

**Risikofaktoren und Einfluss der Translokation von  
 $\beta$ -Catenin und p120ctn auf das Überleben von Patienten  
mit HPV-assoziierten und HPV-negativen  
Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx**

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

Vorgelegt von Theresa Jüttner  
aus Hamburg

Gießen 2018

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf-Halschirurgie und plastische  
Operationen des Universitätsklinikums Gießen & Marburg, Standort Gießen  
unter der Leitung von Prof. Dr. Claus Wittekindt,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus Wittekindt
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans-Peter Howaldt

Tag der Disputation: 24.06.2019

**Inhaltsverzeichnis**

1.0 Einleitung..... 1

    1.1. Ätiologie des Oropharynxkarzinoms ..... 1

    1.2. Anatomie des Oropharynx..... 1

    1.3. Epidemiologie des Oropharynxkarzinoms ..... 1

    1.4. Das humane Papillomvirus..... 2

    1.5. Unterschied zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ..... 3

    1.6. Therapie und Prognose ..... 5

    1.7. Prozesse und beteiligte Proteine der Karzinogenese ..... 5

        1.7.1. Metastasierung der Oropharynxkarzinome..... 5

        1.7.2. EMT und MET ..... 6

        1.7.3. Merkmale von E-Cadherin..... 7

        1.7.4. Das  $\beta$ -Catenin, Bindungspartner des E-Cadherin..... 8

            1.7.4.1. Die nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin..... 8

            1.7.4.2.  $\beta$ -Catenin und die Entstehung von Tumoren .....10

        1.7.5. Das p120-Catenin, Bindungspartner des E-Cadherin.....10

    1.8. Zielsetzung der Arbeit ..... 12

2.0 Material und Methoden ..... 13

    2.1. Material ..... 13

        Tabelle 1: Laborgeräte ..... 13

        Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien ..... 14

        Tabelle 3: Chemikalien ..... 15

        Tabelle 4: Lösungen und Puffer..... 15

        Tabelle 5: Primärantikörper ..... 16

        Tabelle 6: Sekundärantikörper..... 16

        Tabelle 7: Kits ..... 16

        Tabelle 8: Software ..... 16

    2.2. Methoden ..... 17

2.2.1.	Datenerhebung und Auswahlkriterien der Patienten.....	17
2.2.2.	Einteilung und Definition der Risikofaktoren .....	18
2.2.3.	Auswahl Paarvergleichs-Kollektiv.....	19
2.2.4.	Die Aufarbeitung und HPV-Bestimmung des Tumorgewebes.....	19
2.2.5.	Immunhistochemische Färbungen.....	20
2.2.5.1	Immunhistochemische Färbung: p120ctn .....	21
2.2.5.2	Immunhistochemische Färbung: $\beta$ -Catenin.....	22
2.2.6.	Immunfluoreszenzfärbung.....	23
2.2.7.	Beurteilung der $\beta$ -Catenin und p120ctn Expression.....	24
2.3.	Statistische Auswertung der Daten.....	24
2.4.	Einteilung von TNM- und UICC-Stadium .....	25
2.4.1.	TNM-Klassifikation .....	25
2.4.2.	UICC-Stadien.....	26
3.0	Ergebnisse.....	28
3.1.	Retrospektive Analyse zur HPV-Prävalenz im Zeitraum 2000-2009 .....	28
3.2.	Verteilung von Risikofaktoren im Kollektiv .....	29
3.3.	Analyse von Tumorlokalisierung und Tumorstadium .....	30
3.4.	Analyse der Therapie von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC .....	32
3.5.	Univariate Analyse des Gesamtüberlebens.....	33
3.6.	Gesamtüberleben kurativ behandelter Patienten mit OPSCC.....	34
3.7.	Analyse des Gesamtüberlebens von kurativ behandelten Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.....	38
3.8.	Multivariate Analyse des Überlebens .....	39
3.9.	Analyse von Unterschieden zwischen Paarvergleich-Kollektiv und Gesamtkollektiv.....	42
3.10.	Auswertung und Einteilung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte .....	43
3.11.	Auswertung der immunhistochemischen Färbung für $\beta$ -Catenin.....	45
3.12.	Auswertung der immunhistochemischen Färbung für p120ctn .....	47

