) PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. Acta Cytol 2011, 55: 413–420
31. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG: Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. Am J Pathol 2003, 162:747–753
32. Poljak M, Kocjan BJ, Ostrbenk A, Seme K: Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. J Clin Virol 2016, 76 Suppl 1:S3–S13
33. Tang AL, Hauff SJ, Owen JH, Graham MP, Czerwinski MJ, Park JJ, Walline H, Papagerakis S, Stoerker J, McHugh JB, Chepeha DB, Bradford CR, Carey TE, Prince ME: UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. Head Neck 2012, 34:1480–1491
34. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML: Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. Genome Res 2014, 24:185–199
35. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer 2011, 11: 426–437
36. De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, Vivancos A, Tabernero J, Reis-Filho JS, Seoane J: Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. Nat Rev Clin Oncol 2013, 10:377–389
37. Corcoran RB, Chabner BA: Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. N Engl J Med 2018, 379:1754–1765
38. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A: Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker–a critical appraisal of the literature. Clin Chim Acta 2010, 411:1611–1624
39. Aziz H, Ping CY, Alias H, Ab Mutalib NS, Jamal R: Gene mutations as emerging biomarkers and therapeutic targets for relapsed acute myeloid leukemia. Front Pharmacol 2017, 8:897
40. Lin JC, Wang WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS, Jiang RS: Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. N Engl J Med 2004, 350: 2461–2470

41. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, Chu SWI, Mak C, Tse IOL, Leung SYM, Chan G, Hui EP, Ma BBY, Chiu RWK, Leung SF, van Hasselt AC, Chan ATC, Lo YMD: Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer. N Engl J Med 2017, 377:513–522
42. Hanna GJ, Supplee JG, Kuang Y, Mahmood U, Lau CJ, Haddad RI, Janne PA, Paweletz CP: Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. Ann Oncol 2018, 29:1980–1986
43. Bernard-Tessier A, Jeannot E, Guenat D, Debernardi A, Michel M, Proudhon C, Vincent-Salomon A, Bieche I, Pierga JY, Buecher B, Meurisse A, Francois E, Cohen R, Jary M, Vendrely V, Samalin E, El Hajbi F, Baba-Hamed N, Borg C, Bidard FC, Kim S: Clinical validity of HPV circulating tumor DNA in advanced anal carcinoma: an ancillary study to the epitopes-HPV02 trial. Clin Cancer Res 2019, 25:2109–2115
44. Cabel L, Jeannot E, Bieche I, Vacher S, Callens C, Bazire L, Morel A, Bernard-Tessier A, Chemlali W, Schnitzler A, Lievre A, Otz J, Minsat M, Vincent-Salomon A, Pierga JY, Buecher B, Mariani P, Proudhon C, Bidard FC, Cacheux W: Prognostic impact of residual HPV ctDNA detection after chemoradiotherapy for anal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2018, 24: 5767–5771
45. Dahlstrom KR, Li G, Hussey CS, Vo JT, Wei Q, Zhao C, Sturgis EM: Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. Cancer 2015, 121:3455–3464
46. Lee JY, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, De Castro DG, Grove L, Hurley T, Wang F, Nutting C, Newbold K, Harrington K, Turner N, Bhide S: Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma. Br J Cancer 2017, 117:876–883
47. Ledgerwood LG, Kumar D, Eterovic AK, Wick J, Chen K, Zhao H, Tazi L, Manna P, Kerley S, Joshi R, Wang L, Chiosea SI, Garnett JD, Tsue TT, Chien J, Mills GB, Grandis JR, Thomas SM: The degree of intratumor mutational heterogeneity varies by primary tumor sub-site. Oncotarget 2016, 7:27185–27198

2.2. Identifizierung spezifischer Mutationen in HPV-getriebenen OPSCC von Patienten mit Therapieversagen

Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure

Henrike Reder, Steffen Wagner, Ulrike Gammerdinger, Sarah Sandmann, Nora Würdemann, Andreas Bräuninger, Martin Dugas, Stefan Gattenlöhner, Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt

Oral Oncology, 93 (2019) 59-65
(doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.04.013)

Trotz eines allgemein besseren Therapieansprechens von Patienten mit HPV^+ OPSCC im Vergleich zu Patienten mit HPV^- OPSCC, entwickeln einige Patienten mit HPV^+ OPSCC Fernmetastasen oder ein Lokalrezidiv (LR/FM), was mit einem entsprechend schlechteren Krankheitsverlauf einhergeht. In dieser Studie wurde untersucht, ob Patienten mit LR/FM ein anderes genetischen Muster an Mutationen aufweisen als Patienten ohne LR/FM. 90 Zielregionen in 22 Genen, die in der Literatur häufig in HPV^+ OPSCC als mutiert beschrieben worden sind, wurden für ein Genpanel zur gezielten Sequenzierung (*targeted Next Generation Sequencing*, tNGS) ausgewählt. Bezüglich chromosomaler Aberrationen wurden keine Unterschiede zwischen HPV^+ OPSCC von Patienten mit und ohne LR/FM beobachtet. Hingegen wiesen HPV^+ OPSCC von Patienten mit LR/FM höhere Mutationsraten auf als von Patienten ohne LR/FM. Besonders die Gene *HRAS* (*Harvey Rat sarcoma*), *PIK3R1*, *STK11* (Serine/Threonin Kinase 11) und *TP63* waren häufiger in OPSCC von Patienten mit LR/FM mutiert als in Patienten ohne LR/FM. Zusätzlich könnten synchrone Aberrationen auf den Chromosomen 16 und 19 einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben.

Oral Oncology 93 (2019) 59–65

Contents lists available at ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology

Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure

Henrike Reder[a,*,1], Steffen Wagner[a,1], Ulrike Gamerdinger[b], Sarah Sandmann[c], Nora Wuerdemann[a,d], Andreas Braeuninger[b], Martin Dugas[c], Stefan Gattenloehner[b], Jens Peter Klussmann[a,d,2], Claus Wittekindt[a,2]

[a] Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Justus-Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany
[b] Department of Pathology, Justus-Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany
[c] Institute of Medical Informatics, Westphalian Wilhelms University Muenster, 48149 Muenster, Germany
[d] Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Medical Faculty, University Hospital Cologne, 50931 Cologne, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Human papillomavirus
Oropharyngeal squamous cell carcinoma
Next generation sequencing
Chromosomal aberration
Recurrence

ABSTRACT

Objectives: Despite improved survival rates of patients with HPV-associated OPSCC, a subset has distant metastasis or develops local recurrence during follow-up. To investigate potential underlying genetic alterations, we analyzed patients with HPV-driven OPSCC who suffered from recurrence in comparison to matching pairs with successful tumor control.
Materials and methods: We performed chromosomal copy number analyses and targeted next generation sequencing using a custom panel comprising genes that are frequently mutated in HPV-associated OPSCC.
Results: Specific differences regarding chromosomal aberrations were not observed between both groups. In HPV-driven OPSCC from patients with recurrence we found higher mutation rates compared to patients with successful tumor control. Especially mutation rates of *HRAS* ($p \leq 0.05$) *PIK3R1*, *STK11* and *TP63* ($p \leq 0.1$ each) were statistically significant or trending towards significance. The respective genes can be linked to transcription factors and signaling pathways involved in cell cycle regulation, proliferation and survival. Additionally, combinations of alterations were observed on chromosomes 16 and 19, which might also influence outcome.
Conclusion: Patients with HPV-driven OPSCC who develop recurrence or have metastasis may be defined by genetic alterations that might be responsible for poor outcome after standard therapy. This might be of importance for stratification in future de-escalation and targeted therapy.

Introduction

Besides overall decreasing incidences in head and neck squamous cell carcinoma, a growing number of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) are associated with human papillomavirus (HPV) high risk type 16 infections [1]. Despite differences regarding biological and clinical characteristics and improved overall survival (OS), patients with HPV-associated and non-HPV-associated (HPV-negative) OPSCC are treated equally. Hence, de-escalating treatment strategies for patients with HPV-driven OPSCC are widely discussed and examined in various clinical trials [2,3]. However, a subset of patients with HPV-associated OPSCC exhibits an increased risk of recurrence and death [4]. Those patients are characterized by local recurrence or distant metastasis (LDR). Especially mutations in driver genes (*PIK3CA*, *KRAS*, and *NRAS*) are associated with worse survival prognosis [4]. Furthermore, subtypes of HPV-associated head and neck cancers with different responses to treatment and prognosis were identified; they are distinguished by grade of differentiation, gene expression patterns and genomic aberrations [5,6]. Therefore, patients with an increased risk towards the outcome might not be treated sufficiently by de-escalated treatment protocols and may later develop local recurrence or distant metastasis.

Abbreviations: DFS, disease-free survival; HPV, human papillomavirus; LDR, local/distant recurrence; OPSCC, oropharyngeal squamous cell carcinoma; OS, overall survival; SNP, short nucleotide polymorphism

* Corresponding author at: Aulweg 128 (ForMED), 35392 Giessen, Germany.
E-mail address: henrike.reder@hno.med.uni-giessen.de (H. Reder).

[1] These authors contributed equally as first authors.
[2] These authors contributed equally as last authors.

https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.04.013
Received 6 February 2019; Received in revised form 15 April 2019; Accepted 22 April 2019
1368-8375/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

We hypothesize that patients with HPV-driven OPSCC and LDR have a more aggressive kind of the disease based on a higher mutational burden and mutational profile distinct from non-LDR patients. Therefore, genetic aberrations in primary tumor tissue of patients with HPV-driven OPSCC who developed relapse were compared to matching patients without treatment failure. Hence, primary tumor tissue of the selected patients was analyzed for chromosomal aberrations and short nucleotide variants. A custom panel for targeted next generation sequencing (tNGS), with gene regions frequently described to be mutated in HPV-associated OPSCC, had been developed. Identification of patients with an increased risk for treatment failure and implementation of monitoring at close intervals post-treatment might be especially important regarding the current debate on treatment de-escalation for patients with HPV-associated OPSCC. Based on the observation of patients with HPV-associated OPSCC with different outcomes, we aimed to identify patterns of specific mutations and genetic alterations that can be associated with treatment failure and development of local or distant relapse.

Materials and methods

Patient selection

Characteristics and survival of all patients treated for a primary OPSCC at our hospital between 2000 and 2013 were investigated. Primary tumor tissue of patients with LDR during follow-up until May 2016 was examined. For comparison, primary tumor tissue of best matching counterparts of patients with HPV-associated OPSCC without treatment failure (non-LDR) was analyzed correspondingly. These counterparts were matched for N-stage, risk factors (nicotine, alcohol) and T-stage (Table 1 and Supp. Table 1). HPV-association was defined by expression of CDKN2A (p16INK4A) and detection of high-risk HPV type 16 DNA as previously described [7–10]. All patients were treated following approved guidelines, receiving surgery with or without adjuvant radio-/radiochemotherapy or definitive radio-/radiochemotherapy. The study was approved by the local ethics committee (reference number: 95/15).

Table 1
Patient characteristics of LDR (n = 12) and non-LDR (n = 12) patient cohort.

		LDR		non-LDR	
Age	Young (< 60)	5	41.7%	8	%
	Old (≥60)	7	58.3%	4	%
	Median	65.8 years		57.4 years	
	Mean	67.0 years		59.4 years	
		n	[%]	n	[%]
Gender	Female	3	25.0	4	33.3
	Male	9	75.0	8	66.7
T-stage	T1	0	0.0	3	25.0
	T2	3	25.0	5	41.7
	T3	4	33.3	1	8.3
	T4	5	41.7	3	25.0
N-stage	N0	2	16.7	1	8.3
	N+	10	83.3	11	91.7
M-stage	M0	7	58.3	12	100.0
	M+	5	41.7	0	0.0
Smoking	Yes	8	72.7	8	66.7
	No	3	27.3	4	33.3
	Unknown	1	–	–	–
Alcohol	Yes	2	18.2	1	9.1
	No	9	81.8	10	90.9
	Unknown	1	–	1	–
Surgery	Yes	6	50.0	10	83.3
	No	6	50.0	2	16.7
Radiotherapy	Yes	9	90.0	10	90.9
	No	1	10.0	1	9.1
	Unknown	2	–	1	–
Chemotherapy	Yes	9	90.0	6	50.0
	No	1	10.0	6	50.0
	Unknown	2	–	–	–

DNA isolation and sequencing library preparation

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) primary tumor tissue was stained with hematoxylin and eosin to define tumor regions. DNA was isolated from macrodissected FFPE tumor tissue with the Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) following manufacturer's protocol. DNA concentration was determined with the Qubit™ 1.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and the High Sensitivity DNA Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). DNA was amplified and prepared as described in the protocol for the Ion AmpliSeq™ DNA and RNA Library Preparation (Thermo Fisher Scientific) kit. Approximately 10 ng DNA from the primary tumor tissue were used to prepare the tNGS library. Sequencing was performed on the Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific).

Targeted next generation (tNGS) panel and variant calling

90 target regions in 22 genes that are frequently described to be altered in HPV-associated OPSCC [11–17] were selected for the tNGS panel (Supp. Table 2). Primers were designed with the Ion AmpliSeq Designer v5.4.2 (Thermo Fisher Scientific). Additionally, the coding sequence of *TP53* was included (exon 2 - exon 11). Sequencing data were analyzed using the pipeline appreci8 [18] and aligned to GRCh37 (hg19). Read depth was set to a minimum of 50 and the minimum number for variant allele reads to 20. The alternative's average base quality of reads must be at least 15 and the difference of the average base quality between reference and alternative must not be greater than 7. Only protein altering mutations were taken into consideration for further analysis.

Genome-wide SNP-array analysis

100–200 ng DNA derived from primary tumor tissue samples containing at least 70% tumor cells in a final volume of 4 µL were prepared for the Infinium® HD FFPE Assay (Illumina, San Diego, California, USA) following protocol. Prior to this, samples were analyzed and prepared with the Infinium HD FFPE QC Assay protocol (Illumina, San Diego, California, USA) and the FFPE Restore Protocol (Illumina, San Diego, California, USA) following manufacturer's protocols. Signals were analyzed with KaryoStudio v1.4 (Illumina, San Diego, California, USA) by two independent researchers and uncertain results were reviewed collectively for agreement. Data from the B allele frequency were weighted higher than from the log R ratio. Only alterations with agreement of both researchers were taken into consideration and counted as true aberration. Fig. 4 was visualized using Circos [19].

Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS statistical software (IBM SPSS 24.0, Chicago, Illinois, USA). Overall survival (OS) was calculated from initial date (date of routine biopsy confirmed by histology) to date of death. Disease-free survival (DFS) was calculated from end of treatment of the primary tumor to date of diagnosis of relapse. OS and DFS rates were calculated by the Kaplan-Meier method and the significance of differences was calculated by log-rank test. Qualitative and quantitative data were compared using Fisher's Exact test and *t*-test for independent samples, two-sided each. Significance of results was expected for p-values ≤ 0.05.

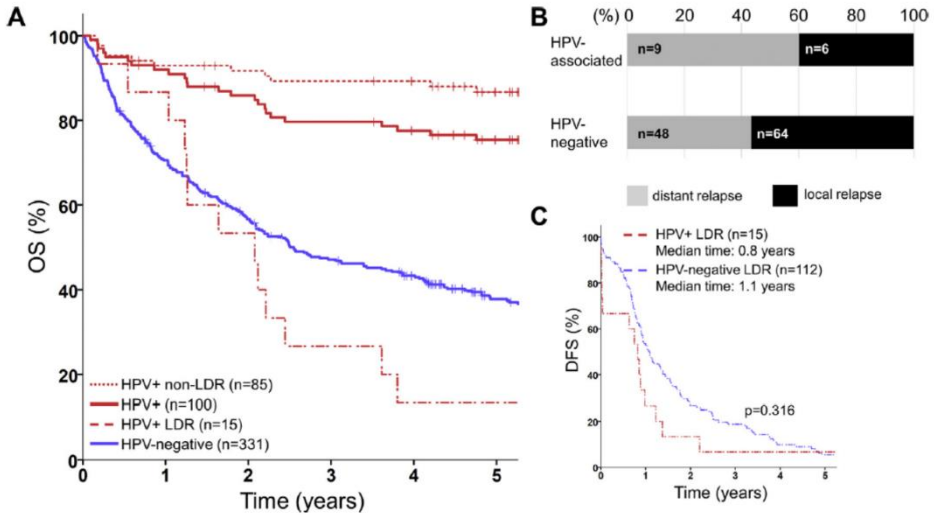


Fig. 1. Survival of patients with OPSCC (n = 431). A: Overall survival (OS) of patients with HPV-associated (HPV+, red, n = 100) and HPV-negative (blue, n = 331) OPSCC (solid lines). Dotted and dashed lines show patients with LDR (dashed; n = 15) and non-LDR (dotted; n = 85) in HPV-associated OPSCC. B: Ratio of distant (grey) and local relapse (black) in HPV-associated (n = 15) and HPV-negative patients (n = 112). C: Disease-free survival (DFS) of patients with LDR according to HPV-status (blue: HPV-negative, n = 112; red: HPV+, n = 15). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Results

Identification and characterization of patients with HPV-associated OPSCC and treatment failure

In survival analyses for all OPSCC treated between 2000 and 2013 in our hospital, we observed that patients with HPV-driven OPSCC showed significantly better OS (n = 100; 5y-OS: 75.4%; $p \leq 0.001$) compared to HPV-negative OPSCC patients (n = 331; 5y-OS: 37.8%). In the LDR subgroup of HPV-driven OPSCC, 5-year OS rates were 13.3% (n = 15) compared to 86.7% in patients without relapse (n = 85) (Fig. 1A). Patients with HPV-driven OPSCC and relapse had decreased OS rates compared to HPV-negative patients ($p \leq 0.001$). In the case of LDR in HPV-driven OPSCC, more patients developed distant metastasis than local recurrence (60% vs. 40%) compared to HPV-negative LDR patients (Fig. 1B). Median time of disease-free survival (DFS) did not differ significantly between patients with HPV-associated and HPV-negative OPSCC (0.8 vs. 1.1 years; p = 0.316, Fig. 1C).

Primary tumor tissue of all patients with HPV-associated OPSCC and LDR with sufficient material, which passed DNA quality control (n = 12) were sequenced by tNGS. Matching counterparts (n = 12, non-LDR) were also included in the study (see Methods section). 5/12 (41.7%) patients with HPV-associated OPSCC suffered local relapse, the remaining 7 patients (58.3%) developed distant metastases (2 liver, 4 lung, 1 bone). The median age of the HPV-associated LDR group was 65.8 years and 75% were male. Cohort and individual patient characteristics are listed in Table 1 and Supp. Table 1, respectively.

Targeted next generation sequencing (tNGS)

The average depth of base coverage was 3289 reads and over 97% of bases had more than 100 reads in the sequenced gene regions. Overall, mutations were detectable in 7/12 (58.3%) primary tumor tissue samples of patients with LDR and in 5/12 (41.7%) of non-LDR patients (Fig. 2). Only one of the selected genes (*KRAS*) was not mutated in patients with LDR, while 14 genes were not mutated in non-LDR patients. *HRAS* and *TP53* were the most frequently mutated genes in our cohort with LDR (41.7%). In non-LDR patients, the most frequently affected genes were *PIK3CA*, *TAF1* and *TP53* (16.7%). Altogether, tumor tissue from patients with LDR harbored 164 distinct mutations (13.7 mutations/tumor) versus 18 mutations (1.5 mutations/tumor) in non-LDR patients (p = 0.097, *t*-test; Supp. Tables 3 and 4). Taking into consideration whether LDR patients developed local or distant recurrence, a trend for a higher mutation rate in patients with local recurrence was detected (p = 0.167, *t*-test). A significantly higher mutation rate was detected in *HRAS* ($p \leq 0.05$, Fisher's Exact test) in tissue of LDR-patients compared to non-LDR patients (Fig. 2). Moreover, the mutation frequency of *STK11*, *TP63*, and *PIK3R1* ($p \leq 0.1$ each, Fisher's Exact test) showed a trend towards significance for tissue of LDR patients compared to non-LDR patients. Six variants in patients with LDR and only one in a non-LDR patient resulted in a truncated and therefore putatively non-functional protein (Fig. 2). All detected single mutations can be found in Supp. Table 4.

In silico analysis of HPV-driven OPSCC

For comparison, we investigated published data from 22 HPV-driven OPSCC patients sequenced by The Cancer Genome Atlas (TCGA) research group [13]. The relative number of mutations in all genes is comparable to our group of non-LDR patients (Fig. 2). On one hand, in our non-LDR patients we found mutations in *TP53*, *KRAS*, *TAF1* and *PDGFRA*, which were not detected in the HPV-driven TCGA cohort. On the other hand, patients sequenced by TCGA had mutations in *RB1*, *FANCA*, *CYLD*, *PIK3R1*, *NOTCH1* and *JAK1*, which were not mutated in samples from our non-LDR patients, but in our cohort with LDR. The genes *FBXW7*, *BCL6*, *DDX3X* (*DDX3*) and *EP300* were mutated to a similar extent in non-LDR patients of our group and samples analyzed by TCGA. *PIK3CA* was mutated in both cohorts. However in approximately 40% of the cases analyzed by TCGA, while it was only mutated in 15% of our non-LDR patients.

Variants in the tumor suppressor gene TP53

Altogether, we detected 25 *TP53* variants in primary tumor tissue of

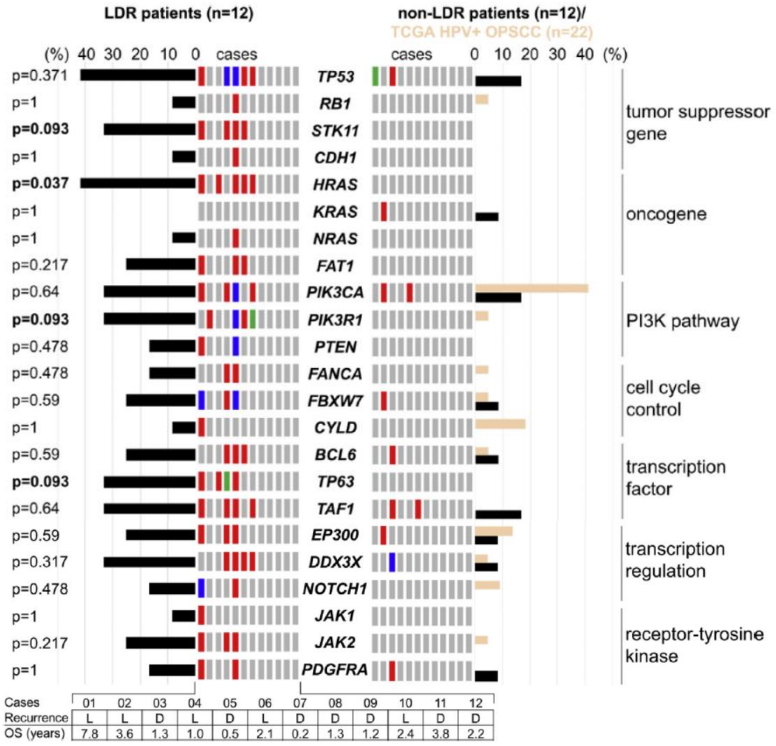


Fig. 2. Mutation pattern of HPV-associated OPSCC with local/distant recurrence (left) and non-recurrence (right). Shown are 12 patients each in the group with LDR (left columns) and non-LDR (right columns). Each row corresponds to one or more regions of the indicated gene analyzed by targeted sequencing. Black bars indicate the percentage of patients with a variant in that group. Type of recurrence and overall survival data are shown for LDR patients below. Data from HPV-driven OPSCC (n = 22) analyzed by TCGA are added in beige for *in silico* analysis. Red: missense mutation, blue: truncating mutation, green: frameshift mutation, OS: overall survival, L: local recurrence, D: distant recurrence. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

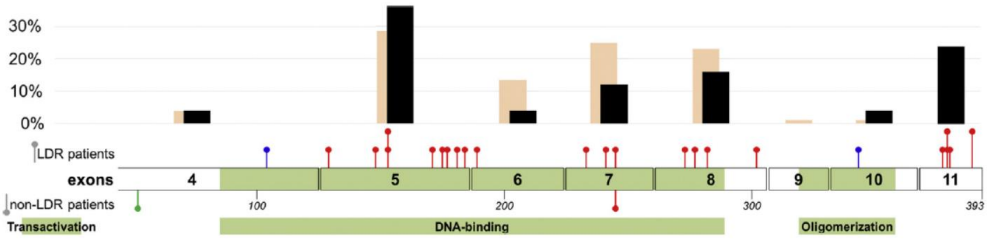


Fig. 3. *TP53* mutations in patients with local/distant recurrence (top) and non-recurrence (bottom). The diagram shows the relative frequency of somatic mutations in the indicated exon of our patients with LDR (n = 12; black) and of the IARC TP53 database (n = 28,869; beige; IARC, Lyon, France [20]). Exons are represented in black boxes labeled 4–11; domains are highlighted in green with their respective functions indicated. Exons 2 and 3 containing the transactivation domain are left out because no variants were detected. Length of each dot represents the number of patients with a mutation in the respective position. Italic numbers: amino acid residues; red: missense mutation, black: truncating mutation, green: frameshift mutation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

LDR-patients and only in two of non-LDR patients (Supp. Table 4). 17/25 variants found in OPSCC of LDR-patients are located in the DNA-binding domain: one in the oligomerization domain, six in the C-terminus and one in exon 8 between the DNA-binding and the oligomerization domain. The two variants in tissue of non-LDR patients are located in exon 4 (between the transactivation and the DNA-binding domain) and in exon 7 (DNA-binding domain). Comparing the distribution of *TP53* mutations in our study with published data from the international agency for research on cancer (IARC, release R19) [20], differences exist in exon 6, exon 7 and exon 11. While the IARC counts 13.4% of all mutations in exon 6, 24.9% in exon 7 and 0.1% in exon 11, we detected 4% in exon 6 12% in exon 7 and 24% in exon 11 in our cohort with LDR (Fig. 3).