3.13.	Analyse der Zellkernfärbung in den Metastasen.....	48
3.14.	Analyse des Überlebens des Paarvergleich-Kollektivs .....	49
3.15.	Analyse des Überlebens von Patienten anhand der Anfärbung der Zellkerne in der immunhistochemischen Färbung .....	50
3.15.1.	Überleben anhand der Zellkernfärbung für $\beta$ -Catenin.....	50
3.15.2.	Überleben anhand der Zellkernfärbung für p120ctn .....	51
3.16.	Darstellung der Lokalisation von $\beta$ -Catenin und p120ctn in der Immunfluoreszenzfärbung von Tumorgewebe.....	52
4.0	Diskussion .....	54
4.1.	Retrospektive Analyse.....	54
4.1.1.	Zeitlicher Trend der HPV-Assoziation.....	54
4.1.2.	Biometrische Merkmale und Charakteristika von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC .....	55
4.1.3.	Analyse der Risikofaktoren.....	56
4.1.3.1.	Tabak- und Alkoholkonsum .....	56
4.1.3.2.	HPV-Status .....	57
4.1.3.3.	Tumoreigenschaften und Metastasierung.....	58
4.1.4.	Analyse unterschiedlicher Therapieverfahren.....	59
4.1.5.	Analyse des Überlebens nach Operation .....	60
4.2.	Experimenteller Teil.....	61
4.2.1.	Überlebensanalyse des Paarvergleich-Kollektivs .....	61
4.2.1.	Immunhistochemischer Nachweis von $\beta$ -Catenin und p120ctn.....	62
4.3.	Ausblick.....	63
5.0	Zusammenfassung .....	65
5.1.	Abstract.....	66
6.0	Abkürzungsverzeichnis .....	67
7.0	Abbildungsverzeichnis .....	71
8.0	Tabellenverzeichnis .....	73
9.0	Literaturverzeichnis.....	75

10.0 Publikationsverzeichnis .....	84
Erklärung zur Dissertation .....	85
Danksagung .....	86

## 1.0 Einleitung

### 1.1. Ätiologie des Oropharynxkarzinoms

Das Oropharynxkarzinom zählt zu den Kopf- und Halstumoren. Der am häufigsten vorkommende maligne Tumortyp sind Plattenepithelkarzinome (*Head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC). Die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) ist mit den Risikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert (Ang et al. 2010; Herrero et al., 2003; Rietbergen et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass der Tabakkonsum des Weiteren einen dosisabhängigen Risikofaktor für das Überleben darstellt (Ang et al., 2010; Rietbergen et al., 2013). Einen weiteren Risikofaktor für die Entstehung eines OPSCC stellt das humane Papillomvirus (HPV) dar (Näsman et al., 2009). Hierbei wird vor allem die sexuelle Übertragung von HPV als Ursache diskutiert (Gillison et al., 2008). Aufgrund der Ätiologie des OPSCC lassen sich zwei Tumorentitäten unterscheiden: das HPV-assoziierte und das HPV-negative OPSCC.

### 1.2. Anatomie des Oropharynx

Der Rachen (Pharynx) besteht anatomisch aus drei Teilen. Er setzt sich zusammen aus dem Nasenrachen (Nasopharynx), dem Mundrachen (Oropharynx) sowie dem Schlundrachen (Laryngopharynx). Der Oropharynx, auch Mesopharynx genannt, wird anatomisch begrenzt durch die Vorderwand, bestehend aus dem Zungengrund mit der Tonsilla lingualis, sowie der Seitenwand mit den Gaumenbögen und den Tonsillae palatinae. Die Hinterwand des Oropharynx wird aus der Fascia prävertebralis des zweiten und dritten Halswirbels gebildet. Die kraniale Begrenzung, das Dach, besteht aus einer gedachten horizontalen Linie des Gaumensegels und bildet gleichzeitig die untere Begrenzung des darüber liegenden Nasopharynx. Nach kaudal erstreckt sich der Oropharynx bis zum Oberrand der Epiglottis (Probst et al., 2008).

### 1.3. Epidemiologie des Oropharynxkarzinoms

Die Rate neudiagnostizierter HNSCC ist ansteigend. Während im Jahr 2007 die geschätzte Anzahl neudiagnostizierter HNSCC (*oral cavity, pharynx, larynx*) bei 45.660 Patientenfällen in den USA lag (Jemal et al., 2007) wurde 2016 von 61.760 Fällen berichtet (Siegel et al., 2016). In den letzten Jahrzehnten ist der Nachweis von HPV in HNSCC zunehmend in den Fokus gerückt, da unabhängig vom Geschlecht über eine

steigende Inzidenzrate HPV-assoziiertes HNSCC berichtet wurde (Nygård et al., 2012). Der steigende Anteil HPV-positiver Tumoren wurde am Beispiel von Tonsillenkarzinomen in Schweden demonstriert. Die Analyse von Biopsien hat gezeigt, dass die Rate der HPV-positiven Tonsillenkarzinome in den 1970er Jahren 23%, in den 1980er Jahren 29%, in den 1990er Jahren 57% und im Zeitraum 2000 – 2007 79% betrug (Näsman et al., 2009). Ein konformer Anstieg wurde für die Prävalenz von HPV in Zungengrundkarzinomen in Stockholm gezeigt. 1998 – 2001 betrug die Prävalenz 58% und in den Jahren 2004 – 2007 84% (Attner et al., 2010). Eine Studie aus den USA hat einen Inzidenzanstieg HPV-positiver OPSCC von rund 225% und eine Reduktion von HPV-negativen OPSCC gezeigt (Chaturvedi et al., 2011). Eine mögliche Ursache für diesen Anstieg könnte die sexuelle Übertragung von HPV, vor allem durch Oralsex, darstellen (Gillison et al., 2008).