Chromosomal aberrations in relation to mutations

DNA with sufficient quality was isolated from 18/24 (9/12 of each group of patients) primary tumor tissue samples and further analyzed for chromosomal aberrations. Three tumors showed no imbalances: two from non-LDR patients and one from a patient with LDR. The most common gains were observed on chromosome 3q. Gain on chromosome 3q26–q29 was observed in 5 samples from patients with LDR and non-LDR, each (Fig. 4). Amongst others, this region covers the genes *PIK3CA*, *TP63* and *BCL6*, which are also mutated in primary tumor tissue of some patients with LDR. The most common losses were seen on chromosome 11q and 14q (Fig. 4). Loss on chromosome 11q22.3–q24.2 was seen in 4/9 tumors tissues of patients with LDR and non-LDR each. Loss on chromosome 14q23.3–q32.33 was observed in 4/9 (44.4%)

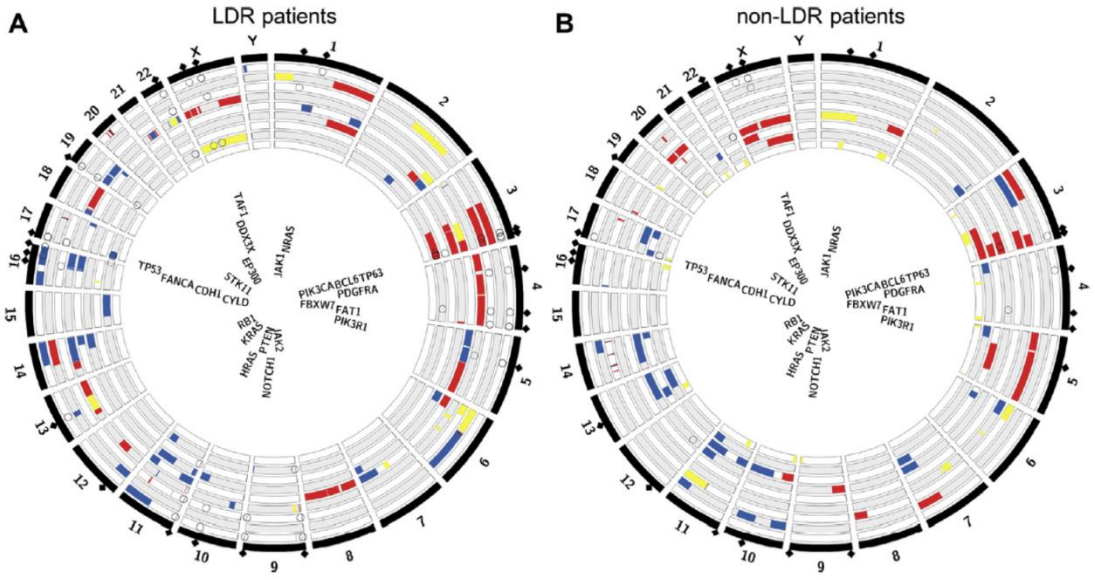


Fig. 4. Chromosomal aberrations for patients with HPV-associated OPSCC. Chromosomal aberrations are shown for 9 patients with local/distant recurrence (A) and non-recurrence (B), each. The outer circle (black) represents each chromosome of the entire genome, labeled with the respective number. Chromosomes are shown clockwise from short (p) to long (q) arm. Each inner circle (grey or white) represents one patient. Centromere regions are not sufficiently covered with SNPs and were therefore not analyzed. Black diamonds on the outer circle indicate the location of genes examined by tNGS (Fig. 2). Blank (small) circles indicate if a mutation was detected in the respective gene in the particular patient. Red: gain; dark red: amplification; blue: loss; yellow: loss of heterozygosity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

OPSCC with LDR and 3/9 (33.3%) non-LDR. Tumor tissue of one patient with LDR had a gain on chromosome 14q23.3–q32.33.

Considerable differences could be observed on chromosomes 16 and 19. Tumor tissues from four patients with LDR had alterations on chromosome 19p (1x deletion, 3x mutations in *STK11*) while the tumor sample of one non-LDR patient had a loss of heterozygosity on chromosome 19p13.3 (Fig. 4). Chromosome 16q12.1–q24.3 was lost in 3/9 (33.3%) OPSCC of patients with LDR but in none with non-LDR. 5/9 (55.5%) samples of patients with LDR who were analyzed for both, mutations and chromosomal aberrations, had an alteration on chromosome 16q: two patients had only deletions, two patients had only mutations and one patient had both, mutations and deletions. The chromosome regions carrying *CYLD*, *CDH1* and *FANCA* were deleted in OPSCC of 3 patients with LDR. Additionally, *FANCA* was mutated in tumor tissue of one patient with LDR; *CDH1* and *CYLD* were mutated each in one OPSCC with LDR. In line with this, from non-LDR patients only one tissue sample showed loss of heterozygosity on chromosome 16q23.1–q26.3.

Discussion

Alterations in patients with local/distant recurrence are associated with tumor progression

By comparing HPV-driven OPSCC with LDR and non-LDR, we detected different mutation frequencies in several genes. Primary tumor tissue of patients with LDR had mutations in more genes analyzed by the custom designed panel and more distinct mutations in single genes than non-LDR patients (Fig. 4, Supp. Tables 3 and 4). Especially *STK11*, *HRAS*, *PIK3R1* and *TP63* were more frequently mutated. In line with previous findings, we did not detect any mutation in codons 12, 13 or 15 of *KRAS* [21]. However, one mutation in KRAS was found in non-LDR patients but not in patients with LDR. The detected missense mutation in codon 17 (S17N) had been shown to completely block KRAS activation [22].

A weakening of our study is the low number of primary OPSCC specimen from patients developing LDR. Respective cases are rare and we analyzed all samples that had been available at our site. Only multicenter studies can overcome this issue, which might be initiated based on our findings in future. A second weakening is the application of tNGS instead of genome wide methods, which is related to the foregoing point. We were dependent on FFPE OPSCC samples from our archive. Therefore, only tNGS based methods are currently suitable, but progress in sequencing technologies might overcome this issue. Nevertheless, with our limited panel of sequenced regions, this study yielded some interesting and (regarding *TP53*) unexpected findings.

TCGA data does not contain information on treatment failure in patients with HPV-driven OPSCC. Nevertheless, considering the sample size of the TCGA data and the recurrence rate in patients with HPV-driven OPSCC, we assume that all 22 patients are non-LDR patients. Mutations in *TP53* are absent in TCGA data of HPV-driven OPSCC [13], while we found *TP53* variants in five OPSCC patients with LDR (41.7%) and two (16.7%) with non-LDR. Apart from exon 6, exon 7 and exon 11, the frequency and distribution of *TP53* mutations across all exons are similar to published databases (Fig. 3). Exon 6 and exon 7 (lower mutational frequency found in our cohort with LDR) are part of the DNA-binding domain, while no functional domain is described for exon 11. However, exon 11 (higher mutational frequency in our cohort with LDR) is known to contain residues important for the biological function of p53 (like variant p.G389E) or for post-translational modifications influencing transcriptional activity [23–25]. It was reported that metachronous recurrent OPSCC share a genomic landscape with HPV-negative OPSCC and also exhibit higher frequencies of *TP53* mutations [26]. Although absent in HPV-driven cancers in general, *TP53* mutations seem to be an important factor for the development of recurrence in our cohort. It remains open, whether LDR in patients with HPV-

driven OPSCC is causally related to individual TP53 mutations or whether additional lifestyle-risk factors (e.g. smoking) and corresponding (pre-cancerous) genetic alterations in patient's history have been superimposed by carcinogenic mechanisms due to HPV-infection.

Evidence strongly supports the hypothesis that the N-terminally truncated major isoform of the p53-related protein p63 (ΔNp63α; encoded by *TP63*) is an activator of the receptor interacting serine/threonine kinase 4 (RIPK4) [27]. RIPK4 is a protein involved in WNT/β-catenin signaling and aberrant expression was reported to be associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients [28]. In our study, *TP63* was mutated in tumor tissue of four patients in the group with LDR but in none with non-LDR ($p < 0.1$, Fisher's Exact test). Interestingly, HPV-DNA integration within or close to *TP63* has been reported for head and neck cancers [29–32] and one of the few HPV-positive head and neck cancer cell lines (UM-SCC-47) harbors HPV-DNA integrated in *TP63* [33]. Therefore, we presume a putative relation between HPV, p63 and RIPK4, which might have an impact on cancer progression in HPV-driven OPSCC.

HRAS is a potent oncogene, Especially codons 12, 13 and 61 have been described as common mutational hotspots. *HRAS* was mutated in tumor tissue of five patients with LDR in our cohort but in none with non-LDR ($p < 0.05$, Fisher's Exact test). Hotspot codons 12 and 13 were affected in two cases. An additional mutation was found in codon 17 (S17N). The latter alteration leads to a dominant negative effect and inhibition of endogenous Ras-signaling [34,35]. Four detected mutations in exon 3 (p.G115R, p.C118Y, p.D119N, p.A122T) are located in the GTP-nucleotide binding domain. Residues p.C118 and p.D119 are critical elements for nucleotide sensing and nucleotide specific interactions [36]. Our results show that *HRAS* mutations might indeed play an important role in the development of relapse in HPV-associated OPSCC as it has been suggested for HPV-associated cervical and oral carcinoma [37,38].

Hotspot amino acid mutations in *PIK3CA* (residues p.E542, p.E545 and p.H1047) and mutations in *PIK3R1* have been reported in numerous human cancers [39–42] (and recently reviewed in [43]). We found *PIK3CA* hotspot mutations equally in two patients of each group with LDR and non-LDR, indicating an association with HPV rather than disease outcome. In colorectal cancer, the *PIK3CA* mutation p.G106S, we found in one LDR patient, was shown to result in weaker interactions with the regulatory subunit PIK3R1 compared to PIK3CA wild-type [44]. *PIK3R1* mutations, we detected in the LDR cohort, are located in the RhoGAP and the SH2 domain, which play a role in binding and activating downstream targets and signal transduction. Previous studies reported oncogenic effects of such mutations by weakening the inhibitory interaction between PIK3R1 and PIK3CA [43]. Additionally, it has been shown in breast cancer that mutation or loss of PIK3R1 increases PI3K/Akt signaling and oncogenic transformation, suggesting a role as tumor suppressor [45]. In a whole exome study, patients with alterations in the PI3K-pathway showed improved outcome [46]. In contrast, our findings suggest that aberrant PI3K/Akt pathway signaling by altered PIK3R1 and an instable PIK3CA/PIK3R1 complex might be involved in cancer progression and poor prognosis.

The tumor suppressor STK11 (LKB1) is a serine/threonine kinase originally identified as an activator of the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. In our study, *STK11* was mutated in OPSCC of four patients with LDR and in none with non-LDR ($p < 0.1$, Fisher's Exact test). Mutated *STK11* promotes progression and cell proliferation in HPV-driven cervical carcinoma [47,48] which is in line with our findings.

Gain of chromosome 3q was detected in 10/18 (55.6%), partial loss of chromosome 11q in 8/18 (44.4%) and partial loss of chromosome 14q in 7/18 (38.9%) patients with HPV-associated OPSCC, irrespective of the outcome and in line with literature [49–51]. Synchronous deletions of *TRAF3* (14q32.32) and *CYLD* (16q12.1) was observed in tumor tissue of three patients with LDR but in none with non-LDR. TRAF3 has been suggested as tumor suppressor during pathogenesis of viral infection and tumor progression [52]. In line, defective TRAF3 promoted cancer cell survival and drug resistance in HPV-associated head and neck cancer [53], supporting our findings. Defects in *TRAF3* and *CYLD* have also been related to NF-κB signaling activation and an improved overall survival [54]. In contrast to our data, mutations in *TRAF3* and *CYLD* did not occur simultaneously in the mentioned study, which might indicate synergistic effects of alterations in both genes.

The HPV-specific set of genes we investigated by tNGS results from the technical demands regarding FFPE samples. Methodic development in sequencing techniques may help in future to yield more information from this demanding sample type. Although patients with HPV-associated OPSCC and local/distant recurrence are rare and our patient cohort was limited, we could provide new findings. We show that genes associated with tumor progression are more frequently mutated in tumor samples of patients with LDR compared to non-LDR patients. Regarding chromosomal copy aberrations, no obvious differences between tumor samples from patients with LDR and non-LDR could be detected. However, additive effects of mutations and chromosomal aberrations like synchronous deletion of *CYLD* and *TRAF3* might have an impact on disease outcome. In order to corroborate our findings, functional assays of the detected variants in cell culture models should be performed. In addition, bio-banking of fresh-frozen tumor samples is adjuvant to support future research, especially regarding rare entities.

In summary, genetic markers potentially relevant for the outcome of patients with HPV-associated OPSCC were found in a limited experimental setup. Our data demonstrates that suitable methods for detection of such markers might support patient selection, particularly in consideration of future de-escalating strategies for patients with HPV-associated OPSCC.

Author contributions

Conceptualization: JPK, NW, CW; Methodology: SW, AB; Software: SS, MD; Verification: HR, AB; Formal Analysis: HR, SW, UG; Investigation: HR, UG; Resources: JPK, CW, AB, SG, MD; Data Curation: SS, MD; Writing – Original Draft: HR, SW; Writing – Review & Editing: CW, JPK, NW, SS, UG, MD, AB, SG; Visualization: HR, SW; Supervision: JPK, CW, AB, SG, MD; Project Administration: JPK, NW, SW; Funding Acquisition: JPK, NW, SW.

Acknowledgements

We thank Maike Roth, Cindy Arnold, Sebastian Schaefer, Katharina Sack and Stefanie Rudloff for their excellent technical support; Magnus von Knebel-Doeberitz, Elena Sophia Prigge and colleagues from the department of applied tumor biology in Heidelberg for performing HPV diagnostics; and Shachi Jenny Sharma for her critical and helpful feedback.

Funding

Funding: This work has been financially supported by the, Verein zur Förderung der Krebsforschung in Gießen e.V." and by the Rhön Klinikum AG (project: FI 46).

Declaration of interest

Declaration of interest: none.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.04.013.

References

[1] Chai RC, et al. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. Cancer Med 2015;4(4):596–607.
[2] Mirghani H, et al. Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. Int J Cancer 2015;136(7):1494–503.
[3] Masterson L, et al. De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. Eur J Cancer 2014;50(15):2636–48.
[4] Tinhofer I, et al. Targeted next-generation sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. Eur J Cancer 2016;57:78–86.
[5] Zhang Y, et al. Subtypes of HPV-positive head and neck cancers are associated with HPV characteristics, copy number alterations, PIK3CA mutation, and pathway signatures. Clin Canc Res Off J Am Assoc Canc Res 2016;22(18):4735–45.
[6] Keck MK, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. Clin Canc Res Off J Am Assoc Canc Res 2015;21(4):870–81.
[7] Wagner S, et al. Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. Br J Cancer 2017;116(12):1604–11.
[8] Prigge ES, et al. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: a systematic review and meta-analysis. Int J Cancer 2017;140(5):1186–98.
[9] Schmitt M, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. J Clin Microbiol 2006;44(2):504–12.
[10] Klussmann JP, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. Am J Pathol 2003;162(3):747–53.
[11] Seiwert TY, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. Clin Canc Res Off J Am Assoc Canc Res 2015;21(3):632–41.
[12] Lechner M, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. Genome Med 2013;5(5):49.
[13] **The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. Nature 2015;517(7536):576–82.** https://doi.org/10.1038/nature14129.
[14] Stransky N, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science 2011;333(6046):1157–60.
[15] Gaykalova DA, et al. Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. PloS one 2014;9(3):e93102.
[16] Lui VW, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. Cancer Discov 2013;3(7):761–9.
[17] Hedberg ML, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. J Clin Investig 2016;126(1):169–80.
[18] **Sandmann S, et al. appreci8: a pipeline for precise variant calling integrating 8 tools. Bioinformatics 2018;34(24):4205–12.** https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty518.
[19] Krzywinski M, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. Genome Res 2009;19(9):1639–45.
[20] Bouaoun L, et al. TP53 variations in human cancers: new lessons from the IARC TP53 database and genomics data. Hum Mutat 2016;37(9):865–76.
[21] Prigge ES, et al. No evidence of oncogenic KRAS mutations in squamous cell carcinomas of the anogenital tract and head and neck region independent of human papillomavirus and p16(INK4a) status. Hum Pathol 2014;45(11):2347–54.
[22] Matallanas D, et al. Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. J. Biol Chem 2003;278(7):4572–81.
[23] Pirolli D, et al. Insight into a novel p53 single point mutation (G389E) by Molecular Dynamics Simulations. Int J Mol Sci 2010;12(1):128–40.
[24] Feng L, et al. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. Mol Cell Biol 2005;25(13):5389–95.
[25] Friedler A, et al. Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. Structure 2005;13(4):629–36.
[26] Harbison RA, et al. The mutational landscape of recurrent versus nonrecurrent human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. JCI Insig 2018;3(14).
[27] Mitchell K, et al. Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. Am J Hum Genet 2012;90(1):69–75.
[28] Liu DQ, et al. Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients. Sci Rep 2015;5:11955.
[29] Koneva LA, et al. HPV integration in HNSCC correlates with survival outcomes, immune response signatures, and candidate drivers. Molecul Cancer Res MCR 2018;16(1):90–102.
[30] Walline HM, et al. Genomic integration of high-risk HPV alters gene expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma. Molecul Cancer Res MCR 2016;14(10):941–52.
[31] Bodelon C, et al. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. Int J Cancer 2016;139(9):2001–11.
[32] Parfenov M, et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. PNAS 2014;111(43):15544–9.
[33] Akagi K, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. Genome Res 2014;24(2):185–99.
[34] Guil S, et al. Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus. Cancer Res 2003;63(17):5178–87.
[35] Song C, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. J Biol Chem 2001;276(4):2752–7.
[36] Johnson CW, et al. The small GTPases K-Ras, N-Ras, and H-Ras have distinct biochemical properties determined by allosteric effects. J Biol Chem 2017;292(31):12981–93.
[37] Cordova-Alarcon E, et al. Effects of HRAS oncogene on cell cycle progression in a cervical cancer-derived cell line. Arch Med Res 2005;36(4):311–6.
[38] Anderson JA, et al. H-ras oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas. Arch Otolaryngol–Head & Neck Surg 1994;120(7):755–60.
[39] Wood LD, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 2007;318(5853):1108–13.
[40] Philp AJ, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. Cancer Res 2001;61(20):7426–9.
[41] Cheung LW, et al. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. Cancer Discov 2011;1(2):170–85.
[42] Parsons DW, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008;321(5897):1807–12.
[43] Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-associated PIK3CA mutations in overgrowth disorders. Trends Mol Med 2018.
[44] Ikenoue T, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. Cancer Res 2005;65(11):4562–7.
[45] Thorpe LM, et al. PI3K-p110alpha mediates the oncogenic activity induced by loss of the novel tumor suppressor PI3K-p85alpha. PNAS 2017;114(27):7095–100.
[46] Hanna GJ, et al. Improved outcomes in PI3K-pathway-altered metastatic HPV oropharyngeal cancer. JCI insight 2018;3(17).
[47] Zeng Q, et al. LKB1 inhibits HPV-associated cancer progression by targeting cellular metabolism. Oncogene 2017;36(9):1245–55.
[48] Wingo SN, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. PloS one 2009;4(4):e5137.
[49] Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY. Genetic landscape of human papillomavirus-associated head and neck cancer and comparison to tobacco-related tumors. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol 2015;33(29):3227–34.
[50] Dahlgren L, et al. Comparative genomic hybridization analysis of tonsillar cancer reveals a different pattern of genomic imbalances in human papillomavirus-positive and -negative tumors. Int J Cancer 2003;107(2):244–9.
[51] Smeets SJ, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. Oncogene 2006;25(17):2558–64.
[52] Chen T, et al. Genetic alterations in TRAF3 and CYLD that regulate nuclear factor kappaB and interferon signaling define head and neck cancer subsets harboring human papillomavirus. Cancer 2017;123(10):1695–8.
[53] Zhang J, et al. Defective TRAF3 modulates alternative NF-kB signaling and cytokine expression to promote cancer cell survival in HPV positive head and neck cancer (TUM10P.1049). J Immunol 2015;194(1 Suppl.). p. 211.30–211.30.
[54] Hajek M, et al. TRAF3/CYLD mutations identify a distinct subset of human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 2017;123(10):1778–90.

2.3. Mutationsmuster in HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC von Patienten mit Therapieversagen

Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status

Henrike Reder, Steffen Wagner, Nora Würdemann, Christine Langer, Sarah Sandmann, Andreas Bräuninger, Martin Dugas, Stefan Gattenlöhner, Claus Wittekindt, Jens Peter Klussmann

Cancer Medicine, 2021;00:1-10
(doi: 10.1002/cam4.3741)

Patienten mit HPV^+ OPSCC und LR/FM zeigen einen Krankheitsverlauf ähnlich dem von Patienten mit HPV^- OPSCC. In dieser Studie untersuchten wir, ob die zwei Gruppen auch ein ähnliches Mutationsmuster aufweisen, das mit dem schweren Krankheitsverlauf assoziiert ist. Insgesamt waren die Mutationsraten zwischen Patienten mit und ohne LR/FM ähnlich. HPV^- OPSCC hatten mehr Mutationen über das gesamte Genpanel und in *TP53* als HPV^+ OPSCC. *TP53* war in HPV^+ OPSCC signifikant seltener mutiert als in HPV^- OPSCC. Innerhalb der HPV^- OPSCC waren, abgesehen von *FAT1* (*FAT Atypical Cadherin 1*), alle Gene ähnlich häufig von Mutationen betroffen; *FAT1* war in Patienten ohne LR/FM häufiger mutiert als in Patienten mit LR/FM. Mit Ausnahme von *TP53* zeigten HPV^+ OPSCC mit LR/FM eine ähnliche Mutationsrate wie HPV^- OPSCC.

Received: 9 October 2020 | Revised: 30 December 2020 | Accepted: 3 January 2021

DOI: 10.1002/cam4.3741

ORIGINAL RESEARCH

Cancer Medicine Open Access WILEY

Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status

Henrike Reder[1] | **Steffen Wagner**[1] | **Nora Wuerdemann**[1,2,3] | **Christine Langer**[1] | **Sarah Sandmann**[4] | **Andreas Braeuninger**[5] | **Martin Dugas**[4] | **Stefan Gattenloehner**[5] | **Claus Wittekindt**[1] | **Jens Peter Klussmann**[1,2,3]

[1]Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Medical Faculty, Justus-Liebig University Giessen, Giessen, Germany

[2]Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Medical Faculty, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

[3]Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Faculty of Medicine, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

[4]Institute of Medical Informatics, Westphalian Wilhelms University Muenster, Muenster, Germany

[5]Department of Pathology, Medical Faculty, Justus-Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Correspondence
Steffen Wagner, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Justus-Liebig University Giessen, Aulweg 128 (ForMED), 35392 Giessen, Germany.

Funding information
This work has been financially supported by the "Verein zur Förderung der Krebsforschung in Gießen e.V." and by the Rhön Klinikum AG (project: FI 46).

Abstract

Patients with HPV-driven (HPV+) oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) have a significantly improved overall survival compared to patients with HPV-negative (HPV−) OPSCC. Nevertheless, 13%–25% of patients with HPV+OPSCC develop local/distant recurrence (LDR) and have a course of disease similar to HPV−OPSCC. We hypothesize that HPV+OPSCCs of patients with LDR have a mutation frequency and pattern similar to HPV−OPSCCs, which is associated with severe outcome. We performed targeted next-generation sequencing using a customized gene panel and compared data from 56 matched HPV+and HPV−OPSCC of patients with/without LDR regarding protein-altering variants. Despite improved overall survival of patients with HPV+OPSCC, those who develop LDR show a strongly reduced survival rate that is similar or even worse compared to HPV−OPSCC patients. Overall, the number of mutations was similar in OPSCC of patients with and without LDR. In total and with respect to *TP53*, HPV−OPSCC had significantly more protein-altering mutations than HPV+OPSCC. The number of mutations was similar in HPV−OPSCC of patients with and without LDR with the exception of *FAT1*, which was mutated more frequently in patients without LDR. In HPV+OPSCC, *HRAS*, *PIK3R1*, *STK11* and *TP63* were more frequently mutated in patients with LDR compared to patients without. HPV+OPSCC of patients with LDR have a similar mutation pattern as HPV−OPSCC, except *TP53*, which was mutated to a significantly lower extent. In conclusion, HPV−and HPV+OPSCC with LDR have similar mutation counts in the analyzed genes. We suspect that the number of mutations is not causal for disease progression, rather specific mutations could be important.

Henrike Reder and Steffen Wagner contributed equally as first authors.

Claus Wittekindt and Jens Peter Klussmann contributed equally as last authors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2021 The Authors. *Cancer Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS
human papillomavirus, next-generation sequencing, oropharyngeal cancer, p53 gene, recurrence, squamous cell carcinoma

1 | INTRODUCTION

In 2018, approximately 92,900 new cases of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) were diagnosed worldwide and a high mortality rate of about 50% is reported.[1] In contrast to other head and neck cancers, the incidence of OPSCC is increasing and in many countries a growing number of cases are attributed to high-risk human papillomavirus (HPV).[2–4] These patients are characterized by a specific risk profile, comparatively good response to therapy, and superior overall survival (OS) rates.[5,6] Consequently, strategies to de-escalate the treatment of patients with HPV-driven (HPV+) OPSCC are investigated. Notably, two clinical trials investigating de-escalating therapy found no benefit in replacing cisplatin as standard of care in radio-chemotherapy by the epidermal growth factor inhibitor cetuximab. In addition, treatment with cetuximab resulted in inferior overall and progression-free survival compared to treatment with cisplatin.[7,8]

It is known that the HPV early proteins E6 and E7 have a transforming potential.[9] Briefly, E7 binds the active retinoblastoma protein (Rb), thereby releasing the transcription factor E2F, which drives the cell cycle into S-phase. E6 interacts with a ubiquitin ligase that labels the tumor suppressor p53 for proteolytic degradation,[10–12] thereby inhibiting cell cycle control and apoptosis. Consequently, HPV+tumors are not dependent on *TP53* mutations as a prerequisite for oncogenesis, and *TP53* mutations are rare in this entity. On the other hand, HPV−OPSCC often carry *TP53* variants.[13,14]

Despite the generally good response to therapy and the good prognosis, approximately 13–25% of patients with HPV+OPSCC develop local or distant recurrence (LDR) within 2 years after current standard treatment[15,16] and a correspondingly unfavorable course of the disease. In a previous study, we demonstrated that HPV+OPSCC patients with LDR had a higher number of mutations than HPV+OPSCC patients without LDR. In particular, the frequency of mutations in *HRAS*, *PIK3R1*, *STK11*, and *TP63* was elevated.[17] However, genetic differences between HPV−and HPV+OPSCC of patients with and without LDR still need to be elucidated.

We hypothesize that mutation numbers and patterns in OPSCC are similar in patients with LDR irrespective of HPV status. Therefore, we determined the total number of LDR in patients diagnosed with HPV+and HPV−OPSCC at our hospital between 2000 and 2018. We matched respective patients with HPV−OPSCC with/without LDR to cases of a previously analyzed cohort with HPV+OPSCC and compared frequency and patterns of protein-altering mutations by targeted next-generation sequencing using a customized gene panel.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient selection

We retrospectively analyzed the HPV and LDR status of all patients with a primary OPSCC diagnosed at our hospital between 2000 and 2018. For the targeted next-generation sequencing (targeted NGS) and survival analysis, we excluded those patients diagnosed after November 2014 in the group without LDR to ensure an event-free follow-up of at least 5 years. HPV association (HPV+) was defined by overexpression of CDKN2A ($p16^{INK4A}$) and detection of high-risk HPV-DNA as previously described.[18–21] HPV+OPSCC were all positive for high-risk HPV-type 16 ($n = 139$) except two cases (one was positive for type 58, and the other for types 35 and 26), which were not included in our analysis. Among all patients with HPV+OPSCC, 21 (15.1%) patients were identified who developed LDR. Of those, primary tumor tissue meeting our inclusion criteria for sequencing analysis (see below) was available for 14 cases. Patients with established distant metastases at time of primary diagnosis were excluded from the targeted NGS analysis. DNA quality and/or quantity of FFPE tissue samples of five patients were insufficient for sequencing. To each of the remaining patients, we assigned corresponding cases with HPV+OPSCC without LDR and patients with HPV−OPSCC with and without LDR according to N-stage, risk factors (nicotine/alcohol consumption and age), T-stage, and gender (Table 1 and Table S1). Finally, a balanced cohort of 56 OPSCC with 14 cases in each group (HPV+/-, with/without LDR) was analyzed by targeted NGS. A schematic representation of the study design is shown in Figure S1. Twelve HPV+OPSCC, each of patients with and without LDR, were investigated previously and results from targeted NGS analyses have been published before.[17] All patients were treated by surgery with or without adjuvant radio-/chemoradiotherapy, or by definitive radio-/chemoradiotherapy following approved guidelines. Patients gave written informed consent and the study was approved by the local ethics committee.