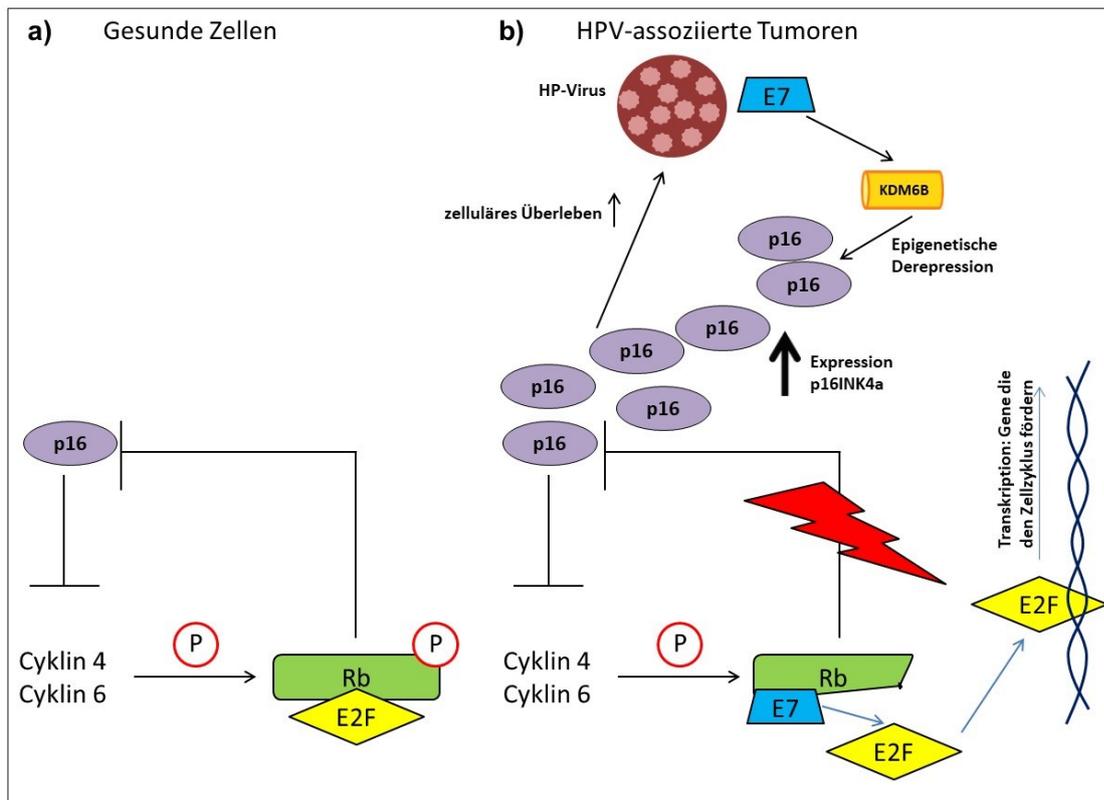
#### **1.4. Das humane Papillomvirus**

In den 1970er Jahren hat der Forscher Harald zur Hausen zunächst vermutet, dass Gebärmutterhalskrebs mit HPV assoziiert sein könnte (Zur Hausen H., 1977). Eine mögliche Beteiligung von HPV an der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs hat die Arbeitsgruppe von Syrjänen et al. 1983 publiziert (Syrjänen et al., 1983). In Oropharynxkarzinomen wurde die Assoziation zu HPV, vor allem in den Tonsillen, anhand von DNA-Analysen und durch immunhistochemische Färbung des p16 Proteins gezeigt (Klussmann et al., 2003:1 & 2003:2; Wittekindt et al., 2005). Bislang konnten mehr als 150 HPV-Genotypen identifiziert werden. HPV ist ein nicht-umhülltes DNA-Virus mit „low-risk“ (Niedrigrisiko) und „high-risk“ (Hochrisiko) Varianten. Es kann durch die Infektion von epithelialen Schleimhautzellen mit den HPV Hochrisiko-Varianten nach mehreren Jahren zur Entwicklung eines Karzinoms kommen. Es führen jedoch nur wenige Infektionen letztendlich zur Tumorentstehung (zusammengefasst in Rampias et al., 2014). Das HPV-Genom besteht im Wesentlichen aus zwei Abschnitten, sowie einer langen Kontrollregion. Der eine Abschnitt enthält die „early“ (frühen) Gene (E1-E7). Diese setzen sich aus den Regulatorproteinen E1 und E2 zusammen, die an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind, sowie der drei Onkoproteine E5, E6 und E7. Der andere Abschnitt enthält die „late“ (späten) Gene L1-L2, die für Capsidproteine kodieren (zusammengefasst in Rampias et al., 2014).

## 1.5. Unterschied zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC

Anhand von klinischen und molekularbiologischen Unterschieden lassen sich zwei Tumorentitäten des OPSCC deutlich voneinander unterscheiden: die HPV-assoziierten und die HPV-negativen OPSCC. Von den Kopf-Halstumoren sind besonders viele HPV-positive Tumoren im Oropharynx lokalisiert (Fischer et al., 2010). Sie entstehen vor allem in den Tonsillae palatinae (Klussmann et al., 2003:2; Herrero et al., 2003; Fakhry et al., 2008). Patienten mit HPV-positiven Tumoren sind zum Diagnosezeitpunkt häufig jünger (Ang et al., 2010; Hammarstedt et al., 2006) und weisen nach abgeschlossener Therapie ein signifikant längeres Überleben auf als Patienten mit HPV-negativen Karzinomen (Ang et al., 2010; Licitra et al., 2006). Im Vergleich zu den HPV-negativen Karzinomen sind die HPV-assoziierten OPSCC zum Diagnosezeitpunkt bereits häufig in die lokoregionären Lymphknoten metastasiert (Paz et al., 1997; Andl et al., 1998). In Bezug auf molekularbiologische Unterschiede weisen HPV-negative HNSCC deutlich mehr Mutationen im Exom auf als HPV-positive Tumoren (Stransky et al., 2011). Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53 konnten nicht in HPV-assoziierten, jedoch in den meisten HPV-negativen Tumoren festgestellt werden (Agrawal et al., 2011). Des Weiteren wurden im Genom HPV-negativer OPSCC deutlich mehr Teilverluste oder komplette Verluste der chromosomalen Arme 3p, 9p und 17p gezeigt als in HPV-assoziierten (Braakhuis et al., 2004), wobei 17p13 für p53 kodiert und 9p21 für p16INK4a (González et al., 1995). Zusätzlich führt die Inaktivierung von p16INK4A durch Hypermethylierung oder den Verlust von chromosomalen Anteilen im Weiteren zur Störung der Regulierung durch das Retinoblastom Tumorsuppressorprotein (Rb) (Shintani et al., 2001). In gesunden Zellen hemmt das Tumorsuppressorprotein p16INK4a (p16) normalerweise die Kinasen 4 und 6 und verhindert so, dass das Rb phosphoryliert wird. Im phosphorylierten Zustand ist Rb inaktiv (Abbildung 1). In HPV-assoziierten OPSCC ist im Gegensatz zu HPV-negativen Tumoren eine Erhöhung des Tumorsuppressorproteins p16INK4a nachweisbar (Klussmann et al., 2003:1). Die Onkoproteine E6 und E7 spielen in HPV-assoziierten Tumoren eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese. Das Onkoprotein E6 fördert durch Ubiquitinierungsprozesse den proteolytischen Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 (Scheffner et al., 1990). Das HPV-Onkoprotein E7 induziert die H3K27-spezifische Histondemythylase KDM6B. KDM6B führt wiederum durch epigenetische Derepression zu einer erhöhten Expression von p16INK4A. Die erhöhte Expression von p16INK4A ist wichtig für das zelluläre Überleben (McLaughlin-Drubin et al., 2013). E7 bindet des Weiteren an das Rb, destabilisiert es durch Ubiquitinierungsprozesse und verhindert

dessen Bindung an den E2F-Transkriptionsfaktor (Abbildung 1). Hierdurch wird die Funktion von Rb als Tumorsuppressor aufgehoben. Der „freie“ E2F-Transkriptionsfaktor kann an die DNA binden und die Expression von verschiedenen Genen ermöglichen, die die DNA-Synthese und Zellprogression und somit auch die virale Vermehrung unterstützen (zusammengefasst in Rampias et al., 2014). Die Inaktivierung des Rb durch das humane Papillomvirus fördert darüber hinaus die Überexpression des p16INK4A in HPV-assoziierten Tumoren (Smeets et al., 2007) und das invasive Tumorwachstum (McLaughlin-Drubin et al., 2013).



**Abbildung 1** Regulierung von p16INK4a (p16) *nach eigenem Entwurf.*

Abbildung 1 a) zeigt die normale Regulierung der Tumorsuppressorproteine p16INK4a (p16) und des Retinoblastomproteins (Rb). In gesunden Zellen hemmt phosphoryliertes pRb die Produktion von p16. P16 wiederum hemmt die Phosphorylierung des Rb durch Hemmung der Cykline 4 und 6. Des Weiteren wird unter anderem der Transkriptionsfaktor E2F an dephosphoryliertes Rb gebunden.

Abbildung 1 b) zeigt die Regulierung von p16 in HPV-assoziierten Tumoren. Das Onkogen E7 induziert die H3K27-spezifische Histondemythylase KDM6B. Diese fördert durch epigenetische Derepression die Expression von p16. Das onkogene Protein E7 destabilisiert Rb und Rb kann daher nicht mehr von den Cyklinen phosphoryliert werden (zur Hausen, 2002) (Smeets et al., 2007). Unphosphoryliertes Rb kann die Expression von p16 nicht hemmen. P16 wird daher überexprimiert. Des Weiteren kann der Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr an das destabilisierte Rb gebunden werden. Ungebunden sorgt E2F im Zellkern für die Transkription von Proteinen, die die Progression des Zellzyklus fördern.