TABLE 1 Characteristics of OPSCC and patients with and without LDR according to HPV status included in the targeted NGS analysis ($n = 56$).

		HPV+($n = 28$)		HPV−($n = 28$)		Matching priority
		LDR+ ($n = 14$)	LDR− ($n = 14$)	LDR+ ($n = 14$)	LDR− ($n = 14$)	
Age (years)	Median	65.8	57.4	67.2	67.1	**6**
	Mean	66.8	59.5	61.8	62.8	
		n (%)	*n* (%)	*n* (%)	*n* (%)	
Age group	<60 years	6 (42.9)	9 (64.3)	6 (42.9)	5 (35.7)	
	≥60 years	8 (57.1)	5 (35.7)	8 (57.1)	9 (64.3)	
Gender	Female	4 (28.6)	4 (28.6)	1 (7.1)	2 (14.3)	**5**
	Male	10 (71.4)	10 (71.4)	13 (92.9)	12 (85.7)	
T-stage	T1	2 (14.3)	3 (21.4)	2 (14.3)	2 (14.3)	**4**
	T2	2 (14.3)	6 (42.9)	6 (42.9)	6 (42.8)	
	T3	6 (42.8)	2 (14.3)	3 (21.4)	4 (28.6)	
	T4	4 (28.6)	3 (21.4)	3 (21.4)	2 (14.3)	
N-stage	N0	1 (7.1)	1 (7.1)	2 (14.3)	1 (7.1)	**1**
	N+	13 (92.9)	13 (92.9)	12 (85.7)	13 (92.9)	
M-stage	M0	7 (50.0)	14 (100.0)	9 (64.3)	14 (100.0)	
	M+	7 (50.0)	0 (0.0)	5 (35.7)	0 (0.0)	
Smoking	Yes	9 (64.3)	8 (57.1)	11 (78.6)	9 (64.3)	**2**
	No	5 (35.7)	6 (42.9)	3 (21.4)	5 (35.7)	
Alcohol	Yes	2 (14.3)	1 (7.1)	7 (50.0)	4 (30.8)	**3**
	No	12 (85.7)	13 (92.9)	7 (50.0)	9 (69.2)	
	Unknown	—	—	—	1	
Surgery	Yes	6 (42.9)	11 (78.6)	7 (50.0)	9 (64.3)	—
	No	8 (57.1)	3 (21.4)	7 (50.0)	5 (35.7)	
Radiotherapy	Yes	12 (85.7)	12 (92.3)	12 (85.7)	14 (100.0)	—
	No	2 (14.3)	1 (7.7)	2 (14.3)	0 (0.0)	
	Unknown	—	1	—	—	
Chemotherapy	Yes	11 (78.6)	7 (50.0)	9 (64.3)	6 (42.9)	—
	No	3 (21.4)	7 (50.0)	5 (35.7)	8 (57.1)	

2.2 | DNA isolation and sequencing library preparation

DNA isolation and library preparation were performed as described previously.[17] Briefly, DNA was isolated from macrodissected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) primary tumor tissue with the Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega) following manufacturer's protocol. DNA quantity was determined with the Qubit™ 1.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Agilent Technologies) and the High Sensitivity DNA Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). Subsequently, 10 ng DNA per sample was prepared following the protocol for the Ion AmpliSeq™ DNA and RNA Library Preparation kit (Thermo Fisher Scientific). Sequencing was performed on the Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific).

2.3 | Targeted NGS panel and variant calling

DNA sequencing with customized gene panel and variant calling has been described previously.[17] In brief, the targeted NGS panel comprises the coding sequence of *TP53* (exon 2–exon 11) and 90 target regions in 22 genes (Table S2), which were frequently mutated in HPV+OPSCC.[14,22–27] Primers were designed with the Ion AmpliSeq Designer v5.4.2 (Thermo Fisher Scientific). Data were analyzed with appreci8[28] and aligned to the reference genome GRCh37 (hg19). Minimum read depth was set to 50, minimum number of variant allele reads to 20, the alternative's average base quality of reads to at least 15, the difference of the average base quality between reference and alternative must not be greater than 7, and the variant allele frequency had to be at

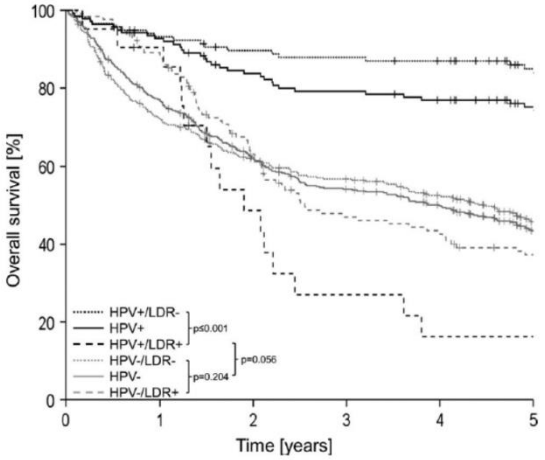


FIGURE 1 Influence of local/distant recurrence (LDR) on overall survival of patients with HPV−($n = 461$, gray) and HPV+($n = 139$, black) OPSCC. Dashed lines: patients with LDR (HPV+: $n = 21$; HPV−: $n = 129$); dotted lines: patients without LDR (HPV+: $n = 118$; HPV−: $n = 332$). Censored patients (alive at last follow-up) are indicated as vertical markers. *p*-values were calculated by log-rank test

least 5%. Only protein-altering mutations were considered for further analysis.

2.4 | Statistical analysis

Analyses were performed using the SPSS statistical software (IBM SPSS 26.0). Overall survival (OS) was calculated from date of initial diagnosis (date of routine biopsy confirmed by histology) to the date of death due to any cause or to the last known date when the patient was still alive. OS rates were calculated by the Kaplan-Meier method and the significance of differences was calculated by log-rank test. Qualitative and quantitative data between all cohorts were compared using Kruskal–Wallis test, and between distinct cohorts using two-sided Mann–Whitney *U* test for independent samples. Significance of results was expected for *p*-values ≤ 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | OS and occurrence of LDR in relation to HPV status

For the OS and targeted NGS analysis, we included patients with LDR diagnosed up to 2018 to increase the number of samples with the restriction that patients without LDR were only included with the primary diagnosis before November 2014 to ensure event-free follow-up for at least 5 years. In this patient cohort, 23.2% were tested positive for $p16^{INK4A}$ and high-risk HPV-DNA; 15.1% of those patients developed LDR within 5 years after treatment. In contrast, patients with HPV−OPSCC developed LDR in 28.0% of cases ($p = 0.002$, Table 2).

The OS of patients by HPV and LDR status is shown in Figure 1. Patients with HPV+OPSCC have a significantly improved OS compared to patients with HPV−OPSCC (5y-OS: 75.3% vs. 43.6%). Divided into subgroups, HPV+OPSCC patients without LDR showed the most favorable OS rate with a 5-year OS of 85.1%. Regarding patients with HPV−OPSCC, those without LDR showed improved OS compared to patients with LDR without reaching statistical significance (5y-OS: 45.9% vs. 37.3%; $p = 0.204$). Patients with LDR and HPV+OPSCC have a substantially reduced OS (5y-OS: 16.2%), which is even worse than that of patients with HPV−OPSCC independent of LDR ($p = 0.056$).

3.2 | Targeted NGS of the HPV−OPSCC cohort

Primary tumor tissue of matched patients with HPV−OPSCC was sequenced with a custom targeted NGS panel and data were compared to previously analyzed HPV+OPSCC (Figure 2). Only protein-altering mutations were considered in the analyses. OPSCC cohort characteristics, matching criteria, and patient characteristics are listed in Table 1 and Tables S1 and S3. The average base coverage of HPV−OPSCC in targeted NGS was 4214 reads and 98% of bases in the sequenced region had more than 100 reads (in comparison to an average base coverage of 3289 reads and 97% of bases with more than 100 read of the previously reported sequencing of HPV+OPSCC[17]). Regarding *TP53*, the average base coverage was 3328 reads, with 2999 reads in HPV+and 3659 reads in HPV−OPSCC. Each gene was mutated in at least one primary tumor of both HPV−OPSCC subgroups with and without LDR. In HPV−OPSCC, tumors of patients with LDR harbored 129 mutations (mean: 9.2, median: 2.5 mutations/tumor) altogether, while tumors of patients without LDR harbored 335 mutations (mean: 23.9 mutations/tumor; median: 8.5 mutations/tumor; $p = 0.415$, Mann-Whitney U test, Figure 2C). *TP53* was by far the most frequently mutated gene in HPV−OPSCC patients (85.7%) irrespective of the LDR status. No *TP53* mutation was detected in 2/14 (14.3%) patients in each HPV−OPSCC subgroup. HPV−OPSCC of patients without LDR had altogether 64 *TP53* mutations compared to 31 variants in HPV−OPSCC in patients with LDR; however, the median number of *TP53* mutations per tumor is similar and the comparison did not reach significance ($p = 0.540$; Figure 2D). The next most frequently mutated genes in HPV−OPSCC of patients with LDR were *TP63*, *PIK3CA*, and *DDX3X* (each mutated in 4/14 tissue samples, 28.6%). In HPV−OPSCC of patients without

TABLE 2 Five-year survival, recurrence, and mutation numbers in patients with OPSCC stratified according to HPV and LDR status

	HPV+(n = 139)		HPV−(n = 461)		p-value
Recurrence rate [%]	15.1		28.0		**0.002**[a]
of those distant metastasis [%]	71.4		55.0		
of those local recurrence [%]	28.6		45.0		
5y-OS [%]	75.3		43.6		**≤0.001**[b] (Figure 1)
	HPV+(n = 28)		**HPV−(n = 28)**		**p-value**
Total number of mutations in the analyzed genes (mean)	183 (6.5)		464 (16.6)		**0.002** (Figure 2A)
Number of *TP53* mutations (mean)	27 (1.0)		95 (3.4)		**≤0.001** (Figure 2A)
	HPV+/ LDR+ (n = 14)	**HPV+/ LDR− (n = 14)**	**HPV- / LDR+ (n = 14)**	**HPV- / LDR− (n = 14)**	**p-value**
5y-OS [%]	16.2	85.1	37.3	45.9	
Patients with mutations (%)	8 (57.1)	5 (35.7)	12 (85.7)	13 (92.9)	**0.004**[c]
Total number of mutations in the analyzed genes (mean)	165 (11.8)	18 (1.3)	129 (9.2)	335 (23.9)	**0.005**[c]
Patients with *TP53* mutations (%)	5 (35.7)	2 (14.3)	12 (85.7)	12 (85.7)	**≤0.001**[c]
Number of *TP53* mutations (mean)	25.(1.8)	2 (0.1)	31 (2.2)	64 (4.6)	**≤0.001**[c]
	LDR+ (n = 28)		**LDR− (n = 28)**		**p-value**
Total number of mutations in the analyzed genes (mean)	294 (10.5)		353 (12.6)		0.540 (Figure 2B)
Number of *TP53* mutations (mean)	56 (2.0)		66 (2.4)		0.510 (Figure 2B)

p-values (asymptotic, two-sided) calculated by Mann–Whitney U test.

Abbreviations: HPV−, HPV-negative OPSCC; HPV+, HPV-driven OPSCC; LDR−, patients without local or distant recurrence; LDR+, patients with local or distant recurrence.

[a]Pearson's Chi-square test.

[b]Kaplan-Meier, log-rank test.

[c]Kruskal-Wallis test; bold: p-values ≤0.05.

LDR, the most frequent mutated genes were *TP63* and *FAT1* with aberrations in seven samples (50.0%) each. The individual mutation counts of the listed genes between patients with and without LDR of HPV−OPSCC were similar (Table S4). Only *FAT1* was mutated at a significantly higher frequency in patients without LDR than in patients with LDR ($p = 0.043$; Table S4). Altogether 28 base variants resulted in truncated proteins in seven patients without LDR, while in five LDR patients nine variants led to truncated proteins. Fourteen and 18 variants resulted in a frameshift in the primary tumor tissue of patients with and without LDR, respectively. All variants of each patient are listed in Table S5.

3.3 | Number of mutations in the genes studied and in *TP53* is not a predictor for recurrence status

The visualization of mutation numbers in HPV+and HPV− OPSCC by LDR status is shown in Figure 2 and summarized in Table 2. In ascending order, the fewest mutations were found in HPV+OPSCC of patients without LDR, followed by HPV−and HPV+OPSCC, each of patients with LDR; the most mutations were found in HPV−OPSCC of patients without LDR (Figure 2A). Regardless of HPV status, we found no difference in total and *TP53* mutation counts between patients with and without LDR (Figure 2B). After classification into the four subgroups (HPV−/HPV+, with/ without LDR), there is no significant difference in the total number of mutations neither within HPV+($p = 0.109$) nor within HPV−($p = 0.415$) OPSCC (Figure 2C). In patients with LDR, the mutation number of HPV+OPSCC is similar to that of HPV−OPSCC ($p = 0.351$). HPV−OPSCC of patients without LDR presented a higher number of mutations than HPV+OPSCC of patients with LDR ($p = 0.088$; Figure 2C). Within the HPV−OPSCC subgroup, there is no difference in the number of *TP53* mutations ($p = 0.540$; Figure 2D). However, HPV+OPSCC of patients with LDR had less mutations in *TP53* compared to HPV−OPSCC in general ($p = 0.014$; Figure 2D) or compared to subgroups stratified by LDR status (LDR+: $p = 0.059$; LDR-: $p = 0.017$; Figure 2D). The mutation numbers altogether and

with respect to *TP53* differ significantly between the four subgroups (Table 2).

3.4 | Comparison of mutation patterns in HPV+and HPV−OPSCC of patients with/without LDR

By comparing mutations in HPV+and HPV−OPSCC, some differences become visible; besides significantly more *TP53* mutations in HPV−OPSCC ($p \leq 0.001$), further differences in the mutation number were found in *FAT1* ($p = 0.096$), *KRAS* ($p = 0.045$), *NOTCH1* ($p = 0.071$), *NRAS* ($p = 0.045$), and *RB1* ($p = 0.045$). Divided into the four subgroups, we observed that HPV+OPSCC of patients without LDR had the least number of mutations, followed by HPV−and HPV+OPSCC of patients with LDR, whereas the highest number of mutations was found in HPV−OPSCC of patients without LDR (Figure 2C). Comparing HPV+OPSCC of patients with LDR with HPV−OPSCC (with or without LDR), *TP53* is the only gene with a significant difference; it is less frequently mutated in HPV+OPSCC of patients with LDR (5/14, 36%) compared to HPV−OPSCC with LDR (12/14, 86%, $p = 0.059$) and HPV−OPSCC without LDR (12/14, 86%, $p = 0.017$) (Table S6). Significantly different mutation frequencies between all four subgroups were found in *TP53* ($p \leq 0.001$), *RB1* ($p = 0.024$), *HRAS* ($p = 0.043$), and *FAT1* ($p = 0.040$), and trending toward significance were *PIK3R1* ($p = 0.070$), *TP63* ($p = 0.060$), and *NOTCH1* ($p = 0.085$) (Figure 3). Compared to the other subgroups, HPV−OPSCC of patients without LDR had the highest number of mutations in *RB1, KRAS, NRAS, FAT1, PIK3R1, PTEN, TP63, and NOTCH1*; HPV+OPSCC of patients with LDR had highest mutation frequencies in *HRAS* (Figure 3).

4 | DISCUSSION

We observed tremendous differences in OS rates not only between patients with HPV+and HPV−OPSCC, but especially with regard to recurrence status (Figure 1). We hypothesized that mutation frequencies and pattern in OPSCC are similar in patients with LDR regardless of HPV status and we assumed that gene mutations are an important driver for LDR. Therefore, we investigated HPV−OPSCC of patients with and without LDR by targeted NGS and compared frequencies

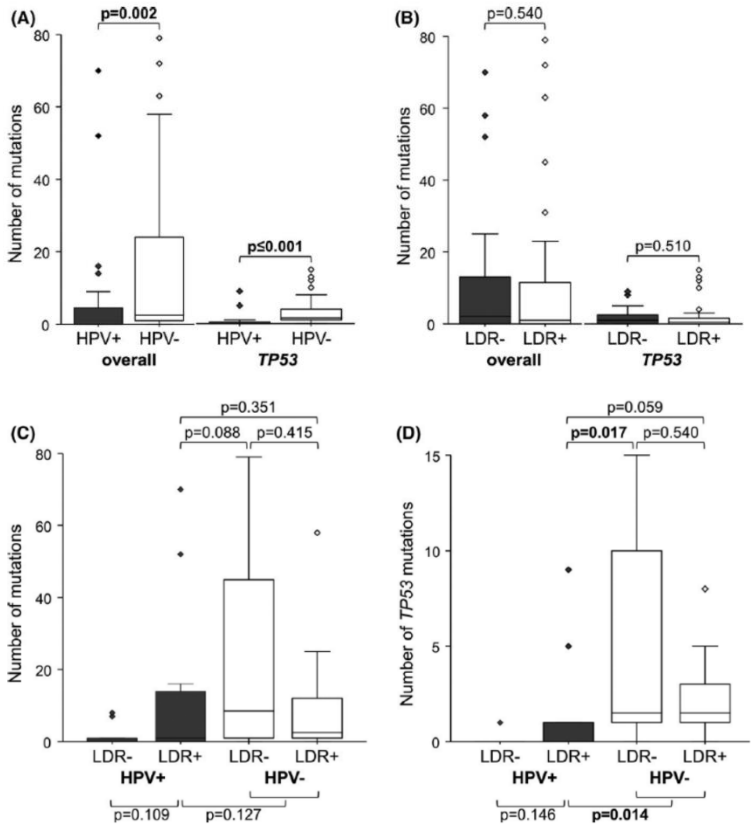


FIGURE 2 Number of mutations detected by targeted NGS in all genes studied and in TP53 in HPV+and HPV−OPSCC of patients with and without local/distant recurrence. Overall and *TP53* mutation numbers of (A) HPV−and HPV+OPSCC ($n = 28$, each) and (B) OPSCC in patients with and without LDR ($n = 28$, each). Overall (C) and *TP53* (D) mutation numbers of analyzed OPSCC subgroups stratified by LDR and HPV status ($n = 14$, each). Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles; outliers are represented by dots. *p*-values were calculated by Mann–Whitney *U* test for independent samples; *p*-values ≤0.05 in bold

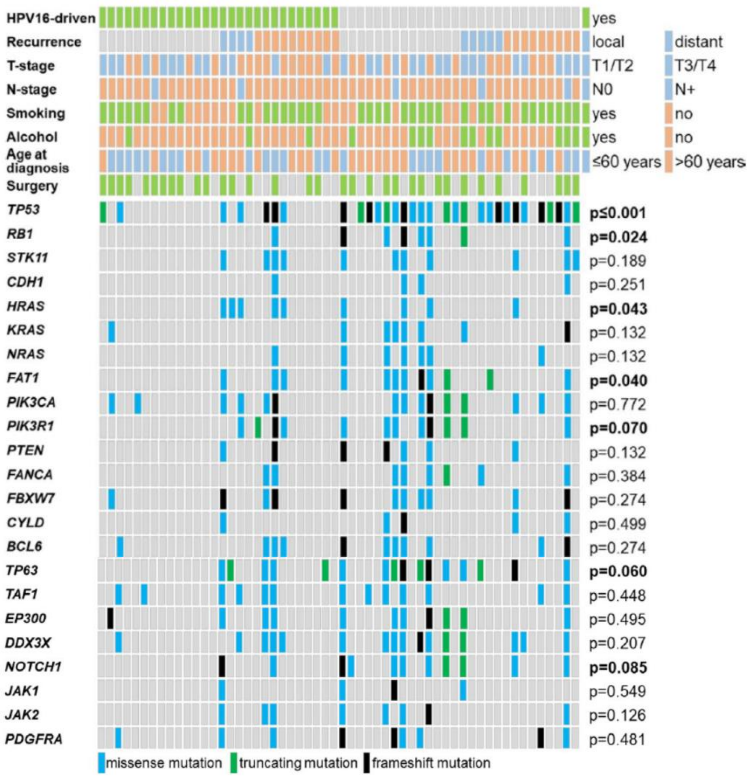


FIGURE 3 OPSCC and patient characteristics in comparison to gene mutations. Patients are displayed in columns ($n = 56$) in the group with HPV+(left) and HPV−(right) OPSCC. Each row corresponds to OPSCC and patient characteristics (top), or to one or more regions of the indicated genes, which were analyzed by targeted NGS (bottom). Smoking: yes: ≥10 pack-years, no: <10 pack-years; Alcohol: yes: ≥2 standard glasses/day, no: <2 standard glasses/day; gray: characteristic not applicable or no mutation detected; blue: missense mutation; black: truncating mutation; green: frameshift mutation. p-values were calculated by Kruskal-Wallis test for independent samples; p-values ≤0.1 in bold

and patterns of protein-altering mutations to previously analyzed primary tumors of HPV+OPSCC.[17]

The OS rate is significantly worse in patients with HPV+OPSCC and LDR compared to patients with HPV+OPSCC without LDR and surprisingly, even compared to patients with HPV−OPSCC. In contrast, there is no significant difference in OS of HPV−OPSCC patients with and without LDR. These observations are in contrast to the current literature, which reports that recurred p16-positive OPSCC patients survived significantly longer than their p16-negative counterparts.[16,29] This might be due to significant differences in treatment regimens (Table S3).[30] Patients with HPV+OPSCC and LDR received less frequent radiotherapy compared to patients with HPV−OPSCC with LDR with a trend toward significance ($p = 0.079$, Mann–Whitney U test; data not shown). Additionally, age at primary diagnosis could play a role in this context since the HPV+OPSCC patients with LDR were older than patients in the other groups (Table S3). The higher age we observed in patients with HPV+compared to HPV−OPSCC is in contrast to the general opinion that patients with HPV+OPSCC are younger. Nevertheless, as we mentioned in the recent publication,[6] most currently published data are based on clinical trials with selected patient cohorts or registry data without the inclusion of experimental data on HPV status. An important aspect for OS in patients with LDR is the rate of distant metastasis, which is 50% in HPV+compared to 17.3% in HPV−OPSCC (Table S3). The rate of distant metastasis in HPV−OPSCC is consistent with the literature,[31] while different rates are described for HPV+head and neck cancer, ranging from similar [32] to higher rates [33] in HPV+compared to HPV−cases. However, the observed high rate of distant metastasis in patients with LDR and HPV+OPSCC could also contribute to a worse survival compared to the other subgroups.

In a previous study, we investigated HPV+OPSCC and observed severely reduced survival rates of patients with LDR. Our study revealed that patients with LDR had higher mutation counts detected by targeted NGS using a custom gene panel and especially oncogenes and transcription factors were affected.[17] Subsequently, the question raised whether similar or different mutations are found in HPV−OPSCC of patients with LDR. In line with previous studies, we observed higher mutation numbers in HPV−tumors compared to HPV+tumors.[34–36] This is not surprising given the underlying carcinogenic mechanisms. Nevertheless, other studies found no difference in the number of mutations between HPV+and HPV−OPSCC.[14,22] Therefore, additional data are required, especially considering the low

number of HPV+cancers and the inhomogeneous cancer entities in previous studies.

Regardless of HPV, we could not find a significant difference between patients with and without LDR in terms of the total or *TP53* mutation numbers (Figure 2B). Furthermore, there is no difference in the number of total and *TP53* mutations, neither within HPV+nor within HPV−OPSCC stratified by LDR status (Figure 2C and D). We detected a higher *TP53* mutation frequency in HPV−OPSCC than in HPV+OPSCC ($p \leq 0.001$; Figure 2D), which is consistent with the literature.[13,34,37] Therefore, *TP53* variants do not appear to influence the course of disease in HPV−OPSCC, but it remains open whether *TP53* mutations play a role in the development of recurrence in HPV+OPSCC.

With 7/28 (25.0%) cases, we detected higher *TP53* mutation frequencies in HPV+OPSCC than previously described. In HPV+cancers, malignant cells arise primarily from the degradation of p53 and deregulation of Rb by viral E6 and E7 protein activity; however, not necessarily from the accumulation of mutations in these genes. Therefore, *TP53* is usually present in its wild-type form. For example, one study detected *TP53* mutations in 84.8% of HPV−head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), but only in 2.8% HPV+HNSCC.[14] However, a similar molecular profile was described previously, including an enriched *TP53* mutation frequency of 3/20 (15%) HPV+OPSCC from patients with LDR.[38] The even higher frequency of *TP53* mutations in our study could be a consequence of the composition of the cohort, that is, the enrichment of patients with LDR who have an increased number of *TP53* mutations (Figure 3).

Mutations in the gene FAT atypical cadherin 1 (*FAT1*) were elevated in HPV−OPSCC of patients without LDR compared to HPV−OPSCC of patients with LDR ($p = 0.094$). The human *FAT1* regulates cell growth, migration, and polarization with a dual role as tumor suppressor and oncogene.[39] In esophageal SCC, *FAT1* has been reported to inhibit tumor growth and epithelial–mesenchymal transition,[40] which is an important step during metastasis. Another study found a strong association between *FAT1* mutations and an improved OS in patients with HPV−but not in HPV+HNSCC patients.[41] In line with this, we detected a higher number of mutations in HPV−OPSCC of patients without LDR than in HPV−OPSCC with LDR (22 vs. 5 variants). Our results support the hypothesis that mutations in *FAT1* negatively affect tumor progression in HPV−OPSCC patients.

Regarding the mutation frequency within all four subgroups, differences in statistical comparison seem to result from the high mutation frequency in HPV−OPSCC of patients with LDR and the very low mutation frequency in HPV+OPSCC of patients without LDR. The significant differences in OS and our sequencing data suggest that recurrence in HPV−OPSCC and HPV+OPSCC is caused by different mechanisms. Specific mutations in HPV−OPSCC could drive the tumor into progression and hematogenic and lymphogenic spread. On the other hand, a higher *TP53* mutation frequency in addition to specific driver mutations could promote the development of recurrence in HPV+OPSCC.

The low number of patients with HPV+OPSCC and LDR is a weakening of our study. Although the incidence of HPV+OPSCC is increasing, the total number of patients developing LDR is rare. Therefore, we were restricted to a retrospective study design and the use of archived FFPE samples. We also used targeted NGS and did not apply whole exome (WES) or whole genome sequencing, which requires high-quality DNA. As above, this is an unavoidable drawback related to the type of available samples. Hence, our data revealed interesting information, but underline the fact that prospective multicenter studies are needed, including frozen tissue biobanking and in-depth analysis of gene variants in these clinically relevant subtypes of OPSCC. WES was applied in a previous study showing that metachronous HPV-related OPSCC shares a genomic landscape with HPV-unrelated cancers and that HPV-related OPSCC which recurred is genetically similar to non-recurring HPV-related OPSCC.[36] These findings are consistent with our results. Nevertheless, and in contrast to our study, the data derived from available WES datasets [14] and own sequencing data (using WES and targeted NGS to an unspecified extend) represent different tumor localization and were based on $p16^{INK4A}$ staining without detection of HPV-DNA in some samples, which is not sufficient for reliable HPV categorization.[42,43]

In summary, we found that HPV+OPSCC of patients with LDR carried a higher number of mutations in the analyzed genes than HPV+OPSCC of patients without LDR, with a mutation frequency similar to that of HPV−OPSCC of LDR patients. Surprisingly, the primary tumor tissue of patients with HPV−OPSCC who did not develop LDR had the highest number of mutations. Furthermore, *TP53* variants do not seem to influence the course of disease in HPV−OPSCC. However, their role for development of recurrence in HPV+OPSCC remains open. Although our study is focused on protein-altering variant in a selected number of genes, one could hypothesize that specific driver mutations, rather than the number of mutations, are dominant factors in recurrence. Additional whole-genome-based studies are needed to investigate this speculation. In addition, it can be speculated that a higher number of tumor-specific neoantigens is caused by a higher number of mutations in HPV−OPSCC.[44] In conclusion, this could be a reason for an antitumor immune response after therapy that supports a favorable course of disease in these cases. This is in contrast to cases with fewer mutations, which as a consequence develop LDR more frequently.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cindy Arnold, Sebastian Schaefer, Katharina Sack, Stefanie Rudloff, and Maike Roth for their excellent technical support; Magnus von Knebel Doeberitz, Elena-Sophie Prigge, and colleagues for performing HPV diagnostics.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no competing interests.

ETHICAL CONSIDERATION

The study was approved by the local ethics committee (reference number: 95/15).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

ORCID

Steffen Wagner https://orcid.org/0000-0003-0873-1601

REFERENCES

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
2. Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A, et al. Increasing incidence rates of oropharyngeal squamous cell carcinoma in germany and significance of disease burden attributed to human papillomavirus. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2019;12(6):375-382.
3. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2014;50(5):380-386.
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-619.
5. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):261-269.
6. Wagner S, Prigge ES, Wuerdemann N, et al. Evaluation of p16(INK4a) expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *Br J Cancer*. 2020;123(7):1114-1122.
7. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet*. 2019;393(10166):40-50.
8. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10166):51-60.
9. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:23-35.
10. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001;20(54):7874-7887.
11. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129-1136.
12. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(9):3988-3992.
13. Litwin TR, Clarke MA, Dean M, Wentzensen N. Somatic host cell alterations in HPV carcinogenesis. *Viruses*. 2017;9(8):206.
14. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-582.
15. Gronhoj C, Jakobsen KK, Jensen DH, et al. Pattern of and survival following loco-regional and distant recurrence in patients with HPV+and HPV- oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based study. *Oral Oncol*. 2018;83:127-133.
16. Faraji F, Eisele DW, Fakhry C. Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2017;2(1):10-18.
17. Reder H, Wagner S, Gamerdinger U, et al. Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure. *Oral Oncol*. 2019;93:59-65.
18. Wagner S, Wittekindt C, Sharma SJ, et al. Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *Br J Cancer*. 2017;116(12):1604-1611.
19. Prigge ES, Arbyn M, von Knebel DM, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2017;140(5):1186-1198.
20. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):504-512.
21. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*. 2003;162(3):747-753.
22. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2015;21(3):632-641.
23. Lechner M, Frampton GM, Fenton T, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+and HPV- tumors. *Genome Med*. 2013;5(5):49.
24. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011;333(6046):1157-1160.
25. Gaykalova DA, Mambo E, Choudhary A, et al. Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(3):e93102.
26. Lui VW, Hedberg ML, Li H, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013;3(7):761-769.
27. Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2016;126(1):169-180.

28. Sandmann S, Karimi M, de Graaf AO, et al. appreci8: a pipeline for precise variant calling integrating 8 tools. *Bioinformatics*. 2018;34(24):4205-4212.
29. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(30):3365-3373.
30. Jayaram SC, Muzaffar SJ, Ahmed I, Dhanda J, Paleri V, Mehanna H. Efficacy, outcomes, and complication rates of different surgical and nonsurgical treatment modalities for recurrent/residual oropharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2016;38(12):1855-1861.
31. Duprez F, Berwouts D, De Neve W, et al. Distant metastases in head and neck cancer. *Head Neck*. 2017;39(9):1733-1743.
32. Huang SH, Perez-Ordonez B, Weinreb I, et al. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2013;49(1):79-85.
33. Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, et al. HPV - a different view on head and neck cancer . *Laryngorhinootologie*. 2018;97(S01):S 48-S113.
34. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011;333(6046):1154-1157.
35. Boscolo-Rizzo P, Pawlita M, Holzinger D. From HPV-positive towards HPV-driven oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cancer Treat Rev*. 2016;42:24-29.
36. Harbison RA, Kubik M, Konnick EQ, et al. The mutational landscape of recurrent versus nonrecurrent human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *JCI Insight*. 2018;3(14).e99327https://doi.org/10.1172/jci.insight.99327.
37. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A review of HPV-related head and neck cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9):241.
38. Morris LGT, Chandramohan R, West L, et al. The molecular landscape of recurrent and metastatic head and neck cancers: insights from a precision oncology sequencing platform. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):244-255.
39. Hayes TF, Benaich N, Goldie SJ, et al. Integrative genomic and functional analysis of human oral squamous cell carcinoma cell lines reveals synergistic effects of FAT1 and CASP8 inactivation. *Cancer Lett*. 2016;383(1):106-114.
40. Hu X, Zhai Y, Kong P, et al. FAT1 prevents epithelial mesenchymal transition (EMT) via MAPK/ERK signaling pathway in esophageal squamous cell cancer. *Cancer Lett*. 2017;397:83-93.
41. Kim KT, Kim BS, Kim JH. Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;38(Suppl 1):E2021-E2029.
42. Rietbergen MM, Snijders PJF, Beekzada D, et al. Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA- negative oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*. 2014;134(10):2366-2372.
43. Bussu F, Sali M, Gallus R, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in squamous cell carcinomas arising from the oropharynx: detection of HPV DNA and p16 immunohistochemistry as diagnostic and prognostic indicators-a Pilot Study. *Int J Radiat Oncol*. 2014;89(5):1115-1120.
44. Joshi K, Chain BM, Peggs KS, Quezada SA. The "Achilles' Heel" of cancer and its implications for the development of novel immunotherapeutic strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(1):a027086.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Reder H, Wagner S, Wuerdemann N, et al. Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status. *Cancer Med*. 2021;00:1–10. https://doi.org/10.1002/cam4.3741

2.4. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen im Plasma HPV-getriebener OPSCC Patienten im Verlauf

Aus den Patienten der *Liquid Biopsy* Studie (s. Kapitel 2) wählten wir einige Patienten, von denen ebenfalls Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes (FFPE-)Material des Tumors vorlag und sequenzierten dieses mit dem beschriebenen Genpanel. Aus den detektierten Varianten wurden weiter diejenigen ausgewählt, die mit einer Variantenallelfrequenz (VAF) von mindestens 4 % vorlagen. Von einem Patienten mit LR/FM lagen nur Mutationen mit einer VAF unter 4 % vor. Hier wurden Mutationen mit der höchsten Frequenz ausgewählt (Tabelle 5). Weiterhin lagen von diesen Patienten Serumproben nach der Therapie vor und der Anteil der Variante konnte dementsprechend im Verlauf analysiert werden. Die gewählten Varianten wurde mit dem „Ion Plus Fragment Library Kit“ von Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben amplifiziert und sequenziert (s. Kapitel 6.1.1).

Tabelle 5:Variantenallelfrequenz von Mutationen, die im Tumorgewebe und im Serum der ersten vorliegenden Probe analysiert wurden.

Variante	VAF Tumor [%]	VAF Serum [%]	Zeitpunkt	Graph
***TAF1* c.5506G>A, p.Glu1836Lys**	5,8	0,02	PE	Abb. 9A
***PIK3CA* c.1633G>A, p.Glu545Lys**	38,3	1,3	PE	Abb. 9B
	43,6	0,03	PE	
	4,7	0,04	PE	
	25,2	0,04	PE	
***JAK2* c.1201C>T, p.His401Tyr**	28,8	0,05	OP	Abb. 9C
***PIK3CA* c.1624G>A, p.Glu542Lys**	18,2	0,07	PE	Abb. 9D
***RB1* c.2106+23C>T**	3,0	0,04	NS	Abb. 10A
***NOTCH1* c.3294C>T, p.Ser1098=**	2,9	0,07	NS	Abb. 10B
***EP300* c.2242-18G>T**	6,6	0,2	PE	
***PDGFRA* c.1711G>A, p.Glu571Lys**	7,0	0,02	PE	
***DDX3X* c.1684G>A, p.Glu562Lys**	14,5	1,2	PE	
***TP53* c.501G>A, p.Gln167=**	9,9	0,05	PE	
***PIK3CA* c.3140A>T, p.His1047Leu**	20,0	0,0	PE	

Ausgewählte Mutationen aus dem FFPE-Tumorgewebe wurden im Serum zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (bei einem Patienten mit LR/FM zum Zeitpunkt der ersten vorliegenden Nachsorge vor der Diagnose des Rezidivs) auf ihr Vorliegen untersucht. VAF: Variantenallelfrequenz, PE: Panendoskopie, NS: Nachsorge, OP: Operation; für die Bedeutung der Gennamen s. Kapitel 5.1.

2.4.1. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen in Patienten ohne Therapieversagen im Krankheitsverlauf

Beispielhaft werden hier die Verläufe der vier Varianten *TAF1* (*TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1*):p.Glu1836Lys, *PIK3CA*:p.Glu545Lys, *JAK2* (Janus Kinase 2):p.His401Tyr und *PIK3CA*:p.Glu542Lys detaillierter untersucht. Im Primärtumor lagen die Variaten zu 5,8 %, 38,3 %, 28,8 % bzw. 18,2 % vor (Tabelle 5). In der Serumprobe zum Zeitpunkt der Panendoskopie bzw. der Operation lies sich eine VAF von 0,02 %, 1,3 %, 0,05 % und 0,07 % ermitteln (Tabelle 5). Bei einer Variante stieg die VAF zum Zeitpunkt der Operation im Vergleich zur Panendoskopie leicht an, sank

aber zum Zeitpunkt der ersten Nachsorge wieder ab (Abb. 9A). Bei den drei anderen Varianten sank die Mutationslast im Serum über die Therapie und blieb bis zur ersten Nachsorge Probe auf einem niedrigen Niveau. Bei einer Variante in *PIK3CA* blieb der Anteil der Variante auch über die folgenden zwei Nachsorge-Termin auf einem niedrigen Level bestehen (Abb. 9B). Die *JAK2* Mutation war im Serum während eines Nachsorge-Zeitpunkts erneut mit einem Anteil von 0,16 % nachweisbar, sank aber danach wieder ab (Abb. 9C). Der Anteil der zweiten *PIK3CA* Mutation hingegen blieb über den gesamten untersuchten Zeitraum latent mit einem Anteil zwischen ca. 0,07 % und 0,05 % nachweisbar (Abb. 9D).

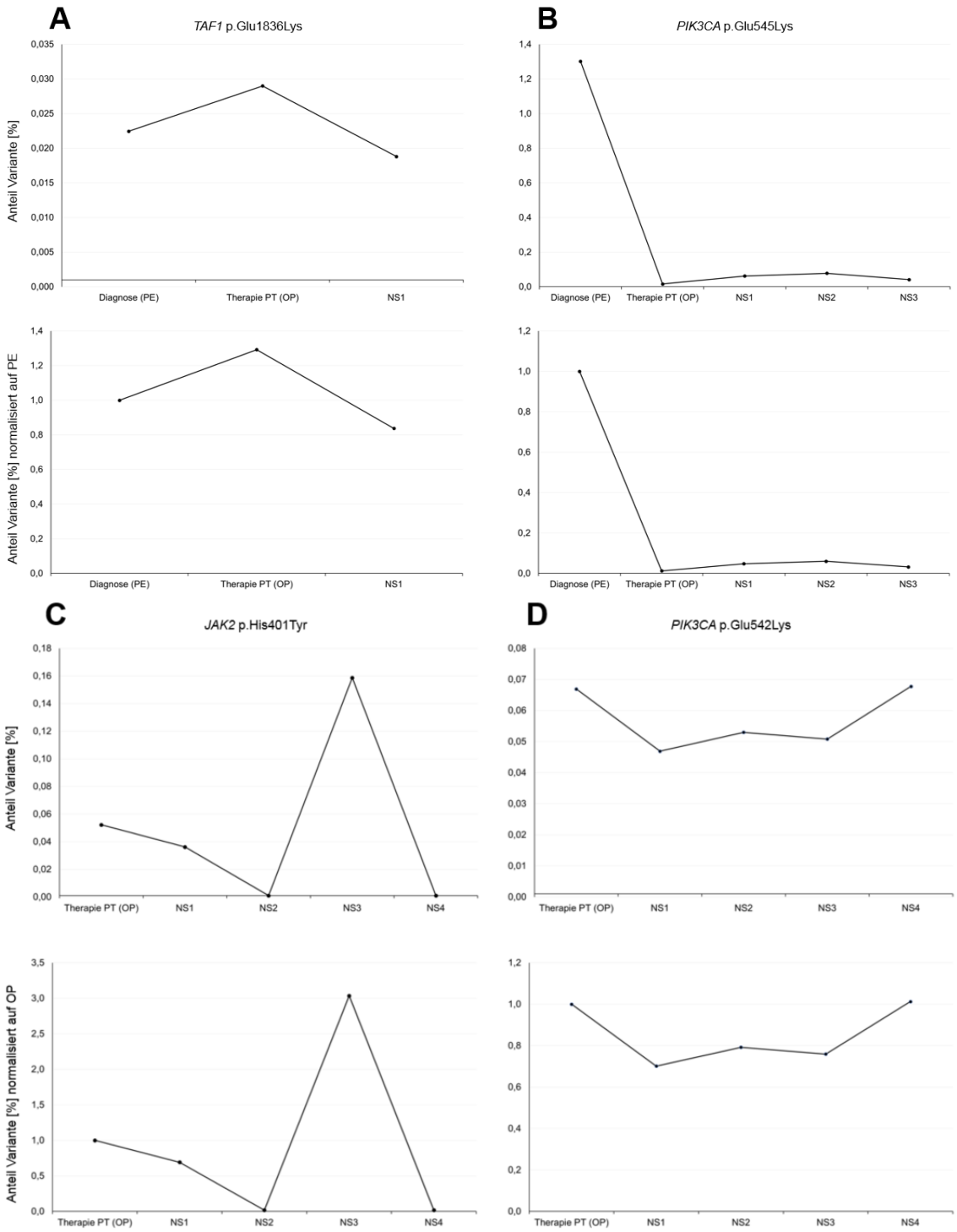


Abb. 9: Anteil von vier detektierten Varianten (A-D) im Plasma im Verlauf von Patienten ohne LR/FM.
(A) *TAF1* c.5506G>A, p.Glu1836Lys, (B) *PIK3CA* c.1633G>A, p.Glu545Lys, (C) *JAK2* c.1201C>T, p.His401Tyr, (D) *PIK3CA* c.1624G>A, p.Glu542Lys. Der obere Graph zeigt jeweils den Anteil im Verhältnis zu den Gesamtreads an der Position und der untere Graph den Anteil normalisiert auf den Zeitpunkt der Diagnose (PE bzw. OP). PE: Panendoskopie; PT: Primärtumor; OP PT: Operation des Primärtumors; NS: Nachsorge (nach der Therapie).

2.4.2. Nachweis Tumor-spezifischer Mutationen in Patienten mit Lokalrezidiv/Fernmetastase im Krankheitsverlauf

Von einem Patienten mit Lokalrezidiv/Fernmetastase lagen Mutationsdaten aus dem Gewebe des Primärtumors und aus Plasmaproben zum Zeitpunkt der ersten Rezidivtherapie (Operation) sowie der Panendoskopie des zweiten Rezidivs und während der Nachsorge vor. Im Primärtumor lagen die Varianten *RB1* c.2601+23C>T und *NOTCH1* p.Ser1098= zu 3,0 % und 2,9 % vor (Tabelle 5). Während des ersten Nachsorgezeitraums konnten die Varianten mit einem Anteil von 0,04 % und 0,08 % detektiert werden. Zum Zeitpunkt der Operation des Rezidivs stieg der Anteil beider Varianten auf 0,07 % bzw. 0,1 %. Im weiteren Verlauf der Nachsorge und bis zur Panendoskopie des zweiten Rezidivs konnten divergierende Anteile der Varianten detektiert werden: für die untersuchte Variante in *RB1* stieg der Anteil innerhalb eines Monats nach der Operation auf 0,32 % und sank im nächsten Monat wieder auf 0,05 %. Zum Zeitpunkt der Panendoskopie des zweiten Rezidivs stieg ihr Anteil erneut leicht auf 0,09 %. Der Anteil der *NOTCH1* Variante dagegen sank im ersten Monat nach der Operation auf 0,03 %, stieg dann auf 0,1 %. In der Plasmaprobe zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs sank ihr Anteil auf 0,06 % (Abb. 10).

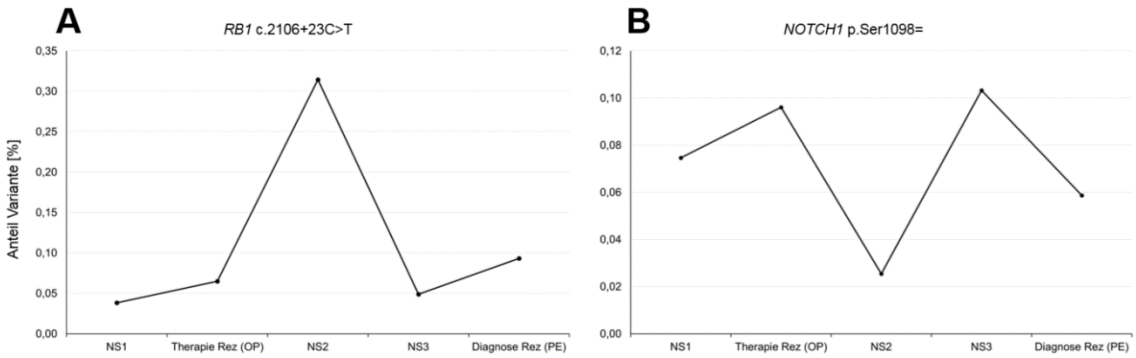


Abb. 10: Anteil detektierter Varianten im Plasma im Verlauf eines Patienten mit LR/FM.
(A) *RB1* c.2106+23C>T, (B) *NOTCH1* c.3294C>T, p.Ser1098=. Rez: Rezidiv; NS: Nachsorge Termine; OP: Operation; PE: Panendoskopie.

3. Diskussion

Primäres Ziel des Projekts war zunächst die Identifizierung und Monitorierung spezifischer Mutationen HPV$^+$ OPSCC in Flüssigbiopsien. Dafür wurde nach einer Literaturrecherche ein spezifische Auswahl an Genen (Genpanel) erstellt, welche häufig in HPV$^+$ HNSCC mutiert sind und zeitgleich analysiert werden können. Mittels des Panels analysierten wir Tumorproben von Patienten mit HPV$^+$ OPSCC mit und ohne LR/FM auf genetische Unterschiede, um für jeden Patienten spezifische Marker zu identifizieren, da wir insbesondere bei Patienten mit LR/FM die Nachweisbarkeit relevanter genetischer Marker vermuteten. Trotz interessanter Ergebnisse, lagen die meisten Mutation jedoch nur mit einer geringen Allelfrequenz vor, so dass diese Marker mittels der zur Verfügung stehenden Techniken nicht direkt in der Flüssigbiopsie untersucht werden konnten. Deswegen wurde zunächst die Tauglichkeit von HPV-DNA als Marker in Flüssigbiopsien analysiert. HPV-DNA ist in HPV$^+$ Tumoren ein stabiler Marker, der im Gegensatz zu heterogenen Tumormutation auch bei einem HPV$^+$ Rezidiv vorliegen sollte. Nach dem erfolgreichen Nachweis der HPV-DNA im Plasma untersuchten wir anschließend zuvor detektierte Mutationen in der Flüssigbiopsie während des Krankheitsverlaufs.

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse der Teilaspekte dieser Arbeit im Detail interpretiert und im Zusammenhang zur bestehende Literatur eingeordnet.

3.1. Entwicklung des Genpanels

Zur Identifikation Patienten-spezifischer genetischer Marker führten wir eine Literaturrecherche bezüglich HPV$^+$ OPSCC und HNSCC auf Gene und bestimmte chromosomale Regionen durch, die häufig als mutiert beschrieben wurden. Basierend auf der wachsenden Technologie der Sequenzierung wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht, die das Genom HPV$^+$ Tumore untersuchten. Rekurrente Mutationen wurden in Proteinen des PI3K-Signalwegs (besonders *PIK3CA*), in Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (besonders *FGFR2* und *FGFR3*), Signalwegen der DNA-Reparatur (z.B. *Ataxia-telangiectasia mutated kinase* (*ATM*), *Fanconi anemia group G protein* (*FANCG*), *Fanconi anaemia, complementation group A* (*FANCA*), *RAD51 Paralog B* (*RAD51B*)) und der Immunantwort (z.B. *TRAF3*, *Humane Leukozytenantigene A und B* (*HLA-A*, *HLA-B*)) gefunden (Rusan *et al.* 2015; Seiwert *et al.* 2015). Diese Studien berichten, dass viele Gene sowohl in HPV$^+$ als auch in HPV$^-$ HNSCC mutiert sind (z.B. *NOTCH*, Gene der *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia* (*MLL*), *RAS*, *TP63*) (Rusan *et al.* 2015). Allerdings zeigen sich Unterschiede in den Mutationsraten von *CDKN2A* und *TP53*, welche im Großteil der HPV$^+$ HNSCC in ihrer Wildtyp-Form vorliegen. 60-80 % der HNSCC insgesamt und ca. 84 % der HPV$^-$ HNSCC weisen Mutationen von *TP53* auf

(Leemans *et al.* 2011). Hingegen wies der PI3K-Signalweg, und davon besonders *PIK3CA*, in HPV$^+$ HNSCC am häufigsten Mutationen auf. Eine weitere Übersicht zu genomischen Aberrationen in HNSCC bestätigt die vorherigen Studien (Leemans *et al.* 2018). Die häufigsten Aberrationen in HNSCC Tumorzellen finden sich auf den Chromosomen 3p, 9p und in *TP53*. Auf dem Chromosom 9p liegt das Gen *CDNK2A*, das den Zellzyklus kontrolliert (vgl. Abb. 3). Der WNT-Signalweg, der eine zentrale Rolle bei der Embryogenese spielt und auch bei vielen Karzinomen Veränderungen aufweist, ist bei HNSCC ebenso betroffen. Als Teil dieses Signalwegs wurden in HNSCC besonders die Gene *FAT1*, *NOTCH1* und *AJUBA* in mehreren Studien als mutiert beschrieben. Dogan *et al.* untersuchten prognostische Marker in HPV$^+$ und HPV$^-$ OPSCC mittels gezielter Exomsequenzierung (Dogan *et al.* 2019). Dabei zeigte sich, dass HPV$^-$ OPSCC, Rauchen und die Tumorlokalisation am Gaumensegel einen negativen Einfluss auf die Prognose haben. Innerhalb der HPV$^+$ OPSCC sind *NOTCH1* Mutationen mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Auf chromosomaler Ebene wurden in HPV$^+$ OPSCC mehr Aberrationen auf Chromosom 8p, 8q und 16q gefunden, wohingegen bei HPV$^-$ OPSCC die Chromosomen 9p, 18q und 21q betroffen waren. Neue, potentiell funktionelle intragenische Deletionen in HPV$^+$ OPSCC wurden in den Genen *JAK3*, *MYC* und *EP300* gefunden. Bezüglich rekurrenter bzw. metastasierter HPV$^+$ HNSCC unterscheidet sich das genetische Profil im Vergleich zu Primärtumoren. Morris *et al.* konnten zeigen, dass das molekulare Profil rekurrenter/metastasierter HPV$^+$ HNSCC ähnlich zu HPV$^-$ HNSCC ist, inklusive einer erhöhten Mutationsfrequenz von *TP53* sowie Genomduplikationen und Deletionen auf dem Chromosom 3p (Morris *et al.* 2017). In der beschriebenen Kohorte zeigten 43 % der fortgeschrittenen HPV$^+$ HNSCC einen Genotyp, der primären HPV$^-$ HNSCC ähnelt. Diese „HPV$^-$ ähnlichen“ HPV$^+$ HNSCC wiesen zudem ein verschlechtertes Überleben auf. Weiterhin lagen in rekurrenten/metastasierten HPV$^+$ HNSCC höhere Mutationsfrequenzen von *TP53* und geringere Mutationsraten von *PIK3CA* vor als in primären HPV$^+$ HNSCC.

3.2. Einsatz nicht-invasiver Flüssigbiopsien im Klinikalltag

Nicht-invasive Flüssigbiopsien sind ein wachsender Forschungsbereich und werden genutzt, um das Therapieansprechen und die Tumorlast während der Nachsorge zu überwachen, zur Detektion eines minimalen Residualtumors und zur Erforschung der Krebsevolution (Bronkhorst *et al.* 2019; Corcoran *et al.* 2018; De Mattos-Arruda *et al.* 2013; Jung *et al.* 2010; Schwarzenbach *et al.* 2011). Ein etablierter Bereich der cfDNA Detektion ist die Identifikation von *EGFR* Mutationen im NSCLC als Alternative zu Gewebebiopsien (Papadopoulou *et al.* 2019). Einige diagnostische Tests (z.B. der FDA (U*.S. food and drug administration*)-zugelassene cobas® EGFR Mutation Test v2

(Roche Diagnostics) und CellSearch®-based *Circulating Tumor Cell* Auszählung) sind bereits im Klinikalltag angekommen und etabliert (Babayan *et al.* 2018; Bardelli *et al.* 2017; Douillard *et al.* 2014). In HNSCC ist die Detektion von EBV im Plasma von Patienten mit NPC als Biomarker zur frühen Detektion und als Prognostikator nach der Therapie verifiziert (Li *et al.* 2021; Papadopoulou *et al.* 2019). Aufgrund der inter- und intraumoralen Heterogenität solider Tumore bezüglich aberranter Gene stellt die Bestimmung spezifischer und stabiler Marker ein Problem dar (Ledgerwood *et al.* 2016; Mroz *et al.* 2017; Tellez-Gabriel *et al.* 2016), die in Flüssigbiopsien im Verlauf untersucht werden könnten. Verglichen mit somatischen Mutationen ist DNA kanzerogener Viren dagegen ein stabiler Marker in Bezug auf die klonale Selektion, da die Zellproliferation im Tumor meist auf die Aktivität der viralen Onkoproteine angewiesen ist. Daher sind Flüssigbiopsien besonders geeignet für Patienten mit einer Infektion kanzerogener Viren, beispielsweise HPV.