## **1.6. Therapie und Prognose**

Die Therapie lokal fortgeschrittener Karzinome im Oropharynx besteht vorrangig in der Operation mit adjuvanter Bestrahlung, gegebenenfalls auch in Kombination mit einer Chemotherapie oder alternativ einer kurativen Chemoradiatio (National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Head and Neck Cancers. Version 2.2013 <http://www.nccn.org>.) (Panwar et al., 2014; Licitra et al., 2009). Bislang gibt es nur unzureichend vorhandene randomisierte klinische Studien zum Therapiemanagement, sodass keine Therapie als effektiver eingestuft werden kann. Obwohl die Chirurgie als Therapiemodalität häufig gewählt wird, gibt es nur wenige klinische Studien, die chirurgische Verfahren an Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht haben (Devaiah et al., 2016). Bei kleinen Tumoren wird für die Operation und die Radiotherapie von gleich guten Ergebnissen ausgegangen (Licitra et al., 2009). Die kombinierte Chemoradiatio ist für nichtoperable Tumoren oder Patienten mit prognostisch schlechtem funktionellen Ergebnis nach Tumoroperation, sowie multimorbiden Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand vorzuziehen (Licitra et al., 2009). Für Patienten mit HPV-positiven OPSCC wurde ein Überlebensvorteil nach alleiniger Chemoradiatio gegenüber HPV-negativen Patienten gezeigt (Ang et al., 2010). Unsere und andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die wichtigsten prognostischen Marker für das Überleben eines Patienten mit Oropharynxkarzinom der HPV-Status, die Therapie, der Tabakkonsum, das Tumorstadium, sowie die Komorbidität, Halslymphknotenmetastasen und der Leistungszustand nach ECOG sind (Wagner et al, 2017; Ang et al., 2010; Rietbergen et al., 2013).

## **1.7. Prozesse und beteiligte Proteine der Karzinogenese**

### **1.7.1. Metastasierung der Oropharynxkarzinome**

Die Metastasierung ist ein Prozess, bei dem Tumorzellen entweder über den Blutstrom (hämatogene Metastasen) oder den Lymphstrom (lymphogene Metastasen) in andere Gewebe verstreut werden können. Dort können sie sich zu Tochtergeschwülsten entwickeln. Das Oropharynxkarzinom metastasiert lokal sowohl ipsilateral als auch kontralateral in die drei Halslymphknotenstationen und bildet Fernmetastasen, die sich vor allem in der Lunge, im Knochen und der Leber ansiedeln (Watkinson et al., 2012). Für HPV-induzierte OPSCC wurden zusätzlich Fernmetastasen in unüblichen Lokalisationen wie intraabdominellen und axillären Lymphknoten, der

Skelettmuskulatur, dem Gehirn, den Nieren, der Haut, dem Perikard, sowie dem Peritoneum gezeigt (Trosman et al., 2015). Eine Reihe von Regulationsmechanismen und Vorgängen finden während der Metastasierung statt. Hierzu gehören unter anderem die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und die mesenchymale-epitheliale Transition (MET). Die Regulierung der Vernetzung von Zelladhäsionsmolekülen, unter anderem E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und p120-Catenin (p120ctn), spielt hierbei auch eine Rolle (Schipper et al., 1991; Stenner et al., 2011; Anastasiadis et al., 2000).