3.3. Identifikation genetischer Varianten bei HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC

3.3.1. Mutationsraten HPV-getriebener und HPV-negativer OPSCC

Aufgrund der zugrunde-liegenden karzinogenen Mechanismen werden in HPV^- OPSCC mehr Mutationen erwartet. Konform der Erwartungen detektierten wir eine höhere Mutationszahl in HPV^- (insgesamt 464 Mutationen, 16,6 Mutationen/Tumor) verglichen zu HPV^+ (insgesamt 183 Mutationen, 6,5 Mutaionen/Tumor; $p \leq 0{,}001$) OPSCC. In der Literatur gibt es einerseits Publikationen, die keine Unterschiede in der Mutationsrate zwischen HPV^- und HPV^+ Kopf-Hals-Tumoren fanden (Cancer Genome Atlas 2015; Seiwert *et al.* 2015) und andererseits solche, die mehr Mutationen in HPV^- OPSCC als in HPV^+ OPSCC detektierten (Agrawal *et al.* 2011; Boscolo-Rizzo *et al.* 2016; Harbison *et al.* 2018). In den Studien von TCGA, Seiwert *et al.* und Agrawal *et al.* wurden HNSCC allgemein untersucht, wovon der Oropharynx nur ein Bereich ist und sich der Anteil HPV^+ Tumore verringert (Agrawal *et al.* 2011; Cancer Genome Atlas 2015; Seiwert *et al.* 2015). Die Studien von Boscolo-Rizzo *et al.* und Harbison *et al.* dagegen fokussierten ihre Analysen auf OPSCC (Boscolo-Rizzo *et al.* 2016; Harbison *et al.* 2018). Diverse Studien zeigen, dass sich die Entitäten der Kopf-Hals-Tumore bzw. der HNSCC in ihren klinischen und molekularen Charakteristika unterscheiden und differenziert betrachtet werden müssen (Andreasen *et al.* 2019; Chow 2020; Gillison 2004; Klussmann 2017; Murray *et al.* 2015; Powell *et al.* 2021). Besonders aufgrund der geringen Zahl an HPV^+ Tumoren und der Inhomogenität eingeschlossener Entitäten in vorherigen Studien werden detailliertere Untersuchungen gebraucht, um die Fallzahlen bezüglich seltener Tumorentitäten zu erhöhen und den Fokus auf eine spezifische Entität legen zu können.

3.3.1.1. Mutationsrate von *TP53* in HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC

Hinsichtlich *TP53* Mutationen detektierten wir eine höhere Rate in HPV^- als in HPV^+ OPSCC ($p \leq 0{,}001$), was den Erwartungen und der Literatur entspricht (Agrawal *et al.* 2011; Kobayashi *et al.* 2018; Litwin *et al.* 2017). Da das p53 Protein den Zellzyklus reguliert, akkumulieren viele Tumore Mutationen in *TP53*, was zu einem Funktionsverlust des Proteins und damit einer unkontrollierten Zellreplikation führt. In unserer Studie war *TP53* in je 12/14 (85,7 %) Patienten mit HPV^- OPSCC mit und ohne LR/FM mutiert, aber nur in fünf Patienten mit HPV^+ OPSCC mit LR/FM und zwei Patienten ohne LR/FM. Daher scheinen *TP53* Mutationen den Krankheitsverlauf weder bei Patienten mit HPV^- noch HPV^+ OPSCC signifikant zu beeinflussen. Wir fanden höhere *TP53*-Mutationsraten in der Gruppe der HPV^+ OPSCC als zuvor in der Literatur beschrieben: in unserer Studie wiesen insgesamt 7/28 (25,0 %) HPV^+ OPSCC eine *TP53* Mutation auf. Eine Studie beschreibt *TP53* Mutationen in 84,8 % der HPV^- HNSCC, aber nur in 2,8 % der HPV^+ HNSCC (Cancer Genome Atlas 2015). Allerdings wurde auch bereits ein ähnliches molekulares Profil von HPV^+ OPSCC von Patienten mit LR/FM und HPV^- OPSCC beschrieben, inklusive einer höheren Mutationsrate in *TP53* (15 % HPV^+ HNSCC) (Morris *et al.* 2017). In HPV^+ Tumoren entstehen maligne Zellen hauptsächlich aufgrund der Degradation von p53 und der Deregulierung von pRb unter Einwirkung der viralen Proteine, jedoch nicht aufgrund der Akkumulation von Mutationen in diesen Genen. Daher liegt p53 in HPV^+ Tumoren üblicherweise in seiner Wildtyp-Form vor. Eine erhöhte Mutationsrate in unserer Kohorte von HPV^+ OPSCC im Vergleich zur Literatur könnte aus der Zusammenstellung der Kohorte mit einer größeren Zahl an Patienten mit LR/FM hervorgehen, da HPV^+ OPSCC von Patienten mit LR/FM in unserer Studie mehr *TP53* Mutationen (5/14 Patienten) zu haben scheinen als das Tumorgewebe von Patienten ohne LR/FM (2/14 Patienten). Aufgrund der geringen Fallzahlen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Dies könnte allerdings durch größere Studien mit mehr Patienten kompensiert werden und eindeutigere Ergebnisse zur besseren Einordnung und Interpretation liefern. Bezüglich der Mutationsfrequenz zwischen allen vier Untergruppen entstehen die Unterschiede vermutlich aus der insgesamt hohen Mutationsrate in HPV^- OPSCC von Patienten ohne LR/FM und der sehr geringen Rate in HPV^+ OPSCC von Patienten ohne LR/FM.

3.3.2. tNGS-identifizierte Mutationen in Patienten in Abhängigkeit des Therapieansprechens

Unterteilt man unsere Kohorte unabhängig vom HPV-Status, sind weder bezüglich der Gesamtmutationszahl, noch bezüglich *TP53*-Mutationen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne LR/FM sichtbar. Weiterhin gibt es innerhalb der HPV^+ oder der

HPV$^-$ OPSCC, jeweils aufgeteilt nach LR/FM-Status, keinen Unterschied in der Gesamt- und *TP53*-Mutationsrate. Diese Daten lassen vermuten, dass nicht die absolute Anzahl an Mutationen für den Krankheitsverlauf verantwortlich ist, sondern dass andere Mechanismen oder individuelle Treibermutationen wichtigere Faktoren sind.

3.3.2.1. Vergleich der Mutationen in HPV-getriebenen OPSCC unterteilt in Patienten mit und ohne Therapieversagen

Bei der Untersuchung von HPV$^+$ OPSCC detektierten wir unterschiedliche Mutationsraten in mehreren der analysierten Genen bei Patienten mit und ohne LR/FM. In Primärtumorgewebe von Patienten mit LR/FM lagen Mutationen in mehr Genen und mehr Einzelmutationen vor als von Patienten ohne LR/FM. Insbesondere die Gene *STK11*, *HRAS*, *PIK3R1* und *TP63* waren häufiger mutiert. Übereinstimmend mit Literaturdaten detektierten wir keine Mutationen in den Codons 12, 13 oder 15 von *KRAS* (Prigge *et al.* 2014). Allerdings fanden wir eine *KRAS* Mutation in Tumorgewebe eines Patienten ohne LR/FM. Laut Literatur führt der detektierte Aminosäureaustausch von Serin zur Asparagin an Codon 17 (p.Ser17Asn) zu einer erhöhten Bindungsaffinität der Austauschfaktoren (Matallanas *et al.* 2003). Somit konkurriert die Mutante mit Wildtyp RAS-Proteinen um die Austauschfaktoren, kann aber nicht mit intrazellulären Effektoren interagieren und resultiert daher in unproduktiven Komplexen. In den TCGA Daten finden sich keine Informationen zu LR/FM bei Patienten mit HPV$^+$ OPSCC (Cancer Genome Atlas 2015; Cerami *et al.* 2012; Gao *et al.* 2013; über https://www.cbioportal.org/study/summary?id=hnsc_tcga_pub, Stand: 19.01.2022). In Anbetracht der Probenanzahl und Rezidivrate bei HPV$^+$ OPSCC kann vermutet werden, dass alle 22 HPV$^+$ OPSCC Patienten der TCGA Studie ohne LR/FM sind. Weiterhin fanden sich in dieser Studie keine *TP53* Mutationen in HPV$^+$ OPSCC (Cancer Genome Atlas 2015), wohingegen wir *TP53* Varianten in fünf (41,7 % mit LR/FM) bzw. zwei (16,7 % ohne LR/FM) HPV$^+$ Proben detektierten. Abgesehen von Exon 6, Exon 7 und Exon 11 sind die Frequenz und Verteilung der *TP53* Mutationen über alle Exons vergleichbar mit publizierten Daten (Internationale Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), Veröffentlichung R19) (Bouaoun *et al.* 2016). Exon 6 und 7 (geringere Mutationsfrequenz in unserer Kohorte mit LR/FM verglichen zu TCGA Daten) sind Teil der DNA-Bindedomäne, während für Exon 11 keine funktionelle Proteindomäne beschrieben ist. Allerdings sind in Exon 11 (höhere Mutationsfrequenz in unserer Kohorte mit LR/FM verglichen zu TCGA Daten) Aminosäuren mit biologischer (z.B. Variante p.Gly389Glu) oder post-transkriptioneller Funktion beschrieben, deren Mutation die Transkriptionsaktivität beeinflussen (Feng *et al.* 2005; Friedler *et al.* 2005; Pirolli *et al.* 2010). Zudem ist beschrieben, dass metachrone, rezidivierende OPSCC eine genomische Landschaft ähnlich zu HPV$^-$ OPSCC und dementsprechend auch eine

höhere *TP53* Mutationsrate aufweisen (Harbison *et al.* 2018). Obwohl *TP53* Mutationen in HPV$^+$ OPSCC eher selten auftreten, könnten sie in unserer Kohorte eine Rolle bei der Entstehung von LR/FM spielen. Es bleibt aber offen, ob LR/FM in Patienten mit HPV$^+$ OPSCC kausal mit individuellen *TP53* Mutationen in Zusammenhang gebracht werden kann oder ob zusätzliche *Lifestyle*-Risikofaktoren (z.B. Tabakkonsum) und korrespondierende (prä-kanzerogene) genetische Veränderungen den karzinogenen Mechanismus der HPV-Infektion verstärken. Trotz unseres limitierten Panels an sequenzierten Regionen ergab unserer Studie interessante und (bezüglich *TP53*) unerwartete Ergebnisse. Insgesamt konnten wir zeigen, dass genetische Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen.

3.3.2.2. Unterschiede der Mutationen in HPV-negativen OPSCC unterteilt in Patienten mit und ohne Therapieversagen

Innerhalb der HPV$^-$ OPSCC zeigten sich, abgesehen von *FAT1*, keine signifikanten Unterschiede in der Mutationsfrequenz der untersuchten Gene zwischen Patienten mit und ohne LR/FM. Mutationen im Gen *FAT1* waren in HPV$^-$ OPSCC von Patienten ohne LR/FM häufiger als in Patienten mit LR/FM (p=0,043). Das humane *FAT1* Gen reguliert das Zellwachstum, die Migration sowie die Polarisierung mit einer Rolle sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen (Hayes *et al.* 2016). Eine Studie zeigte, dass *FAT1* im Ösophaguskarzinom das Tumorwachstum und die epithelial-mesenchymale Transition inhibierte, welche ein wichtiger Schritt der Metastasierung ist (Hu *et al.* 2017). Eine weitere Studie fand eine Assoziation zwischen *FAT1* Mutationen und einem verbesserten Gesamtüberleben in Patienten mit HPV$^-$ OPSCC, jedoch nicht bei Patienten mit HPV$^+$ OPSCC (Kim *et al.* 2016). In Übereinstimmung damit detektierten wir mehr *FAT1* Mutationen in Patienten mit HPV$^-$ OPSCC ohne LR/FM als in Patienten mit HPV$^-$ OPSCC mit LR/FM (22 vs. 5 Varianten). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Mutationen in *FAT1* die Tumorprogression in HPV$^-$ OPSCC Patienten negativ beeinflusst.

3.3.3. Zusammenfassung der Mutationsstudie zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC mit und ohne Therapieversagen

Mittels der Sequenzanalysen von HPV+ OPSCC und HPV$^-$ OPSCC, jeweils von Patienten mit und ohne LR/FM, konnten wir mehrere Schlüsse ziehen: (I) mit Hilfe eines limitierten tNGS-Panels konnten keine Mutationen identifiziert werden, die eindeutig und in Patientengruppen wiederkehrend mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert sind. (II) Insgesamt scheint nicht die Anzahl der Mutationen für den Krankheitsverlauf ursächlich zu sein, sondern (III) vielmehr spezifische Mutationen scheinen am ehesten mit einem erneuten Auftreten der Krankheit assoziiert zu sein. (IV) Mit der Ausnahme

von *TP53* zeigen HPV$^+$ OPSCC von Patienten mit Therapieversagen ein ähnliches Mutationmuster wie HPV$^-$ OPSCC.

Eine Schwäche unserer Studie ist die geringe Zahl an primären HPV$^+$ OPSCC von Patienten, die LR/FM entwickeln. Obwohl die Inzidenzen HPV$^+$ OPSCC steigen, ist die Patientenzahl, die ein Rezidiv entwickeln im Verhältnis gering und wir waren auf ein retrospektives Studiendesign und archivierte FFPE Gewebeproben beschränkt. Weiterhin verwendeten wir tNGS anstelle von WES oder Genomsequenzierung (*whole genome sequencing*, WGS), welche qualitativ sehr hochwertige DNA benötigen. Neben zukünftigen technologischen Fortschritten von Sequenzierungsmethoden lösen Multicenter und/oder longitudinale Studien dieses Problem aber für weitere Studien oder einer Wiederholung der aktuellen Probe. In unserer Studie konnten durch die in ihren klinischen Eigenschaften entsprechenden Patientenproben Unterschiede aufgrund der Tumoreigenschaften vermindert werden. Allerdings konnten durch die Selektion der Proben aus den nicht-limitierten Patientengruppen ebenso Artefakte eingebracht werden. Die signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben und in unseren Sequenzierungsdaten lassen vermuten, dass ein erneutes Tumorauftreten in HPV$^-$ und HPV$^+$ OPSCC durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen wird. In HPV$^-$ OPSCC könnten spezifische Mutationen die Tumorprogression und Metastasierung vorantreiben. In HPV$^+$ OPSCC dagegen scheint neben spezifischen Treibermutationen eine erhöhte *TP53*-Mutationsfrequenz (wie wir sie in entsprechenden Proben fanden), möglicherweise als ein sekundärer Prozess, das Wiederauftreten des Tumors zu begünstigen.

In einer früheren Studie wurde mittels WES die Mutationslandschaft rezidivierter und nicht rezidivierter HPV$^+$ OPSCC im Vergleich zu HPV$^-$ Tumoren untersucht (Harbison *et al.* 2018). Es wurde gezeigt, dass metachrone HPV$^+$ OPSCC eine ähnliche genomische Signatur aufweisen wie HPV$^-$ Kopf-Hals-Tumore und dass wiederauftretende HPV$^+$ OPSCC genetisch vergleichbar mit nicht rekurrenten HPV$^+$ OPSCC sind. Diese Erkenntnisse stimmen mit unseren Ergebnissen überein, obwohl die Studie von Harbison et al. zwei wesentliche Schwächen aufweist: (I) die kombinierten Datensätze aus öffentlichen WES Daten (Cancer Genome Atlas 2015) und deren eigenen Sequenzierungsdaten (mittels WES und tNGS in nicht definiertem Umfang) repräsentieren eine selektierte Kohorte unterschiedlicher Sublokalisationen, während unsere Studie sich auf OPSCC konzentriert. (II) Proben aus eigenen Archiven wurden nur auf p16^{INK4A} Färbung untersucht und nicht auf HPV-DNA, was zur HPV-Kategorisierung nicht ausreichend ist (Bussu *et al.* 2014; Rietbergen *et al.* 2014; Wagner *et al.* 2020).

Zusammengefasst stellten wir fest, dass HPV$^+$ OPSCC von Patienten mit LR/FM mehr

Mutationen aufwiesen als HPV$^+$ OPSCC von Patienten ohne LR/FM. Allerdings ist die Mutationsrate ähnlich der von LR/FM-Patienten mit HPV$^-$ OPSCC. Überraschenderweise hatte das Primärtumorgewebe von Patienten mit HPV$^-$ OPSCC ohne LR/FM die meisten Mutationen und nicht wie erwartet die HPV$^-$ OPSCC der Patienten mit LR/FM. Wir nehmen an, dass nicht die Anzahl an Mutationen, sondern spezifische Treibermutationen die dominant kausalen Faktoren für Tumorwiederauftreten sind.

3.4. Die Konzentration der zell-freien HPV-DNA im Plasma korreliert mit dem Krankheitsverlauf

In 25/28 (89 %) Plasmaproben unserer Patienten mit HPV$^+$ OPSCC konnten wir zell-freie *E6*- und *E7*-DNA vor der Therapie detektieren. Neun Patienten zeigten Signale für die HPV-Onkogene in mindestens zwei Nachsorge-Proben. Entsprechend der Literatur (Hanna *et al.* 2018) konnten wir einen Anstieg der cfHPV-DNA vor klinischer Diagnose des Rezidivs in vier Patienten beobachten. In den anderen fünf Patienten wurde bis zum Ende der Nachbeobachtung im Rahmen dieser Studie (02/2020) klinisch kein Anhaltspunkt für ein Rezidiv diagnostiziert. Einer dieser fünf Patienten wurde klinisch mit R1 (mikroskopische Detektion von Residualzellen am Schnittrand) klassifiziert, einer wurde nur mit einer primären Radiochemotherapie behandelt; die restlichen drei waren R0 nach einer Operation (einer ohne, zwei mit adjuvanter Radio(chemo)therapie). Aufgrund der Sensitivität zur Detektion MRD verschiedener Krebsentitäten, kann vermutet werden, dass in R1-klassifizierten Patienten verbliebene Tumorzellen im Blut detektierbare HPV-DNA verursachen könnten (Bidard *et al.* 2019; Chakrabarti *et al.* 2020; Diehn *et al.* 2017; Yang *et al.* 2020b). Die Primärumordiagnose aller fünf Patienten lag zwischen 2015 und 2017, was bis April 2020 innerhalb der 5-Jahresrate lag, in der die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv noch sehr hoch ist (Lin *et al.* 2013).

Beachtenswert ist, dass die gemessene *E7*-DNA Konzentration durchgängig höher war als die der entsprechenden *E6*-DNA. Das kann an einer erhöhten Bindungseffizienz der entsprechenden Primer und Sonden oder an einer geringeren Stabilität der *E6* Fragmente verglichen mit den *E7* Fragmenten im Blut liegen. Dies unterstreicht das Problem eines validen Schwellenwerts. Da es sich hier um eine Pilotstudie handelt, definierten wir keinen Schwellenwert, sondern berichteten absolute Werte. Betrachtet man allerdings unsere Reihenverdünnung des Standards, könnten wir eine valide Nachweisgrenze von 10 Kopien/Reaktion empfehlen, was in unserem Fall einem Schwellenwert von $2{,}5*10^3$ Kopien/Milliliter Plasma entspricht.

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Detektion zirkulierender HPV-DNA vor der Erstlinien-Therapie und nach Chemotherapie eine prognostische Signifikanz bei HPV$^+$ fortgeschrittenen Analkarzinomen hat (Mallen-St Clair *et al.* 2016). Obwohl die

Rezidivrate in HPV$^+$ OPSCC gering ist, zeigen die Daten unserer Studie, dass cfHPV-DNA im Plasma mit konventionellen Methoden (*Real-time* Polymerasekettenreation, RT-PCR) detektiert und mit der Tumorlast und dem Krankheitsverlauf korreliert werden kann. Um ihre Rolle als Biomarker zu validieren, sind allerdings größere Patientenkohorten und längere Nachsorge-Intervalle nötig. Dies wurde in der Studie von Chera et al. realisiert (Chera *et al.* 2020): Hier wurden 115 Patienten mit nicht metastasiertem OPSCC über einen Zeitraum von 23 Monaten mittels digitaler PCR auf cfHPV-DNA im Plasma untersucht. 13 % der untersuchten Patienten enwickelten ein Rezidiv und mit der Detektion von cfHPV-DNA in zwei konsekutiven Plasmaproben lag der positive prädiktive Wert bei 94 %. Wie auch wir in unserer Studie (s. Kapitel 2.1, Abb. 4 der Publikation) konnten Chera *et al.* einen Anstieg der cfHPV-DNA bereits vor (im Median 3,9 Monate) der klinischen Bestätigung eins Rezidivs beobachten. Eine weitere Studie zeigte eine Korrelation zwischen cfHPV-DNA vor der Therapie und dem Lymphknotenstatus sowie der Gesamttumorlast (klassifiziert mit UICC Edition 6) (Dahlstrom *et al.* 2015). Unsere Untersuchungen bestätigen diesen Zusammenhang zwischen der *E6*- und *E7*-cfHPV-DNA mit dem Lymphknotenstatus (N0 vs. N+; *E6*: p≤0,001, *E7:* ≤0,001; vgl. Publikation in Kapitel 2, Abb. 2) und dem Satus der Fernmetastasierung (M0 vs. M+; *E6*: p≤0,001, *E7*≤0; vgl. Publikation in Kapitel 2, Abb. 2). Bezüglich der Gesamttumorlast nach UICC Edition 8 lag in unseren Daten allerdings kein Zusammenhang vor, weder klassifiziert nach Stadium I+II vs. III+IV noch klassifiziert nach Stadium I-III vs. IV (*E6*: p=0,615 bzw. p=0,518, *E7*=0,518 bzw. p=0,518; Mann-Whitney U Test). Allerdings kann diese Differenz auch an der unterschiedlichen Tumorklassifizierung (UICC Version 6 vs. 8) und der Anzahl untersuchter Fälle liegen. Lee *et al.* untersuchten lokal fortgeschrittene HPV$^+$ Kopf-Hals Tumore auf zirkulierende HPV-DNA mittels NGS (Lee *et al.* 2017). Sie zeigen, dass der entwickelte NGS-Assay *HPV16-detect* in Kombination mit der Positronen-Emissions-Tomographie mit Computertomographie (PET-CT) zuverlässig das Wiederauftreten des HPV$^+$ Tumors detektiert. Allerdings ist NGS eine Zeit- und Kosten-intensive Methode, die für eine „einfache“ HPV-DNA Detektion im Plasma sehr hochwertig ist. Im Gegensatz zu Tumor-spezifischen Mutationen benötigt die Detektion von cfHPV-DNA keine Sequenzierung und detaillierte Analyse des Primärtumors.

Eine allgemeine Schwäche bezüglich der Analyse Tumor-spezifischer Mutationen stellt die Tumor-Heterogenität dar: sogar innerhalb eines Tumors können Zellen unterschiedliche Mutationsprofile tragen (Ledgerwood *et al.* 2016) und anhand des Primärtumorgewebe ausgewählte Mutationen könnten aufgrund klonaler Selektionsprozesse im rezidivierenden Tumor fehlen, was für virale DNA in HPV$^+$ Tumoren normalerweise nicht der Fall ist (Gravitt *et al.* 2017; Mirghani *et al.* 2018), sofern

die rezidivierenden Tumorzellen weiterhin von der viralen Karzinogenese abhängig sind. Die beobachtete Korrelation von Tumorlast und Detektion viraler cfDNA im Plasma stimmt mit früheren Daten HPV$^+$ Oropharynxkarzinome überein, die mit digitaler PCR analysiert wurden (Hanna *et al.* 2018) und zum großen Teil mittels einer Chemo- oder einer Immuntherapie behandelt wurden. Demgegenüber nutzten wir qRT-PCR und 63,3 % unserer Patienten erhielten eine sanierende Operation als primäre Therapie. Einschränkungen unserer Pilotstudie sind die kleine Probengröße und eine gewisse Inkonsistenz der Zeitpunkte der Probensammlung, welche sich aus den individuellen Nachsorgeterminen der Patienten ergab. Weiterhin ist ein Wiederauftreten des Tumors in HPV$^+$ OPSCC ein vergleichsweise seltenes Ereignis. Daher waren wir auf retrospektiv gesammelte Proben angewiesen, was ebenfalls zu den inkonsistenten Zeitpunkten der Probenentnahme beigetragen hat. Wir nutzten qRT-PCR anstelle anderer, eventuell sensitiverer Methoden (z.B. multiplexer digitaler PCR) aus folgendem Grund: qRT-PCR ist eine Preis-günstige, etablierte Methode und die benötigten Materialien und Geräte sind in den meisten Diagnostik- und Forschungslaboren vorhanden. Nichtsdestoweniger ist eine Stärke unserer Studie die longitudinale Probensammlung bezogen auf die Behandlung und die Bedeutung viraler DNA als Biomarker in OPSCC. Besonders die hohe Zahl an Patienten mit einer sanierenden Operation ist eine Stärke unserer Studie, da in Deutschland sanierende Operationen, im Gegegnsatz zu vielen englischsprachigen Ländern, die bevorzugte Therapieform für OPSCC sind. Folglich werden weitere Studien mit größeren Patientenkohorten, definiertem Probenentnahmeplan und längeren Nachbeobachtungszeiten benötigt, um unsere Ergebnisse zu verifizieren.

Insgesamt betrachtet ist die Detektion von cfHPV-DNA im Plasma von Patienten mit HPV$^+$ OPSCC eine valide und zuverlässige Methode, um die virale Onkogen-Last in OPSCC zu beobachten. Wir konnten zeigen, dass qRT-PCR geeignet ist, um die An- beziehungsweise Abwesenheit zell-freier DNA der HPV Onkogene *E6* und *E7* zu verfolgen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Veränderungen in der cfHPV-DNA Konzentration mit dem Krankheitsverlauf korrelieren. Daher ist cfHPV-DNA ein vielversprechender Biomarker, um minimale Residualtumore zu detektieren, Rezidive frühzeitig zu erkennen und um die Reduktion der Tumorlast während der Therapie zu überwachen. Besonders im Hinblick auf bevorstehende de-eskalierende Therapiestrategien, könnte die Detektion von cfHPV-DNA genutzt werden, um das Therapieansprechen zu kontrollieren und Hochrisiko-Patienten frühzeitig zu identifizieren, die für ein de-eskaliertes Therapiekonzept ungeeignet sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Pilotstudie interessante Daten hervorgebracht hat, die cfHPV-DNA als vielversprechenden Biomarker für HPV$^+$ OPSCC

andeutet.

3.5. Detektion Tumor-spezifischer Mutationen HPV-getriebener OPSCC im Plasma während der Nachsorge

Neben dem Nachweis viraler DNA können auch Tumor-spezifische Mutationen monitoriert werden. Diese somatischen Marker werden bereits vielfach bei Leukämien genutzt (Aziz *et al.* 2017). Jedoch sind solide Tumore heterogener in ihrem Mutationsprofil als beispielsweise Leukämien und Selektionsprozesse während der Therapie könnten das Wachstum von Zellklonen begünstigen, die im Primärtumor nur in geringer Zahl vorhanden sind. Diesen Klonen könnte der gewählte genetische Marker fehlen, was ein Monitoring erschweren würde. Weitere Herausforderungen sind die schwankenden cfDNA Konzentration (Aravanis *et al.* 2017; Ignatiadis *et al.* 2015; Tang *et al.* 2016) sowie die zum Großteil unerforschte genetische Charakterisierung von HPV^+ OPSCC. Allerdings gibt es bereits Studien, die somatische Mutationen des HNSCC Primärtumors im Krankheisverlauf untersuchten. Wang *et al.* analysierten somatische Mutationen und HPV-DNA in Speichel und Plasma von Patienten mit HNSCC mittels zwei PCR-basierter Methoden (Safe-SeqS und digitaler PCR) (Wang *et al.* 2015). In 75 HNSCC Patienten (12 HPV^+ und 63 HPV^- HNSCC) wurden somatische Mutationen in Flüssigbiopsien untersucht, die zuvor mittels Sequenzierung ausgewählter Gene in Tumor-DNA detektiert wurden. Von 35 der 75 Patienten (9 HPV^+, 26 HPV^-) lag Speichel und Plasma vor, von den restlichen 40 (3 HPV^+, 37 HPV^-) nur Speichel. Die Mutationen lagen in den Genen *TP53*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *FBXW7*, *HRAS* und *NRAS* (Neuroblastoma RAS). Betrachtet man nur die somatischen Mutationen konnten in 61/63 HPV^- HNSCC und 9/12 HPV^+ HNSCC die vorbekannte Variante in Speichel und/oder Plasma detektiert werden. Die VAF lag dabei zwischen 0,001 % und 11,467 % im Speichel und zwischen 0,016 % und 2,858 % im Plasma. Im Vergleich lagen die VAF unserer untersuchten Varianten im Plasma zwischen 0,02 % und 1,3 % (s. Kapitel 2.4.1) in einem ähnlichen Bereich. Eine Arbeit der *US*-amerikanischen *Association for Molecular Pathology* (AMP) empfiehlt, dass eine VAF <1 % aufgrund intrinsicher Fehler bei der Amplifikation und der Sequenzierung mit Vorsicht zu behandeln sind (Jennings *et al.* 2017). Demgegenüber steht die Notwendigkeit zur Detektion der MRD oder subklonaler Veränderung (Bewicke-Copley *et al.* 2019). Dafür wurden *unique molecular identifiers* (UMI) entwickelt, um PCR-Duplikate zu identifizieren, die Sensitivität und die Detektionsgenauigkeit auch bei DNA mit geringer Qualität zu erhöhen (Bewicke-Copley *et al.* 2019; Salk *et al.* 2018). Die Detektion von derart geringen VAF profitiert von der sensitiven Sequenzierungsmethode, die allerdings nicht in allen Laboren vorliegt und in der Routine durchgeführt wird. Weiterhin sind sensitive Sequenzierungsmethoden immer noch verhältnismäßig teuer und benötigen eine relativ lange Bearbeitungszeit

(Dudley *et al.* 2021; Ilie *et al.* 2014).

3.6. Zusammenfassung des Nachweises von cfHPV-DNA in Plasma

In unserer Pilotstudie zur Monitorierung spezifischer Varianten zeigte sich ein sehr heterogenes Bild bezüglich der VAF in Korrelation zur Therapie: in einigen Proben sank der Anteil der Variante nach der Therapie, während bei anderen Proben dieser relativ konstant blieb. Auch in Korrelation zu einem Rezidiv konnten wir in unseren Daten keinen klaren Trend erkennen. Eine vorherige Studie über das Mutationsprofil solider Tumore in Flüssigbiopsien, die mehrere Krebsentitäten umfasste, konnte eine Übereinstimmung von 89 % in fortgeschrittenem und 32 % in frühem Stadium nachgewiesen werden (Balaji *et al.* 2018). Das zeigt, dass eine Monitierung möglich, aber besonders in frühen Stadien schwierig ist. Eine große Schwäche unserer Untersuchung war, dass kein standardisiertes Setting mit festen Blutabnahmezeitpunkten vorlag und zu wenig Patienten mit verschiedenen Therapieoptionen in die Studie aufgenommen wurde. Damit konnte der Einfluss der gewählten Therapie nicht detaillierter analysiert werden. Die Abnahmezeitpunkte sind in solchen Untersuchungen von großer Bedeutung. Abhängig von physiologischen und pathologischen Umständen und Methode wird für cfDNA eine Halbwertszeit zwischen 4 Minuten und 12 Stunden beschrieben (Khier *et al.* 2018). Zusätzlich zu diesen exogenen Einflüssen spielt bei der DNA-Konzentration im Blut auch die physiologische Reaktionen des Patienten auf die Operation (Henriksen *et al.* 2020) oder allgemein die Behandlung eine Rolle. Daher scheint eine hohe Schwankung der DNA-Konzentration in Abhängigkeit zum Abnahmezeitpunkt (vor/während/nach der Operation) naheliegend. Weiterhin lagen die untersuchten Varianten bereits im Primärtumor zu einem relativ geringen Anteil vor (Kapitel 3.5), was sich dementsprechend in einem verhältnismäßig verringerten Anteil im Plasma widerspiegelt. Um diese Schwächen auszugleichen, wäre eine Studie unter standardisierten Bedingungen mit einer größeren Anzahl an Patienten, einer größeren Auswahl detektierter Varianten pro Patient und Probenentnahmen über einen längeren Zeitraum notwendig. Weiterhin sollte eine hoch-sensitive Sequenzierungtechnologie gewählt werden, um auch Variantenallelfrequenzen nahe der Nachweisgrenze valide detektieren zu können (Dudley *et al.* 2021; Eboreime *et al.* 2016; Kinde *et al.* 2011; Kukita *et al.* 2015). Um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen, könnten zudem Mutations-spezifische quantitative PCR durchgeführt werden wie sie in der Diagnostik bereits etabliert sind (z.B. Quantifizierung von Nucleophosmin (*NPM1*) Mutationen bei akuten myeloischen Leukämien (Forghieri *et al.* 2018; Freeman *et al.* 2019) oder Nachweis/Quantifizierung der *BRAF* p.Val600Glu Varianten bei Haarzellleukämien (Lung *et al.* 2020; Schnittger *et al.* 2012)).

4. Ausblick

Ein umfangreicheres Verständnis der Karzinogenese sowie Fortschritte in der Sequenzierungstechnologie deuten darauf hin, dass zukünftig individuelle Marker und Therapien eine große Rolle bei der Analyse und Verlaufskontrolle von Krebserkrankung spielen werden. Um unsere Ergebnisse zu validieren und zu stärken, könnte ein größer angelegtes Genpanel helfen, Gene und Varianten zu identifizieren, die einen Einfluss auf das Therapieansprechen und damit den Krankheitsverlauf haben. Somit könnten *poor responder* frühzeitig identifiziert und möglicherweise alternativen Therapieansätzen zugeführt werden. Dies ist besonders unter dem Aspekt der aktuell diskutierten und untersuchten Therapie De-Eskalation (Hecht *et al.* 2020; Strohl *et al.* 2020) für Patienten mit HPV^+ OPSCC von Bedeutung. Weiterhin zeigen unsere Daten, dass Plasma von Patienten mit HPV^+ OPSCC während der Nachsorge regelmäßig auf HPV-DNA untersucht werden sollte. Hierdurch kann das Therapieansprechen und der weitere Krankheitsverlauf überwacht werden. Sobald cfHPV-DNA nachgewiesen wird, sollte eine umfassende klinische Untersuchung in Betracht gezogen werden. Neben Blutplasma sollte hier auch die Tauglichkeiten weiterer Flüssigbiopsien für die Monitierung von cfHPV-DNA während der Nachsorge im Bereich der Oropharynxkarzinome untersucht werden. Der Fokus sollte besonders auch auf Speichel liegen, da dieser in der Handhabung einfach zu gewinnen, in großer Ressource vorhanden ist und bei der Abnahme auch für den Patienten keine Schmerzen oder andere Unannehmlichkeiten bereiten. Bezüglich OPSCC ist ein weiterer Vorteil von Speichel die räumliche Nähe zur Primärtumorlokalisation und die damit einhergehende Annahme, dass Tumor- oder virale DNA in einer messbaren Konzentration vorliegen sollte. Die Untersuchung von Flüssigbiopsien im Patienten wurde bisher erfolgreich im Melanom, Mamma-, Kolorektal- und Lungenkarzinom eingesetzt (Pinzani *et al.* 2021). Bis zur klinischen Anwendung der Monitorierung spezifischer Mutationen in Flüssigbiopsien weiterer solider Tumore, unter anderem HPV^+ und HPV^- OPSCC, werden weitere Studien benötigt. Neben der bereits etablierten Detektion therapie-sensitiver Mutationen (z.B. *EGFR*) in cfDNA, ist auch die Kontrolle der MRD mittels Flüssigbiopsien von Bedeutung. Hierfür werden Studien mit höheren Fallzahlen je Tumorentität und standardisierten Untersuchungsprotokollen benötigt, um eventuell vorherrschende Mutationen bestimmter Gene zu bestimmen.

Die erläuterten Aspekte sind prinzipiell auch auf andere Karzinomentitäten übertragbar. Der Fortschritt in der Technologie deutet darauf hin, dass zukünftig eine Sequenzierungen des gesamten Exoms zur individuelle Analyse der Krebserkrankung gehören wird. Damit könnte der Grundstein gelegt werden, Patienten-spezifische und

Tumor-basierte Mutationen während der Therapie zu überwachen, und um zeitnah auf Veränderungen der Variantenallelfrequenz reagieren zu können.

Abstract

Patients with HPV-driven (HPV+) oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) show an improved overall survival and treatment response than patients with HPV-negative (HPV-) OPSCC. Nevertheless, 13 % to 25 % of HPV+ OPSCC patients develop local recurrence or distant metastasis (LR/DM) and show a course of disease similar to that of HPV- OPSCC patients. We aimed to determine specific genetic tumor markers between all four subgroups (HPV+, HPV-, with/without LR/DM) for monitoring minimal residual disease and identifying HPV+ OPSCC patients with an increased risk of relapse. Therefore, we designed a gene panel for targeted next generation sequencing comprising 90 target regions in 22 genes. With this panel, we analyzed the mutational profile of 14 patients each with HPV+/HPV- OPSCC with/without LR/DM for somatic mutations and copy number aberrations. Subsequently, cell-free (cf) DNA from plasma was examined for the previously identified variants. Additionally, a quantitative PCR (qPCR) for the HPV-oncogenes E6 and E7 in cfDNA before therapy and during follow-up care was performed.

HPV- OPSCC had significantly more mutations in general and in TP53 than HPV+ OPSCC. Overall mutation rates in OPSCC of patients with and without LR/DM were similar. Within HPV- OPSCC, FAT1 was mutated more frequently in patients without LR/DM than in patients with. In HPV+ OPSCC, HRAS, PIK3R1, STK11 and TP63 were mutated more frequently in patients with LR/DM than in patients without. Excepting TP53, HPV+ OPSCC from patients with LR/DM and HPV- OPSCC showed a similar overall mutation pattern. Regarding chromosomal aberrations, no specific differences were observed between HPV+ OPSCC patients with and without LR/DM. Somatic mutations from our solid OPSCC tumors could only be detected in a small proportion of our samples and with limited validity in cfDNA from plasma. However, 85.7 % pre-therapy plasma samples from patients with HPV+ OPSCC were positive for at least one of the examined HPV-oncogenes by qPCR; no signals were detected in HPV- OPSCC patients. In patients with no clinical sign of relapse, cfHPV-DNA concentration decreased significantly after therapy. Conversely, cfHPV-DNA levels increased or remained above threshold in five patients who had residual disease or developed relapse.

In summary, we assume that specific mutations are responsible for the course of disease in HPV+ OPSCC patients with LR/DM. Furthermore, we show that cfHPV-DNA detection in plasma correlates with the clinical course of the disease. Consequently, a full clinical evaluation should be considered if cfHPV-DNA is detected during follow-up examination of patients with HPV+ OPSCC. Despite, a decreased sensitivity of our mutation-specific tNGS method compared to qPCR in cfDNA, future techniques will overvome this problem.

Zusammenfassung

Obwohl Patienten mit HPV-getriebenem (HPV^+) Oropharynx Plattenepithelkarzinom (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativem (HPV^-) OPSCC ein verbessertes Gesamtüberleben und Therapieansprechen zeigen, entwickeln 13 % bis 25 % der HPV^+ OPSCC Patienten ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen (LR/FM) und zeigen einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie HPV^- OPSCC Patienten. Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung spezifischer genetischer Tumormarker zur Überwachung der minimalen Resterkrankung sowie zur Identifizierung HPV^+ OPSCC Patienten mit erhöhtem Risiko für ein Rezidiv.

Wir analysierten das Mutationsprofil von jeweils 14 HPV^+/HPV^- OPSCC Patienten mit/ohne LR/FM mittels eines 90 Zielregionen in 22 Genen umfassenden Genpanels, welche häufig in HPV^+ OPSCC mutiert sind. Anschließend untersuchten wir zellfreie (*cell-free*, cf) DNA aus dem Plasma auf zuvor identifizierte Varianten. Zusätzlich überwachten wir die Konzentration der HPV-Onkogene *E6* und *E7* in cfDNA mittels quantitativer PCR (qPCR) vor der Therapie und während der Nachsorge.

HPV^- OPSCC zeigten insgesamt und in *TP53* mehr Mutationen als HPV^+ OPSCC. Unabhängig des HPV-Status wurden keine Unterschiede der Mutationsraten zwischen OPSCC von Patienten mit und ohne LR/FM festgestellt. Bei HPV^- OPSCC war *FAT1* in Patienten ohne LR/FM häufiger mutiert als in Patienten mit LR/FM, während bei den HPV^+ OPSCC *HRAS*, *PIK3R1*, *STK11* und *TP63* in Patienten mit LR/FM häufiger mutiert waren als bei Patienten ohne LR/FM. Ausgenommen *TP53* zeigten HPV^+ OPSCC von Patienten mit LR/FM ein ähnliches Mutationsmuster wie HPV^- OPSCC. Bezüglich Chromosomenaberrationen wurden zwischen HPV^+ OPSCC Patienten mit und ohne LR/FM keine spezifischen Unterschiede beobachtet. Somatische Mutationen aus den OPSCC Proben wurden in cfDNA in sehr geringem Anteil und mit limitierter Validität nachgewiesen. Hingegen waren in der qPCR 85,7 % der prä-Therapie Proben von Patienten mit HPV^+ OPSCC positiv für mindestens ein HPV-Onkogen; bei HPV^- OPSCC-Patienten wurden keine Signale detektiert. In Patienten ohne klinisches Anzeichen eines Rezidivs reduzierte sich die cfHPV-DNA-Konzentration nach der Therapie, wogegen die cfHPV-DNA-Spiegel bei fünf Patienten mit Resterkrankung oder Rezidiv nach der Therapie oberhalb des Schwellenwerts lagen.

Zusammenfassend nehmen wir an, dass bei HPV^+ OPSCC Patienten mit LR/FM spezifische Mutationen zu einem erneuten Auftreten der Krankheit führen. Weiterhin zeigen wir, dass der cfHPV-DNA-Nachweis mit dem klinischen Krankheitsverlauf korreliert. Folglich sollte eine umfassende klinische Untersuchung durchgeführt werden, wenn cfHPV-DNA während der Nachuntersuchung detektiert wird. Die geringere Sensitivität des Nachweises somatischer Mutationen in cfDNA mittels Sequenzierung wird zukünftig dank verbesserter Methoden behoben sein.

5. Verzeichnisse

5.1. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µM	Mikromolar ((10^{-6} Molar)
A	Adenin (bzgl. DNA-Basen)
Abb.	Abbildung
ACI	Innere Halsschlagader (*Aorta carotis interna*)
AMP	*Association for Molecular Pathology*
Asn	Asparagin
ATM	*Ataxia-telangiectasia mutated kinase*
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
bp	Basenpaar
C	Cytosin (bzgl. DNA-Basen)
c.	Nomenklatur auf codierende DNA-Sequenz bezogen
(c)cfDNA	(Zirkulierende) zellfreie DNA (*circulating/cell-free DNA*)
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6 (*cyclin-dependent kinases 4 and 6*)
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)
CTC	Zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*)
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA (*circulating tumor DNA*)
ddH_2O	Doppelt destiliiertes Wasser
DDX3X	*DEAD-box helicase 3 X-linked*
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*Desoxy-ribonucleic acid*)
Dr.	Doktor
Dr. med.	Doktor der Medizin
E	Frühe Gene (*early*) (bei HPV-Genen)
E6AP	E6 assoziiertes Protein
EBV	Eppstein-Barr Virus
ECS	Extrakapsuläre Ausbreitung (*extracapsular spread*)
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
EP300	*E1A-associated protein p300*
et al.	Und die anderen (*et alii*)
FANCA	*Fanconi anaemia, complementation group A*
FANCG	*Fanconi anemia group G protein*
FAT1	*FAT Atypical Cadherin 1*

FBXW7	*F-box/WD repeat-containing protein 7*
FDA	US-amerikanische Arzneimittelbehörde (*U.S. food and drug administration*)
FFPE	Formalin-fixiert in Paraffin-eingebettet
FGFR2/3	*Fibroblast growth factor receptor 2 and 3*
G	Guanin (bzgl. DNA-Basen)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde (*hora*)
His	Histidin
HLA	Humane Leukozytenantigene
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*)
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV^-	HPV-negativ
HPV^+	HPV-getrieben
HRAS	*Harvey Rat sarcoma*
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*)
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten (*International classification of diseases*)
JAK	Janus Kinase
KKG	Kuratorium für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen
KRAS	*Kirsten rat sarcoma*
L	Späte Gene (*late*) (bei HPV-Genen)
Lat.	Seitlich (*lateral*)
LCR	Lange Kontrollregion (*long control region*)
Leu	Leucin
LR/FM	Lokalrezidiv/Fernmetastase
Lys	Lysin
M	Metastasenstatus (bzgl. TNM-Status)
M.	Muskel (*Musculus*)
Mb	Megabase (1 Million Basenpaare)
Med.	Mittig (*medial*)
min	Minute
MLL	*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*

MRD	minimale Resterkrankung (*minimal/measurable residual disease*)
N	Lymphknotenstatus (Nodus) (bzgl. TNM-Status)
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NOTCH1	*Notch homolog 1, translocation-associated*
NPC	Nasopharynxtumor (*nasopharyngeal carcinoma*)
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	Neuroblastoma
NS	Nachsorge
NSCLC	nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small-cell lung cancer*)
OP	Operation
OPSCC	Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*)
p	Kurzer Arm des Chromosoms (*petit*)
p	p-Wert zur statistischen Signifikanz
p.	Nomenklatur auf Proteinebene
p53	Tumorprotein 53
P97	Promoter im HPV-Genom
PAA	Polyacrylamid
PAE/PAL	Polyadenylierungssignal im HPV-Genom
PDGFRA	*platelet-derived growth factor receptor A*
PE	Panendoskopie
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie mit Computertomographie
PGM	*Personal Genome Machine*
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, katalytische Untereinheit alpha (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*)
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-Kinase, regulatorische Untereinheit alpha
pM	Pikomolar (10^{-12} Molar)
pRb	Retinoblastom Protein
PT	Primärtumor
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
q	langer Arm des Chromosoms
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreation
R1	Mikroskopische Detektion von Residualzellen am Schnittrand

RAD51B	RAD51 Paralog B
RB1	Retinoblastom Gen
Rez.	Rezidiv
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
ROC	Grenzwertoptimierung (*receiver operating characteristic*)
RT-PCR	Echtzeit Polymerasekettenreation (*real-time poymerase chain reaction*)
rückw.	Rückwärts
s.	Siehe
sek	Sekunde
Ser	Serin
SOX2	SRY-box 2
S-Phase	Synthesephase
STK11	Serine/Threonin Kinase 11
T	Tumorgröße (bzgl. TNM-Status)
T	Thymin (bzgl. DNA-Basen)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAF1	*TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1*
TCGA	*The Cancer Genome Atlas Network*
TE	TRIS-EDTA
Temp.	Temperatur
Tis	lokal begrenzt Tumor (Tumor *in situ*)
tNGS	gezielten Sequenzierung (*targeted Next Generation Sequencing*)
TP53	Gen des Tumorproteins 53
TP63	Tumorprotein 63
TRAF3	*TNF Receptor Associated Factor 3*
Tyr	Tyrosin
UICC	Internationalen Vereinigung gegen Krebs (*Union for international cancer control*)
UMI	*unique molecular identifiers*
V	Volt
VAF	Variantenallelfrequenz
Val	Valin
vorw.	Vorwärts
vs.	Versus
WES	Sequenzierung des gesamten Exoms (*whole exome sequencing*)

WGS	Genomsequenzierung (*whole genome sequencing*)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*)
z.B.	Zum Beispiel

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Familie der Papillomviridae und Schema der genomischen Struktur von HPV Typ 16. 2
Abb. 2: Schematische Darstellung einer HPV-getriebenen Tumorprogression. 3
Abb. 3: Schematische Darstellung der molekularen Karzinogenese HPV-getriebener Tumore im Vergleich zu einer gesunden Zelle. 5
Abb. 4: Untereinheiten des Kopf-Hals Bereichs (A) sowie des Oropharynx (B). 6
Abb. 5: Klinische Charakteristika von Oropharynx-Plattenepithelkarzinome in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf-Halschirurgie und plastische Operationen des Universitätsklinikums Gießen & Marburg, Standort Gießen. . 7
Abb. 6: Lymphknoten Level bei der Ausräumung der Halslymphknoten bei einer sanierenden Operation. 10
Abb. 7: Klinische Anwendung von CTC und cfDNA Analysen während der Tumortherapie. 15
Abb. 8: Schematische Darstellung von Plasma als Flüssigbiopsie. 16
Abb. 9: Anteil von vier detektierten Varianten (A-D) im Plasma im Verlauf von Patienten ohne LR/FM. 51
Abb. 10: Anteil detektierter Varianten im Plasma im Verlauf eines Patienten mit LR/FM. 52

5.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ICD-10 Codierung zur bösartigen Neubildung des Oropharynx. 8
Tabelle 2: Pathologische TNM-Kategorien für $p16^{INK4A}$-positive und $p16^{INK4A}$-negative OPSCC 9
Tabelle 3: UICC-Stadien der Tumorklassifizierung. 9
Tabelle 4: Abstufungen bei der Ausräumung der Halslymphknoten bei kurativer Behandlung. 10
Tabelle 5:Variantenallelfrequenz von Mutationen, die im Tumorgewebe und im Serum der ersten vorliegenden Probe analysiert wurden. 49
Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung des spezifischen Amplifikats mit dem „TopTaq Master Mix Kit“ von Qiagen. ..... A
Tabelle 7: PCR-Schema für die Amplifikation „TopTaq Master Mix Kit“ von Qiagen. .... A
Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung eines 10 % igen Polyacrylamid Gels. ..... A
Tabelle 9: Pipettierschema für die Vorbereitung der DNA für die Ligation. ..... B
Tabelle 10: Pipettierschema für die Ligation des Adapters an das Amplifikat. ..... B
Tabelle 11: PCR-Protokoll für die Ligation des Adapters an das Amplifikat. ..... B
Tabelle 12: Pipettierschema für die Amplifikation der Adapter-ligierten Probe. C
Tabelle 13: PCR-Protokoll zur Amplifikation der Adapter-ligierten Probe. C
Tabelle 14: Sequenzen der Primer für die genannte Variante in der Fragmentsequenzierung. ..... D

5.4. Literaturverzeichnis

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Trevino L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN (2011): **Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1**. Science 333(6046):1154-1157 (DOI: 10.1126/science.1206923)

Andreasen S, Kiss K, Mikkelsen LH, Channir HI, Plaschke CC, Melchior LC, Eriksen JG, Wessel I (2019): **An update on head and neck cancer: new entities and their histopathology, molecular background, treatment, and outcome**. APMIS 127(5):240-264 (DOI: 10.1111/apm.12901)

Aravanis AM, Lee M, Klausner RD (2017): **Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection**. Cell 168(4):571-574 (DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.030)

Aziz H, Ping CY, Alias H, Ab Mutalib NS, Jamal R (2017): **Gene Mutations as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets for Relapsed Acute Myeloid Leukemia**. Front Pharmacol 8:897 (DOI: 10.3389/fphar.2017.00897)

Babayan A, Pantel K (2018): **Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer**. Genome Med 10(1):21 (DOI: 10.1186/s13073-018-0533-6)

Balaji H, Demers I, Wuerdemann N, Schrijnder J, Kremer B, Klussmann JP, Huebbers CU, Speel EM (2021): **Causes and Consequences of HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: State of the Art**. Cancers (Basel) 13(16) (DOI: 10.3390/cancers13164089)

Balaji SA, Shanmugam A, Chougule A, Sridharan S, Prabhash K, Arya A, Chaubey A, Hariharan A, Kolekar P, Sen M, Ravichandran A, Katragadda S, Sankaran S, Bhargava S, Kulkarni P, Rao S, Sunkavalli C, Banavali S, Joshi A, Noronha V, Dutt A, Bahadur U, Hariharan R, Veeramachaneni V, Gupta V (2018): **Analysis of solid tumor mutation profiles in liquid biopsy**. Cancer Med 7(11):5439-5447 (DOI: 10.1002/cam4.1791)

Bardelli A, Pantel K (2017): **Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet)**. Cancer Cell 31(2):172-179 (DOI: 10.1016/j.ccell.2017.01.002)

Berman TA, Schiller JT (2017): **Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases**. Cancer 123(12):2219-2229 (DOI: 10.1002/cncr.30588)

Berrino F, Gatta G (1998): **Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumours. EUROCARE Working Group**. Eur J Cancer 34(14 Spec No):2154-2161 (DOI: 10.1016/s0959-8049(98)00328-1)

Beutner KR, Tyring S (1997): **Human papillomavirus and human disease**. Am J Med 102(5A):9-15 (DOI: 10.1016/s0002-9343(97)00178-2)

Bewicke-Copley F, Arjun Kumar E, Palladino G, Korfi K, Wang J (2019): **Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies**. Comput Struct Biotechnol J 17:1348-1359 (DOI: 10.1016/j.csbj.2019.10.004)

Bidard FC, Kiavue N, Ychou M, Cabel L, Stern MH, Madic J, Saliou A, Rampanou A, Decraene C, Bouche O, Rivoire M, Ghiringhelli F, Francois E, Guimbaud R, Mineur L, Khemissa-Akouz F, Mazard T, Moussata D, Proudhon C, Pierga JY, Stanbury T, Thezenas S, Mariani P (2019): **Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Detection in Potentially Resectable Metastatic Colorectal Cancer: A Prospective Ancillary Study to the Unicancer Prodige-14 Trial**. Cells 8(6) (DOI: 10.3390/cells8060516)

Bodelon C, Untereiner ME, Machiela MJ, Vinokurova S, Wentzensen N (2016): **Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers**. Int J Cancer 139(9):2001-2011 (DOI: 10.1002/ijc.30243)

Boscolo-Rizzo P, Pawlita M, Holzinger D (2016): **From HPV-positive towards HPV-driven oropharyngeal squamous cell carcinomas**. Cancer Treat Rev 42:24-29 (DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.10.009)

Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M (2016): **TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data**. Hum Mutat 37(9):865-876 (DOI: 10.1002/humu.23035)

Brant AC, Menezes AN, Felix SP, de Almeida LM, Sammeth M, Moreira MAM (2019): **Characterization of HPV integration, viral gene expression and E6E7 alternative transcripts by RNA-Seq: A descriptive study in invasive cervical cancer**. Genomics 111(6):1853-1861 (DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.12.008)

Brierley J. GMKWC (2017) **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley and Sons

Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S (2019): **The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management**. Biomol Detect Quantif 17:100087 (DOI: 10.1016/j.bdq.2019.100087)