### **1.7.2. EMT und MET**

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozess, der vor allem in der Embryogenese eine entscheidende Rolle spielt. Hierbei erlangen epitheliale Zellen mesenchymale Fähigkeiten, wie beispielsweise eine Veränderung der Zellform und Mobilität. An anderen Stellen im Embryo können sich diese Zellen dann durch mesenchymale-epitheliale Transition (MET) zu Epithelzellen entwickeln. Die Verbindung von mehreren Epithelzellen trägt zur Bildung von Organen während der Embryogenese bei. Einige der Prozesse der EMT finden auch im Rahmen der Karzinogenese, beziehungsweise der Metastasierung statt. Während der Tumorprogression kommt es zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten, dem Erwerb von Zellmotilität und der Möglichkeit der Zellstreuung. Die EMT geht mit dem Verlust des E-Cadherins (Kapitel 1.7.3.) einher. An der Regulierung der EMT sind unter anderem Src-Tyrosinkinasen, die kleinen GTPasen Rac und Rho, sowie die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug beteiligt (Thiery 2002; Boyer et al., 2000). Für HPV-assoziierte OPSCC wurde eine deutliche Repression des E-Cadherins in Primärtumoren gezeigt, wohingegen die Reduktion des E-Cadherins in HPV-negativen Tumoren nicht in Primärtumoren, sondern lediglich in Lymphknotenmetastasen nachweisbar war. Es wird daher angenommen, dass die EMT früher in HPV-assoziierten OPSCC stattfindet im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC (Stenner et al., 2011). Eine Studie an MDCK-Zellen (*Madin-Darby-canine-kidney Zellen*) hat die Induktion der EMT sowie die Zellmigration und Zellinvasion durch die HPV16 Onkogene E6 und E7 gezeigt. Es konnte die Expression von EMT-aktivierenden Transkriptionsfaktoren, insbesondere von ZEB-1 an HNSCC-Zellen durch E6 und E7, sowie die Herunterregulierung der epithelialen Marker E-Cadherin und die erhöhte Expression des mesenchymalen Markers Vimentin demonstriert werden (Jung et al., 2013). Eine andere Studie an HNSCC Tumoren hat gezeigt, dass das Vorkommen von aktivierter Src-Tyrosinkinase

mit einer Verminderung des E-Cadherins und dem Auftreten von Vimentin assoziiert ist. Eine Blockierung der Src-Tyrosinkinase in ausgewählten Zelllinien hat in vitro zur Reexpression von E-Cadherin, einer verminderten Zellmigration und erhöhtem Zell-Zell-Kontakt geführt (Mandal et al., 2008).