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) (2020): **ICD-10-GM Version 2021, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision**. Stand: 18.09.2020, Köln (icd10gm2021syst_odt_20200918.pdf, Stand: 19.01.2022)

Bussu F, Sali M, Gallus R, Petrone G, Zannoni GF, Autorino R, Dinapoli N, Santangelo R, Vellone VG, Graziani C, Micciche F, Almadori G, Galli J, Delogu G, Sanguinetti M, Rindi G, Tommasino M, Valentini V, Paludetti G (2014): **Human papillomavirus (HPV) infection in squamous cell carcinomas arising from the oropharynx: detection of HPV DNA and p16 immunohistochemistry as diagnostic and prognostic indicators--a pilot study**. Int J Radiat Oncol Biol Phys 89(5):1115-1120 (DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.04.044)

Cancer Genome Atlas N (2015): **Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas**. Nature 517(7536):576-582 (DOI: 10.1038/nature14129)

Cancer Research UK (2015): **Diagram showing parts of the oropharynx**. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_showing_the_parts_of_the_oropharynx_CRUK_332.svg#filelinks vom 18.12.2015, Stand: 19.01.2022, Lizenznummer: CC BY-SA 4.0)

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP (2005): **Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database**. Int J Cancer 114(5):806-816 (DOI: 10.1002/ijc.20740)

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012): **The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data**. Cancer Discov 2(5):401-404 (DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095)

Chakrabarti S, Xie H, Urrutia R, Mahipal A (2020): **The Promise of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in the Management of Early-Stage Colon Cancer: A Critical Review**. Cancers (Basel) 12(10) (DOI: 10.3390/cancers12102808)

Chen FP, Huang XD, Lv JW, Wen DW, Zhou GQ, Lin L, Kou J, Wu CF, Chen Y, Zheng ZQ, Li ZX, He XJ, Sun Y (2020): **Prognostic potential of liquid biopsy tracking in the posttreatment surveillance of patients with nonmetastatic nasopharyngeal carcinoma**. Cancer 126(10):2163-2173 (DOI: 10.1002/cncr.32770)

Chen M, Zhao H (2019): **Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection**. Hum Genomics 13(1):34 (DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8)

Chera BS, Kumar S, Shen C, Amdur R, Dagan R, Green R, Goldman E, Weiss J, Grilley-Olson J, Patel S, Zanation A, Hackman T, Blumberg J, Patel S, Thorp B, Weissler M, Yarbrough W, Sheets N, Mendenhall W, Tan XM, Gupta GP (2020): **Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer**. J Clin Oncol 38(10):1050-1058 (DOI: 10.1200/JCO.19.02444)

Chow LQM (2020): **Head and Neck Cancer**. N Engl J Med 382(1):60-72 (DOI: 10.1056/NEJMra1715715)

Corcoran RB, Chabner BA (2018): **Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment**. N Engl J Med 379(18):1754-1765 (DOI: 10.1056/NEJMra1706174)

Dahlstrom KR, Li G, Hussey CS, Vo JT, Wei Q, Zhao C, Sturgis EM (2015): **Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer**. Cancer 121(19):3455-3464 (DOI: 10.1002/cncr.29538)

De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, Vivancos A, Tabernero J, Reis-Filho JS, Seoane J (2013): **Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer**. Nat Rev Clin Oncol 10(7):377-389 (DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.80)

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004): **Classification of papillomaviruses**. Virology 324(1):17-27 (DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033)

Diehn M, Alizadeh AA, Adams H-P, Lee JJ, Klassen S, Palma JF, Hinzman B, Lovejoy AF, Newman AM, Yao L (2017): **Early prediction of clinical outcomes in resected stage II and III colorectal cancer (CRC) through deep sequencing of circulating tumor DNA (ctDNA)**. American Society of Clinical Oncology (DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3591)

Dogan S, Xu B, Middha S, Vanderbilt CM, Bowman AS, Migliacci J, Morris LGT, Seshan VE, Ganly I (2019): **Identification of prognostic molecular biomarkers in 157 HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the oropharynx**. Int J Cancer 145(11):3152-3162 (DOI: 10.1002/ijc.32412)

Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, Walker J, Dearden S, Webster A, Milenkova T, McCormack R (2014): **Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status**. J Thorac Oncol 9(9):1345-1353 (DOI: 10.1097/JTO.0000000000000263)

Dudley JC, Diehn M (2021): **Detection and Diagnostic Utilization of Cellular and Cell-Free Tumor DNA**. Annu Rev Pathol 16:199-222 (DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032604)

Eboreime J, Choi SK, Yoon SR, Arnheim N, Calabrese P (2016): **Estimating Exceptionally Rare Germline and Somatic Mutation Frequencies via Next Generation Sequencing**. PLoS One 11(6):e0158340 (DOI: 10.1371/journal.pone.0158340)

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008): **Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial**. J Natl Cancer Inst 100(4):261-269 (DOI: 10.1093/jnci/djn011)

Faraji F, Eisele DW, Fakhry C (2017a): **Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma**. Laryngoscope Investig Otolaryngol 2(1):10-18 (DOI: 10.1002/lio2.37)

Faraji F, Zaidi M, Fakhry C, Gaykalova DA (2017b): **Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer**. Microbes Infect 19(9-10):464-475 (DOI: 10.1016/j.micinf.2017.06.001)

Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y (2005): **Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity**. Mol Cell Biol 25(13):5389-5395 (DOI: 10.1128/MCB.25.13.5389-5395.2005)

Forghieri F, Comoli P, Marasca R, Potenza L, Luppi M (2018): **Minimal/Measurable Residual Disease Monitoring in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Clinical Viewpoint and Perspectives**. Int J Mol Sci 19(11) (DOI: 10.3390/ijms19113492)

Freeman SD, Hourigan CS (2019): **MRD evaluation of AML in clinical practice: are we there yet?** Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2019(1):557-569 (DOI: 10.1182/hematology.2019000060)

Friedler A, Veprintsev DB, Freund SM, von Glos KI, Fersht AR (2005): **Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation**. Structure 13(4):629-636 (DOI: 10.1016/j.str.2005.01.020)

Gao G, Wang J, Kasperbauer JL, Tombers NM, Teng F, Gou H, Zhao Y, Bao Z, Smith DI (2019): **Whole genome sequencing reveals complexity in both HPV sequences present and HPV integrations in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas**. BMC Cancer 19(1):352 (DOI: 10.1186/s12885-019-5536-1)

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N (2013): **Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal**. Sci Signal 6(269):pl1 (DOI: 10.1126/scisignal.2004088)

Gaykalova DA, Mambo E, Choudhary A, Houghton J, Buddavarapu K, Sanford T, Darden W, Adai A, Hadd A, Latham G, Danilova LV, Bishop J, Li RJ, Westra WH, Hennessey P, Koch WM, Ochs MF, Califano JA, Sun W (2014): **Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma**. PLoS One 9(3):e93102 (DOI: 10.1371/journal.pone.0093102)

Gillison ML (2004): **Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity**. Semin Oncol 31(6):744-754 (DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.09.011)

Gillison ML, Castellsague X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, Arbyn M, Franceschi S (2014): **Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix**. Int J Cancer 134(3):497-507 (DOI: 10.1002/ijc.28201)

Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, Rosales Rodriguez I, Schliep KP, Schwendenwein D, Ungerer V, Sensen CW (2020): **Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms**. Int J Mol Sci 21(21) (DOI: 10.3390/ijms21218062)

Graham SV (2017): **The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review**. Clin Sci (Lond) 131(17):2201-2221 (DOI: 10.1042/cs20160786)

Gravitt PE, Winer RL (2017): **Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency**. Viruses 9(10) (DOI: 10.3390/v9100267)

Groves IJ, Coleman N (2018): **Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us?** J Pathol 245(1):9-18 (DOI: 10.1002/path.5058)

Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, Schultze-Mosgau S, Altendorf-Hofmann A (2010): **Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database**. J Cancer Res Clin Oncol 136(1):55-63 (DOI: 10.1007/s00432-009-0636-y)

Haber DA, Velculescu VE (2014): **Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA**. Cancer Discov 4(6):650-661 (DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-1014)

Hanna GJ, Supplee JG, Kuang Y, Mahmood U, Lau CJ, Haddad RI, Janne PA, Paweletz CP (2018): **Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer**. Ann Oncol 29(9):1980-1986 (DOI: 10.1093/annonc/mdy251)

Harbison RA, Kubik M, Konnick EQ, Zhang Q, Lee SG, Park H, Zhang J, Carlson CS, Chen C, Schwartz SM, Rodriguez CP, Duvvuri U, Mendez E (2018): **The mutational landscape of recurrent versus nonrecurrent human papillomavirus-related oropharyngeal cancer**. JCI Insight 3(14) (DOI: 10.1172/jci.insight.99327)

Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY (2015): **Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors**. J Clin Oncol 33(29):3227-3234 (DOI: 10.1200/JCO.2015.62.1086)

Hayes TF, Benaich N, Goldie SJ, Sipila K, Ames-Draycott A, Cai W, Yin G, Watt FM (2016): **Integrative genomic and functional analysis of human oral squamous cell carcinoma cell lines reveals synergistic effects of FAT1 and CASP8 inactivation**. Cancer Lett 383(1):106-114 (DOI: 10.1016/j.canlet.2016.09.014)

Hecht M, Semrau S (2020): **[Aggressive dose de-escalation in adjuvant therapy for HPV-associated oropharyngeal cancer. Is half of everything enough?]**. Strahlenther Onkol 196(5):492-494 (DOI: 10.1007/s00066-020-01602-2)

Henriksen TV, Reinert T, Christensen E, Sethi H, Birkenkamp-Demtroder K, Gogenur M, Gogenur I, Zimmermann BG, Group IS, Dyrskjot L, Andersen CL (2020): **The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA**. Mol Oncol 14(8):1670-1679 (DOI: 10.1002/1878-0261.12729)

Holmes A, Lameiras S, Jeannot E, Marie Y, Castera L, Sastre-Garau X, Nicolas A (2016): **Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas**. NPJ Genom Med 1:16004 (DOI: 10.1038/npjgenmed.2016.4)

Hu X, Zhai Y, Kong P, Cui H, Yan T, Yang J, Qian Y, Ma Y, Wang F, Li H, Cheng C, Zhang L, Jia Z, Li Y, Yang B, Xu E, Wang J, Yang J, Bi Y, Chang L, Wang Y, Zhang Y, Song B, Li G, Shi R, Liu J, Zhang M, Cheng X, Cui Y (2017): **FAT1 prevents epithelial mesenchymal transition (EMT) via MAPK/ERK signaling pathway in esophageal squamous cell cancer**. Cancer Lett 397:83-93 (DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.033)

Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS (2015): **Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility**. Clin Cancer Res 21(21):4786-4800 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1190)

Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, Marquette CH, Hofman P (2014): **Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?** Ann Transl Med 2(11):107 (DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.11)

Jenkins S, Yang JC, Ramalingam SS, Yu K, Patel S, Weston S, Hodge R, Cantarini M, Janne PA, Mitsudomi T, Goss GD (2017): **Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer**. J Thorac Oncol 12(7):1061-1070 (DOI: 10.1016/j.jtho.2017.04.003)

Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN (2017): **Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists**. J Mol Diagn 19(3):341-365 (DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011)

Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, Wong GL, Chan SL, Mok TS, Chan HL, Lai PB, Chiu RW, Lo YM (2015): **Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients**. Proc Natl Acad Sci U S A 112(11):E1317-1325 (DOI: 10.1073/pnas.1500076112)

Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR (2020): **Head and neck squamous cell carcinoma**. Nat Rev Dis Primers 6(1):92 (DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3)

Jung K, Fleischhacker M, Rabien A (2010): **Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature**. Clin Chim Acta 411(21-22):1611-1624 (DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.032)

Khier S, Lohan L (2018): **Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature**. Future Sci OA 4(4):FSO295 (DOI: 10.4155/fsoa-2017-0140)

Kim KT, Kim BS, Kim JH (2016): **Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma**. Head Neck 38 Suppl 1:E2021-2029 (DOI: 10.1002/hed.24372)

Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B (2011): **Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing**. Proc Natl Acad Sci U S A 108(23):9530-9535 (DOI: 10.1073/pnas.1105422108)

Klussmann JP (2017): **Head and Neck Cancer - New Insights into a Heterogeneous Disease**. Oncol Res Treat 40(6):318-319 (DOI: 10.1159/000477255)

Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SM, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF, Straetmans JM, Manni JJ, Hopman AH, Speel EJ (2009): **Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implication**. Clin Cancer Res (5):1779-1786 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1463)

Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T (2018): **A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer**. J Clin Med 7(9) (DOI: 10.3390/jcm7090241)

Kukita Y, Matoba R, Uchida J, Hamakawa T, Doki Y, Imamura F, Kato K (2015): **High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients**. DNA Res 22(4):269-277 (DOI: 10.1093/dnares/dsv010)

Lechner M, Frampton GM, Fenton T, Feber A, Palmer G, Jay A, Pillay N, Forster M, Cronin MT, Lipson D, Miller VA, Brennan TA, Henderson S, Vaz F, O'Flynn P, Kalavrezos N, Yelensky R, Beck S, Stephens PJ, Boshoff C (2013): **Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors**. Genome Med 5(5):49 (DOI: 10.1186/gm453)

Ledgerwood LG, Kumar D, Eterovic AK, Wick J, Chen K, Zhao H, Tazi L, Manna P, Kerley S, Joshi R, Wang L, Chiosea SI, Garnett JD, Tsue TT, Chien J, Mills GB, Grandis JR, Thomas SM (2016): **The degree of intratumor mutational heterogeneity varies by primary tumor sub-site**. Oncotarget 7(19):27185-27198 (DOI: 10.18632/oncotarget.8448)

Lee JY, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, De Castro DG, Grove L, Hurley T, Wang F, Nutting C, Newbold K, Harrington K, Turner N, Bhide S (2017): **Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma**. Br J Cancer 117(6):876-883 (DOI: 10.1038/bjc.2017.258)

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011): **The molecular biology of head and neck cancer**. Nat Rev Cancer 11(1):9-22 (DOI: 10.1038/nrc2982)

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH (2018): **The molecular landscape of head and neck cancer**. Nat Rev Cancer 18(5):269-282 (DOI: 10.1038/nrc.2018.11)

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe, AWMF): **S3-Leitline Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0**, 2021, AWMF Registernummer 007/100OL https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinen/mundhoehlenkarzinom/ (abgerufen am: 19.01.2022)

Li W, Chen J, Liang B, Li Z, Li J, Yuan X, Wu S, Zeng F, Peng X, Li Y, Lu J, Zhao F, Liu X (2021): **Long-term monitoring of dynamic changes in plasma EBV DNA for improved prognosis prediction of nasopharyngeal carcinoma**. Cancer Med 10(3):883-894 (DOI: 10.1002/cam4.3669)

Lim MY, Dahlstrom KR, Sturgis EM, Li G (2016): **Human papillomavirus integration pattern and demographic, clinical, and survival characteristics of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma**. Head Neck 38(8):1139-1144 (DOI: 10.1002/hed.24429)

Lin BM, Wang H, D'Souza G, Zhang Z, Fakhry C, Joseph AW, Drake VE, Sanguineti G, Westra WH, Pai SI (2013): **Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma**. Cancer 119(19):3462-3471 (DOI: 10.1002/cncr.28250)

Litwin TR, Clarke MA, Dean M, Wentzensen N (2017): **Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis**. Viruses 9(8) (DOI: 10.3390/v9080206)

Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW (2010): **Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus**. Sci Transl Med 2(61):61ra91 (DOI: 10.1126/scitranslmed.3001720)

Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP (1999): **Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma**. Cancer Res 59(6):1188-1191 (PMID: 10096545)

Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, Freilino M, Sauerwein S, Peyser ND, Xiao D, Diergaarde B, Wang L, Chiosea S, Seethala R, Johnson JT, Kim S, Duvvuri U, Ferris RL, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway LA, Hammerman PS, Mills GB, Grandis JR (2013): **Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers**. Cancer Discov 3(7):761-769 (DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0103)

Lung J, Hung MS, Lin YC, Jiang YY, Fang YH, Lu MS, Hsieh CC, Wang CS, Kuan FC, Lu CH, Chen PT, Lin CM, Chou YL, Lin CK, Yang TM, Chen FF, Lin PY, Hsieh MJ, Tsai YH (2020): **A highly sensitive and specific real-time quantitative PCR for BRAF V600E/K mutation screening**. Sci Rep 10(1):16943 (DOI: 10.1038/s41598-020-72809-7)

Lv J, Chen Y, Zhou G, Qi Z, Tan KRL, Wang H, Lin L, Chen F, Zhang L, Huang X, Liu R, Xu S, Chen Y, Ma J, Chua MLK, Sun Y (2019): **Liquid biopsy tracking during sequential chemo-radiotherapy identifies distinct prognostic phenotypes in nasopharyngeal carcinoma**. Nat Commun 10(1):3941 (DOI: 10.1038/s41467-019-11853-y)

Mallen-St Clair J, Alani M, Wang MB, Srivatsan ES (2016): **Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease**. Biochim Biophys Acta 1866(2):141-150 (DOI: 10.1016/j.bbcan.2016.07.005)

Mandel P, Metais P (1948): **[Nuclear Acids In Human Blood Plasma]**. C R Seances Soc Biol Fil 142(3-4):241-243 (PMID: 18875018)

Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, Zhu L, Folz BJ, Bette M, Weihe E, Neubauer A, Werner JA (2006): **Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbitux) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor**. FEBS Lett 580(20):4793-4800 (DOI: 10.1016/j.febslet.2006.07.064)

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010): **HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic**. Lancet Oncol 11(8):781-789 (DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6)

Matallanas D, Arozarena I, Berciano MT, Aaronson DS, Pellicer A, Lafarga M, Crespo P (2003): **Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization**. J Biol Chem 278(7):4572-4581 (DOI: 10.1074/jbc.M209807200)

Meiring TL, Mbulawa ZZA, Lesosky M, Coetzee D, Williamson AL (2017): **High diversity of alpha, beta and gamma human papillomaviruses in genital samples from HIV-negative and HIV-positive heterosexual South African men**. Papillomavirus Res 3:160-167 (DOI: 10.1016/j.pvr.2017.05.001)

Mirghani H, Lang Kuhs KA, Waterboer T (2018): **Biomarkers for early identification of recurrences in HPV-driven oropharyngeal cancer**. Oral Oncol 82:108-114 (DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.05.015)

Morgan IM, DiNardo LJ, Windle B (2017): **Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift?** Viruses 9(8) (DOI: 10.3390/v9080208)

Morris LGT, Chandramohan R, West L, Zehir A, Chakravarty D, Pfister DG, Wong RJ, Lee NY, Sherman EJ, Baxi SS, Ganly I, Singh B, Shah JP, Shaha AR, Boyle JO, Patel SG, Roman BR, Barker CA, McBride SM, Chan TA, Dogan S, Hyman DM, Berger MF, Solit DB, Riaz N, Ho AL (2017): **The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform**. JAMA Oncol 3(2):244-255 (DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.1790)

Mroz EA, Rocco JW (2017): **The challenges of tumor genetic diversity**. Cancer 123(6):917-927 (DOI: 10.1002/cncr.30430)

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G (2003): **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer**. N Engl J Med 348(6):518-527 (DOI: 10.1056/NEJMoa021641)

Murray S, Ha MN, Thompson K, Hart RD, Rajaraman M, Snow SL (2015): **A different entity: a population based study of characteristics and recurrence patterns in oropharyngeal squamous cell carcinomas**. J Otolaryngol Head Neck Surg 44:30 (DOI: 10.1186/s40463-015-0082-6)

Nulton TJ, Kim NK, DiNardo LJ, Morgan IM, Windle B (2018): **Patients with integrated HPV16 in head and neck cancer show poor survival**. Oral Oncol 80:52-55 (DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.03.015)

Nulton TJ, Olex AL, Dozmorov M, Morgan IM, Windle B (2017): **Analysis of The Cancer Genome Atlas sequencing data reveals novel properties of the human papillomavirus 16 genome in head and neck squamous cell carcinoma**. Oncotarget 8(11):17684-17699 (DOI: 10.18632/oncotarget.15179)

Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, Yang JC, Barrett JC, Janne PA (2016): **Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer**. J Clin Oncol 34(28):3375-3382 (DOI: 10.1200/JCO.2016.66.7162)

Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsantikidi K, Metaxa-Mariatou V, Stamou PE, Kladi-Skandali A, Kapeni E, Tsaousis G, Pentheroudakis G, Petrakis D, Lampropoulou DI, Aravantinos G, Varthalitis I, Kesisis G, Boukovinas I, Papakotoulas P, Katirtzoglou N, Athanasiadis E, Stavridi F, Christodoulou C, Koumarianou A, Eralp Y, Nasioulas G (2019): **Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients**. PLoS One 14(12):e0226853 (DOI: 10.1371/journal.pone.0226853)

Parfenov M, Pedamallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, Lee S, Hadjipanayis AG, Ivanova EV, Wilkerson MD, Protopopov A, Yang L, Seth S, Song X, Tang J, Ren X, Zhang J, Pantazi A, Santoso N, Xu AW, Mahadeshwar H, Wheeler DA, Haddad RI, Jung J, Ojesina AI, Issaeva N, Yarbrough WG, Hayes DN, Grandis JR, El-Naggar AK, Meyerson M, Park PJ, Chin L, Seidman JG, Hammerman PS, Kucherlapati R, Cancer Genome Atlas N (2014): **Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers**. Proc Natl Acad Sci U S A 111(43):15544-15549 (DOI: 10.1073/pnas.1416074111)

Pinatti LM, Sinha HN, Brummel CV, Goudsmit CM, Geddes TJ, Wilson GD, Akervall JA, Brenner CJ, Walline HM, Carey TE (2021): **Association of human papillomavirus integration with better patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma**. Head Neck 43(2):544-557 (DOI: 10.1002/hed.26501)

Pinatti LM, Walline HM, Carey TE (2018): **Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer**. J Dent Res 97(6):691-700 (DOI: 10.1177/0022034517744213)

Pinzani P, D'Argenio V, Del Re M, Pellegrini C, Cucchiara F, Salvianti F, Galbiati S (2021): **Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors**. Clin Chem Lab Med 59(7):1181-1200 (DOI: 10.1515/cclm-2020-1685)

Pirolli D, Carelli Alinovi C, Capoluongo E, Satta MA, Concolino P, Giardina B, De Rosa MC (2010): **Insight into a novel p53 single point mutation (G389E) by Molecular Dynamics Simulations**. Int J Mol Sci 12(1):128-140 (DOI: 10.3390/ijms12010128)

Powell SF, Vu L, Spanos WC, Pyeon D (2021): **The Key Differences between Human Papillomavirus-Positive and -Negative Head and Neck Cancers: Biological and Clinical Implications**. Cancers (Basel) 13(20) (DOI: 10.3390/cancers13205206)

Prigge ES, Urban K, Stiegler S, Muller M, Kloor M, Mai S, Ottstadt M, Lohr F, Wenz F, Wagner S, Wittekindt C, Klussmann JP, Hampl M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M (2014): **No evidence of oncogenic KRAS mutations in squamous cell carcinomas of the anogenital tract and head and neck region independent of human papillomavirus and p16(INK4a) status**. Hum Pathol 45(11):2347-2354 (DOI: 10.1016/j.humpath.2014.08.001)

Reder H, Taferner VF, Wittekindt C, Brauninger A, Speel EM, Gattenlohner S, Wolf G, Klussmann JP, Wuerdemann N, Wagner S (2020): **Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma**. J Mol Diagn 22(11):1333-1343 (DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002)

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

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

Rietbergen MM, Snijders PJ, Beekzada D, Braakhuis BJ, Brink A, Heideman DA, Hesselink AT, Witte BI, Bloemena E, Baatenburg-De Jong RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2014): **Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas**. Int J Cancer 134(10):2366-2372 (DOI: 10.1002/ijc.28580)

Romanczuk H, Howley PM (1992): **Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity**. Proc Natl Acad Sci U S A 89(7):3159-3163 (DOI: 10.1073/pnas.89.7.3159)

Rusan M, Li YY, Hammerman PS (2015): **Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers**. Clin Cancer Res 21(9):2009-2019 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1101)

Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA (2018): **Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations**. Nat Rev Genet 19(5):269-285 (DOI: 10.1038/nrg.2017.117)

Schnittger S, Bacher U, Haferlach T, Wendland N, Ulke M, Dicker F, Grossmann V, Haferlach C, Kern W (2012): **Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia**. Blood 119(13):3151-3154 (DOI: 10.1182/blood-2011-10-383323)

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011): **Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients**. Nat Rev Cancer 11(6):426-437 (DOI: 10.1038/nrc3066)

Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, Brown C, Pugh TJ, Stojanov P, Cho J, Lawrence MS, Getz G, Bragelmann J, DeBoer R, Weichselbaum RR, Langerman A, Portugal L, Blair E, Stenson K, Lingen MW, Cohen EE, Vokes EE, White KP, Hammerman PS (2015): **Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas**. Clin Cancer Res 21(3):632-641 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3310)

Speel EJ (2017): **HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Cause and Consequence**. Recent Results Cancer Res 206:57-72 (DOI: 10.1007/978-3-319-43580-0_4)

Stanley MA, Pett MR, Coleman N (2007): **HPV: from infection to cancer**. Biochem Soc Trans 35(Pt 6):1456-1460 (DOI: 10.1042/BST0351456)

Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortes ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR (2011): **The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma**. Science 333(6046):1157-1160 (DOI: 10.1126/science.1208130)

Strohl MP, Wai KC, Ha PK (2020): **De-intensification strategies in HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma-a narrative review**. Ann Transl Med 8(23):1601 (DOI: 10.21037/atm-20-2984)

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987): **Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients**. Eur J Cancer Clin Oncol 23(6):707-712 (DOI: 10.1016/0277-5379(87)90266-5)

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

Tang JC, Feng YL, Guo T, Xie AY, Cai XJ (2016): **Circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma: trends and challenges**. Cell Biosci 6:32 (DOI: 10.1186/s13578-016-0100-z)

Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, Heymann MF, Heymann D (2016): **Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis**. Int J Mol Sci 17(12) (DOI: 10.3390/ijms17122142)

Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, Hammett T, Cantarini M, Barrett JC (2015): **EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291**. Lung Cancer 90(3):509-515 (DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.10.004)

Tian J, Geng Y, Lv D, Li P, Cordova M, Liao Y, Tian X, Zhang X, Zhang Q, Zou K, Zhang Y, Zhang X, Li Y, Zhang J, Ma Z, Shao Y, Song L, Owen GI, Li T, Liu R, Liu Q, Zou L, Zhang Z, Li Z (2019): **Using plasma cell-free DNA to monitor the chemoradiotherapy course of cervical cancer**. Int J Cancer 145(9):2547-2557 (DOI: 10.1002/ijc.32295)

Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, Turek L, Grega M, Smahelova J, Vencalek O, Lukesova E, Klozar J, Tachezy R (2016): **Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis**. Int J Cancer 138(2):386-395 (DOI: 10.1002/ijc.29712)

Wagner S, Prigge ES, Wuerdemann N, Reder H, Bushnak A, Sharma SJ, Obermueller T, von Knebel Doeberitz M, Dreyer T, Gattenlohner S, Wolf G, Pons-Kuhnemann J, Wittekindt C, Klussmann JP (2020): **Evaluation of p16(INK4a) expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation**. Br J Cancer 123(7):1114-1122 (DOI: 10.1038/s41416-020-0964-x)

Walline HM, Komarck CM, McHugh JB, Bellile EL, Brenner JC, Prince ME, McKean EL, Chepeha DB, Wolf GT, Worden FP, Bradford CR, Carey TE (2016): **Genomic Integration of High-Risk HPV Alters Gene Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma**. Mol Cancer Res 14(10):941-952 (DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0105)

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N (2017): **Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA**. Nat Rev Cancer 17(4):223-238 (DOI: 10.1038/nrc.2017.7)

Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, Bishop JA, Chung CH, Califano JA, Eisele DW, Fakhry C, Gourin CG, Ha PK, Kang H, Kiess A, Koch WM, Myers JN, Quon H, Richmon JD, Sidransky D, Tufano RP, Westra WH, Bettegowda C, Diaz LA, Jr., Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Agrawal N (2015): **Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas**. Sci Transl Med 7(293):293ra104 (DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa8507)

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

Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, Wurdemann N, Knuth J, Reder H, Klussmann JP (2018): **[HPV - A different view on Head and Neck Cancer]**. Laryngorhinootologie 97(S 01):S48-S113 (DOI: 10.1055/s-0043-121596)

Yang J, Chen Y, Luo H, Cai H (2020a): **The Landscape of Somatic Copy Number Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**. Front Oncol 10:321 (DOI: 10.3389/fonc.2020.00321)

Yang J, Gong Y, Lam VK, Shi Y, Guan Y, Zhang Y, Ji L, Chen Y, Zhao Y, Qian F, Chen J, Li P, Zhang F, Wang J, Zhang X, Yang L, Kopetz S, Futreal PA, Zhang J, Yi X, Xia X, Yu P (2020b): **Deep sequencing of circulating tumor DNA detects molecular residual disease and predicts recurrence in gastric cancer**. Cell Death Dis 11(5):346 (DOI: 10.1038/s41419-020-2531-z)

Zheng ZM, Baker CC (2006): **Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation**. Front Biosci 11:2286-2302 (DOI: 10.2741/1971)

Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA (2002): **Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?** Cancer Treat Rev 28(5):255-271 (DOI: 10.1016/s0305-7372(02)00077-4)

zur Hausen H (2008): **Papillomaviruses--to vaccination and beyond**. Biochemistry (Mosc) 73(5):498-503 (DOI: 10.1134/s0006297908050027)

zur Hausen H, de Villiers EM (1994): **Human papillomaviruses**. Annu Rev Microbiol 48:427-447 (DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002235)

6. Anhang

6.1. Methoden

6.1.1. Herstellung der Library zur Fragmentsequenzierung

Für die Fragmentsequenzierung wurde die DNA mit dem „Ion Plus Fragment Library Kit“ von Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll vorbereitet.
Zuerst wurde mit dem „TopTaq Master Mix Kit“ (Qiagen) eine PCR mit Primern, die die gewählte Mutation flankieren, durchgeführt. Die Reagenzien wurden in einem Endvolumen von 30 µl wie folgt gemischt:

Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung des spezifischen Amplifikats mit dem „TopTaq Master Mix Kit“ von Qiagen.

Reagenz	Konzentration / Volumen
Probe	3 µl
Primer forward	0,025 µM
Primer reverse	0,025 µM
2X TopTaq Master Mix	1X
ddH_2O	add 30 µl

Eine Negativkontrolle mit 3 µl ddH_2O wurde bei jeder PCR ebenfalls mitgeführt. Der Ablauf der PCR mit Temperatur, Zeit und Zyklenzahl ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 7: PCR-Schema für die Amplifikation „TopTaq Master Mix Kit“ von Qiagen.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94° C	3 min	1
Denaturierung	94° C	30 sek	35
Primer Anlagerung	52° C	40 sek	
Verlängerung	72° C	1 min	
Finale Verlängerung	72° C	10 min	1
Abkühlen	10° C	∞	-

Die Produktgröße wurde mit einem 10 %-igem Polyacrylamid (PAA)-Gel überprüft.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung eines 10 % igen Polyacrylamid Gels.

Reagenz	Konzentration / Volumen für ein Gel
50X TAE-Puffer	1X
40 % PAA	10 %
6 % APS	0,05 %
TEMED	16 µl
ddH_2O	add 10 µl

10 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6X Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der „Low Molecular Weight DNA Ladder“ (NEB) verwendet. Bei einer Spannung von 150 V wanderte die DNA circa 40 min durch das Gel. Anschließend wurde die DNA 20 min mit dem Interkalator „Midori Green“ (5 µl in 50 ml 1X TAE-Puffer) inkubiert, 5 min in ddH_2O gewaschen und anschließend bei einer Längenwelle von 480-530 nm entwickelt.
20 µl des PCR-Produkts werden anschließend mit 36 µl magnetischen Agencourt AMPure XP Kügelchen (Beckman Coulter™) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur

(RT) inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation von 3 min auf einem Magnetständer wird der Überstand verworfen. Anschließend wird das gebundene Amplifikat dreimal mit 150 µl 70 % Ethanol gewaschen und der Ethanol vollständig verworfen. Die Kügelchen mit der DNA werden nun 5 min getrocknet und in 15 µl Nuklease-freiem Wasser suspendiert. Die DNA löst sich von den Kügelchen und durch eine Inkubation von 1 min am Magnetständer trennen sich die Kügelchen von der Lösung. Die Konzentration des Überstands wurde dann mit einem Qubit™ Fluorometer (Themor Fisher Scientific) bestimmt. Als Vorbereitung für die Ligation werden 10-100 ng des Amplikons folgendermaßen behandelt:

Tabelle 9: Pipettierschema für die Vorbereitung der DNA für die Ligation.

Reagenz	Konzentration / Volumen
Amplikon Pool	10-100 ng
5X End Repair Buffer	20 µl
End Repair Enzyme	1 µl
ddH_2O	add 100 µl

Die Suspension wird für 20 bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Agencourt AMPure XP Kügelchen (Beckman Coulter™) aufgereingt. Dafür werden dieses mal 180 µl der Agencourt AMPure XP Kügelchen (Beckman Coulter™) mit den 100 µl des behandelten Amplikons gemischt und wie bereits weiter oben beschrieben inkubiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach den Waschschritten werden die Kügelchen zur Ablösung der DNA in 25 µl Low TE Puffer suspendiert und der Überstand nach Inkubation am Magnetständer in ein neues Gefäß überführt. Für die Adapter-Ligation werden folgende Reagenzien gemischt:

Tabelle 10: Pipettierschema für die Ligation des Adapters an das Amplifikat.

Reagenz	Volumen
DNA	25 µL
10X Ligase Puffer	10 µL (1X)
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress Barcode X	2 µL
dNTP Mix	2 µL
Nuklease-freies Wasser	49 µL
DNA-Ligase	2 µL
Nick Repair Polymerase	8 µL

Die Adapter werden bei folgendem Programm ligiert:

Tabelle 11: PCR-Protokoll für die Ligation des Adapters an das Amplifikat.

Temperatur	Zeit	Zyklen
25° C	15 min	1
72° C	5 min	1
4° C	bis 1 h	1

Anschließend werden die 100 µl Amplikon entsprechend der vorherigen Schritte (180 µL Agencourt AMPure XP Kügelchen (Beckman Coulter™)) aufgereinigt und gewaschen. Die DNA wird erneut in 25 µl Low TE Puffer gelöst.

Für die Amplifikation der Proben werden folgende Reagenzien gemischt:

Tabelle 12: Pipettierschema für die Amplifikation der Adapter-ligierten Probe.

Reagenz	Volumen
Library	25 µL
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	100 µL
Library Amplification Primer Mix	5 µL

Das Programm für die Amplifikation lautet folgendermaßen:

Tabelle 13: PCR-Protokoll zur Amplifikation der Adapter-ligierten Probe.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95° C	5 min	1
95° C	15 sek	6
58° C	15 sek	
70° C	1 min	
4° C	bis 1 h	1

Es werden erneut die 130 µl Amplikon entsprechend der vorherigen Schritte (diesmal mit 195 µL Agencourt AMPure XP Kügelchen (Beckman Coulter™)) aufgereinigt und gewaschen. Die DNA wird in 20 µl Low TE Puffer gelöst. Abschließend wird die DNA Konzentration mit dem Qubit™ Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen und mit Low TE Puffer auf 0,4-0,6 ng/µl verdünnt. Die verdünnte Lösung wird mit dem „High Sensitivity DNA Kit“ (Agilent2100 BioAnalyzer) gemessen und die Fragmentlänge überprüft. Die DNA wird mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 pM eingestellt und mit dem Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) sequenziert.

6.2. Materialien

Tabelle 14: Sequenzen der Primer für die genannte Variante in der Fragmentsequenzierung.

Variante	Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Temp. [°C]	Größe [bp]
JAK2:p.His401Tyr	vorw.	AAAGAAGTAGCACCTCCAGCC	57,1	70
	rückw.	TGTATTACTCACGAAATTGGGCC	55,2	
TP53:p.Gln167=	vorw.	GCTCACCATCGCTATCTGAG	55,1	89
	rückw.	CATGGCCATCTACAAGCAGT	55,1	
DDX3X:p.Glu562Lys	vorw.	AGGATTTGTTGGATCTTCTTGTT	52,6	115
	rückw.	CCTCACCTCTTAGAACGTCC	54,4	
TAF1:p.Glu1834Lys	vorw.	ACCCAAGACACAAGCTTCAG	55,2	108
	rückw.	GACCTGGCTTAGTACGCTC	54,9	
PIK3CA:p.Glu542Lys	vorw.	ATGACAAAGAACAGCTCAAAGCA	55,4	103
	rückw.	CATTTTAGCACTTACCTGTGACTCC	55,7	
PIK3CA:p.Glu545Lys	vorw.	CTCAAAGCAATTTCTACACGAGA	53,1	101
	rückw.	ACAGAGAATCTCCATTTTAGCAC	52,8	
RB1:c.2106+23C>T	vorw.	GACAGGCATTTGGACCAAGTAA	55,4	70
	rückw.	CAGTTAACAAGTAAGTAGGGAGGA	53,7	
NOTCH1:p.Ser1098=	vorw.	CACAGCAGGTTACCTTGTCG	55,9	112
	rückw.	AGACCCACACCCAGTACC	56,4	

vorw.: vorwärts; rückw.: rückwärts; Temp.: Temperatur; bp: Basenpaare

6.3. Angaben zum Eigenanteil

6.3.1. Plasma Cell-free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Konzeption der Studie: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Steffen Wagner, Nora Würdemann

Datenkuration: Steffen Wagner, Nora Würdemann

Formale Analyse: **Henrike Reder-Jung**, Victor Franz Taferner

Einwerbung finanzieller Mittel: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Steffen Wagner

Erhebung der Daten: **Henrike Reder-Jung**, Victor Franz Taferner

Methodologie: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Projektverwaltung: Steffen Wagner, Claus Wittekindt, Nora Würdemann, Jens Peter Klussmann

Ausführen der Analysen/Experimente: **Henrike Reder-Jung**, Victor Franz Taferner

Bereitstellen der Ressourcen: **Henrike Reder-Jung**, Victor Franz Taferner, Steffen Wagner, Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt

Software: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Betreuung: Jens Peter Klussmann, Steffen Wagner, Andreas Bräuninger

Validierung: **Henrike Reder-Jung**, Victor Franz Taferner, Steffen Wagner

Visualisierung: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner, Victor Franz Taferner

Verfassen der Publikation: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Korrektur der Publikation: Steffen Wagner, Victor Franz Taferner, Claus Wittekindt, Jens Peter Klussmann, Andreas Bräuninger, Ernst-Jan M. Speel, Stefan Gattenlöhner, Gregor Wolf, Nora Würdemann

Co-Autoren:

Unterschriften der Co-Autoren im PDF entfernt

6.3.2. Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure

Konzeption der Studie: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Nora Würdemann

Datenkuration: Sarah Sandmann-Varghese, Martin Dugas

Formale Analyse: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner, Ulrike Gamerdinger

Einwerbung finanzieller Mittel: Jens Peter Klussmann, Nora Würdemann, Steffen Wagner

Erhebung der Daten: **Henrike Reder-Jung**

Methodologie: Steffen Wagner, Andreas Bräuninger

Projektverwaltung: Jens Peter Klussmann, Nora Würdemann, Steffen Wagner

Ausführen der Analysen/Experimente: **Henrike Reder-Jung**, Ulrike Gamerdinger

Bereitstellen der Ressourcen: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner, Martin Dugas

Software: Sarah Sandmann-Varghese, Martin Dugas

Betreuung: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner, Martin Dugas

Validierung: **Henrike Reder-Jung**, Andreas Bräuninger

Visualisierung: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Verfassen der Publikation: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Korrektur der Publikation: Claus Wittekindt, Nora Würdemann, Sarah Sandmann-Varghese, Ulrike Gamerdinger, Martin Dugas, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner

Co-Autoren:

Unterschriften der Co-Autoren im PDF entfernt

6.3.3. Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status

Konzeption der Studie: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Nora Würdemann

Datenkuration: Sarah Sandmann-Varghese, Martin Dugas

Formale Analyse: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Einwerbung finanzieller Mittel: Jens Peter Klussmann, Nora Würdemann, Steffen Wagner

Erhebung der Daten: **Henrike Reder-Jung**

Methodologie: Steffen Wagner, Andreas Bräuninger

Projektverwaltung: Jens Peter Klussmann, Nora Würdemann, Steffen Wagner

Ausführen der Analysen/Experimente: **Henrike Reder-Jung**

Bereitstellen der Ressourcen: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner, Martin Dugas, Christine Langer

Software: Sarah Sandmann-Varghese, Martin Dugas

Betreuung: Jens Peter Klussmann, Claus Wittekindt, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner, Martin Dugas

Validierung: **Henrike Reder-Jung**, Andreas Bräuninger

Visualisierung: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Verfassen der Publikation: **Henrike Reder-Jung**, Steffen Wagner

Korrektur der Publikation: Claus Wittekindt, Nora Würdemann, Sarah Sandmann-Varghese, Christine Langer, Martin Dugas, Andreas Bräuninger, Stefan Gattenlöhner

Co-Autoren:

Unterschriften der Co-Autoren im PDF entfernt

6.4. Nutzungsgenehmigungen

Lizenzvereinbarungen zur Nutzung der Abbildungen kann auf Anfrage nachgereicht werden.

Abb. 1A (Seite 2):

Herausgabe von (de Villiers *et al.* 2004) Abb. 1, mit Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer: 5227440243166)

Abb. 1B (Seite 2):

Herausgabe von (Beutner *et al.* 1997) Abb. 1, mit Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer: 5227440637400)

Abb. 2 (Seite 3):

Herausgabe von (Faraji *et al.* 2017b) Abb. 2C, mit Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer: 5227440963632)

Abb. 3 (Seite 5):

Herausgabe von (Faraji *et al.* 2017b) Abb. 3, mit Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer: 5227440963632)

Abb. 4B (Seite 6):

Herausgabe von Cancer Research UK 2015

Abb. 6 (Seite 10):

Herausgabe von (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2021)) Abb. 1, mit Erlaubnis der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (private E-Mail Kommunikation)

Abb. 7 (Seite 15):

Herausgabe von (Haber *et al.* 2014), Abb. 1

Abb. 8 (Seite 16):

Herausgabe von (Wittekindt *et al.* 2018) Abb. 10, © Georg Thieme Verlag KG (Lizenznummer: 5225220645668)

Kapitel 2.1:

Herausgabe von (Reder *et al.* 2020)

Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Author:
Henrike Reder,Victor F. Taferner,Claus Wittekindt,Andreas Bräuninger,Ernst-Jan M. Speel,Stefan Gattenlöhner,Gregor Wolf,Jens P. Klussmann,Nora Wuerdemann,Steffen Wagner

Publication: The Journal of Molecular Diagnostics

Publisher: Elsevier

Date: November 2020

© 2020 Association for Molecular Pathology and American Society for Investigative Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

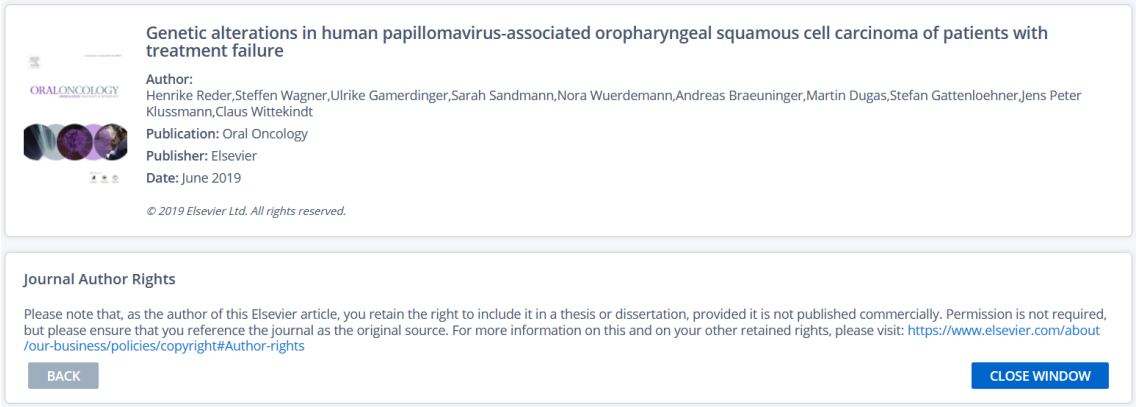
Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

Kapitel 2.2:

Herausgabe von (Reder *et al.* 2019)



Genetic alterations in human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure

Author:
Henrike Reder,Steffen Wagner,Ulrike Gamerdinger,Sarah Sandmann,Nora Wuerdemann,Andreas Braeuninger,Martin Dugas,Stefan Gattenloehner,Jens Peter Klussmann,Claus Wittekindt

Publication: Oral Oncology

Publisher: Elsevier

Date: June 2019

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

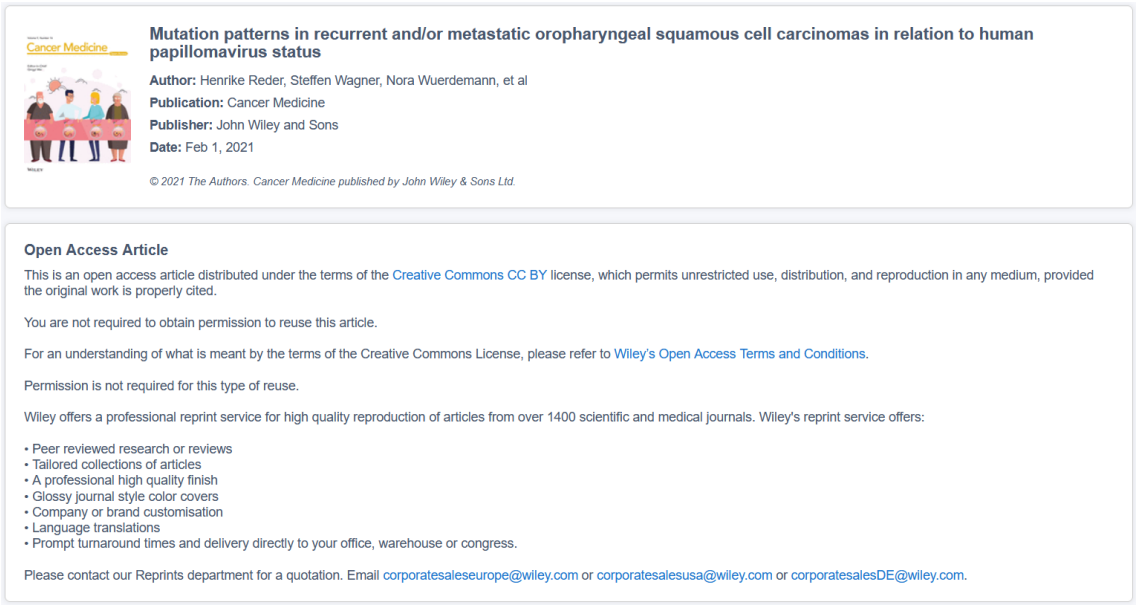
Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

Kapitel 2.3:

Herausgabe von (Reder *et al.* 2021)



Mutation patterns in recurrent and/or metastatic oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to human papillomavirus status

Author: Henrike Reder, Steffen Wagner, Nora Wuerdemann, et al

Publication: Cancer Medicine

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Feb 1, 2021

© 2021 The Authors. Cancer Medicine published by John Wiley & Sons Ltd.

Open Access Article

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

For an understanding of what is meant by the terms of the Creative Commons License, please refer to Wiley's Open Access Terms and Conditions.

Permission is not required for this type of reuse.

Wiley offers a professional reprint service for high quality reproduction of articles from over 1400 scientific and medical journals. Wiley's reprint service offers:

- Peer reviewed research or reviews
- Tailored collections of articles
- A professional high quality finish
- Glossy journal style color covers
- Company or brand customisation
- Language translations
- Prompt turnaround times and delivery directly to your office, warehouse or congress.

Please contact our Reprints department for a quotation. Email corporatesaleseurope@wiley.com or corporatesalesusa@wiley.com or corporatesalesDE@wiley.com.

6.5. Veröffentlichungen

6.5.1. Publikationen

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

Reder H, Taferner VF, Wittekindt C, Brauninger A, Speel EM, Gattenlohner S, Wolf G, Klussmann JP, Wuerdemann N, Wagner S (2020): Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. J Mol Diagn 22(11):1333-1343 (DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.002)

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

Sharma SJ, Wagner S, **Reder HSF**, Kroll T, Wuerdemann N, Klussmann JP, Wittekindt C (2018): The 8th edition AJCC/UICC TNM staging for p16-positive oropharyngeal carcinoma: is there space for improvement?. Eur Arch Otorhinolaryngol 275(12): 3087-3091 (DOI: 10.1007/s00405-018-5156-4)

Wagner S, **Reder H**, Sharma SJ, Würdemann N, Wittekindt C, Klussmann JP (2018): [HPV-associated oropharyngeal cancer-incidence, trends, diagnosis, and treatment]. Urologe A 57(12): 1457-1463 (DOI: 10.1007/s00120-018-0810-4)

Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, Würdemann N, Knuth J, **Reder H**, Klussmann JP (2018): [HPV - A different view on Head and Neck Cancer]. Laryngorhinootologie 97(S 01): S48-S113 (DOI: 10.1055/s-0043-121596)

Wagner S, Sharma SJ, Wuerdemann N, Knuth J, **Reder H**, Wittekindt C, Klussmann JP (2017): Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. Oncol Res Treat 40(6): 334-340 (DOI: 10.1159/000477252)

6.5.2. Vorträge

Reder H., Wagner S., Gamerdinger U., Sandmann S., Würdemann N., Bräuniger A., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Genetische Veränderungen HPV-assoziierter Oropharynxkarzinome von Patienten mit Therapieversagen. Jahrehauptversammlung DGHNO 2019 (Berlin)

Reder H., Würdemann N., Gamerdinger U., Sandmann S., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Genetic Alterations in Human Papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma of Patients with Treatment Failure. International Meeting on Precision Oncology and Personalized Medicine for Head and Neck Cancer 2019 (Heidelberg)

Reder H., Würdemann N., Gamerdinger U., Sandmann S., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Genetic Alterations in Human Papillomavirus-associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of Patients with Treatment Failure. Science Day 2018 (Gießen)

6.5.3. Poster

Reder H., Wagner S., Sandmann S., Würdemann N., Bräuninger A., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P., Wittekindt C., Wolf G.: Human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma of patients with treatment failure have a similar mutation rate as HPV-negativ OPSCC – except for TP53. Meeting on Experimental and Translational Research in Head and Neck Cancer 2020 (Köln)

Reder H., Wagner S., Sandmann S., Würdemann N., Wolf G., Bräuniger A., Dugas M., Gattenlöhner S., Wittekindt C., Klußmann J.P.: Genetische Profile HPV-assoziierter und HPV-negativr Oropharynxkarzinome von Patienten mit und ohne Therapieversagen. Science Day 2019 (Gießen)

Reder H., Würdemann N., Sandmann S., Gamerdinger U., Taferner V.F., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Detektion Tumor-spezifischer genetischer Aberrationen in Liquid Biopsies von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen. Jahrehauptversammlung DGHNO 2018 (Lübeck)

Reder H., Würdemann N., Sandmann S., Gamerdinger U., Taferner V.F., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Detection of tumor-specific mutations and viral DNA in liquid biopsies of patients with human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC). International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer 2018 (Essen)

Reder H., Würdemann N., Gamerdinger U., Sandmann S., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Dugas M., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Detektion Tumor-spezifischer Mutationen und Viraler DNA in Liquid Biopsies von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen. Science Day 2017 (Gießen)

Reder H., Würdemann N., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Genetische Biomarker in Liquid Biopsies von Human Papillomavirus-assoziierten Oropharynxkarzinomen. Jahrehauptversammlung DGHNO 2017 (Erfurt)

Reder H., Würdemann N., Bräuniger A., Wagner S., Wittekindt C., Gattenlöhner S., Klußmann J.P.: Genetic Biomarkers in HPV-associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer 2018 (Leipzig)

7. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Datum: _____

Unterschrift: _____

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei **Prof. Dr. Jens Peter Klußmann** bedanken. Ich danke Ihnen, dass ich meine Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe absolvieren durfte und Sie mich auch aus der Ferne die gesamte Zeit über unterstützt haben.
Weiterhin **Dr. Steffen Wagner**: dass er mir praktisch immer zur Seite stand, sich immer viel Mühe gegeben hat und bei Fragen und Problemen stets ansprechbar war.
Vielen Dank an **Prof. Dr. Claus Wittekindt** für die Unterstützung während der gesamten Zeit und das konstruktive Input.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem **Verein zur Förderung der Krebsforschung in Gießen e.V.** und der **Rhön Klinikum AG** (Projekt FI 46).

Ich danke **Prof. Dr. Andreas Bräuninger** für die Hilfe zur Auswertung der NGS Daten von Seiten der Pathologie.
Großer Dank geht auch an **Dr. Sarah Sandmann-Varghese** und **Dr. Ulrike Gamerdinger** für die Mitwirkung bei der Entstehung meiner ersten Publikation.
Herzlichen Dank an alle bei jedweder Hilfe im Labor und bei den Experimten, besonders **Cindy, Sebastian, Katha** und **Steffi** aus der Pathologie sowie **Maike** und **Nora**. Ohne euch hätte ich keine Daten gehabt.
Vielen Dank an **Victor** für die Unterstüzung beim Liquid Biopsy Projekts. Ich drücke dir für alles weitere auf deinem Lebensweg die Daumen.
Lieben Dank an **Tine, Elena** und **Hannah** für die Ablenkung im und neben dem Labor.

Mein größter Dank an **Manu**, dass er meinen Weg von Anfang an begleitet und mich nie aufgegeben hat. Ich freue mich auf viele weitere Jahre mit dir.
Zu guter Letzt danke ich meinen **Eltern**, meiner Schwester und ihrer Familie, dass sie mich über all die Jahre immer wieder angetrieben und an mich geglaubt haben. Nicht zu vergessen: **Lorenz**, **Jasper** und **Thilo** sowie **Fynn** und **Fiona**, deren Lachen einem das Herz wärmt und die die beste Ablenkung überhaupt sind.