### **1.7.3. Merkmale von E-Cadherin**

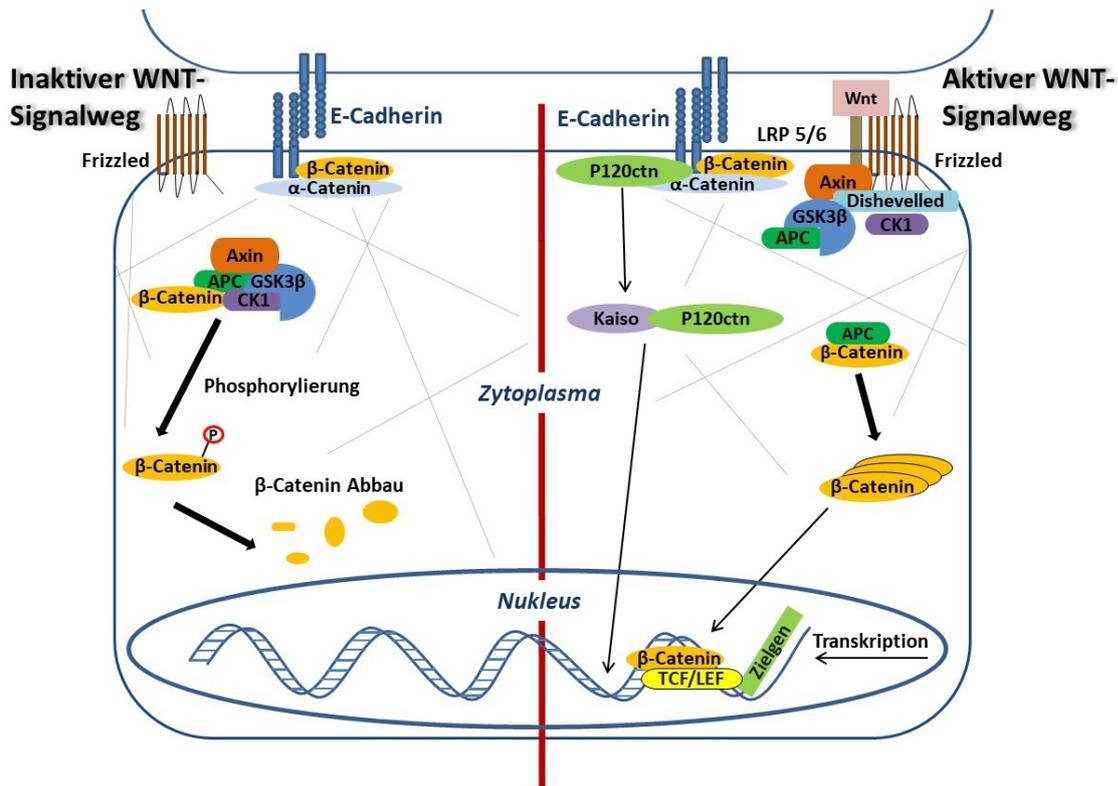
E-Cadherin ist ein 120 kDa (Ekblom et al., 1986), Calcium-abhängiges Glykoprotein (Gallin et al., 1983), welches an der Bildung von Zell-Zellkontakten, den sogenannten Adhäsions-Kontakten, beteiligt ist (Volk et al., 1987; Boller et al., 1985). Es ist an der Zelloberfläche lokalisiert und ist an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt (Peyri ras et al., 1985; Vestweber et al., 1984). An das E-Cadherin binden verschiedene Catenine. Hierzu gehören das  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Catenin (Ozawa et al., 1989) sowie das p120 Catenin (p120ctn) (Reynolds et al., 1989; Daniel et al., 1995). Studien an Epithelzellen haben gezeigt, dass E-Cadherin der Zellinvasivität entgegenwirkt (Behrens et al., 1989). E-Cadherin spielt daher bei der Karzinogenese und beim Metastasierungsprozess eine entscheidende Rolle. Eine andere Studie hat veranschaulicht, dass E-Cadherin im Normalgewebe und in  $\beta$ -Zelladenomen des Pankreas exprimiert wird. Hingegen ist der Verlust von E-Cadherin in  $\beta$ -Zellkarzinomen immunhistochemisch detektierbar. (Perl et al., 1998). E-Cadherin geht nachweislich während der invasiven Tumorprogression an der Zellmembran verloren (Downer et al., 1993). Eine Studie an Geweben und Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches hat gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin negativ mit der Entdifferenzierung des Tumors und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert. Lymphknotenmetastasen exprimierten kein E-Cadherin. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass die Expression von E-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül der Progression eines HNSCC entgegenwirkt (Schipper et al., 1991). Für Tonsillenkarzinome wurde gezeigt, dass während des Metastasierungsprozesses eine Herunterregulierung der E-Cadherin-Expression an der Zellmembran sowie eine Heraufregulierung der nukleären  $\beta$ -Catenin Expression stattfindet. Abhängig vom HPV-Status des Patienten findet diese Modulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Die sinkende E-Cadherin-Expression und der erhöhte nukleäre Nachweis von  $\beta$ -Catenin könnten zusammengenommen ein wichtiges Ereignis in der Progression HPV-assoziiierter Tumoren sein (Stenner et al., 2011).

#### **1.7.4. Das $\beta$ -Catenin, Bindungspartner des E-Cadherin**

Das  $\beta$ -Catenin ist ein 88 kDa großes Protein. Es konnte 1989 mittels Immunopräzipitationsversuchen als Bindungspartner des E-Cadherins identifiziert werden (Ozawa et al., 1989). Es ist an der zytoplasmatischen Domäne des E-Cadherins lokalisiert und fungiert unter anderem als Verbindungsstruktur zwischen dem  $\alpha$ -Catenin und dem E-Cadherin (Ozawa et al., 1989; Aberle et al., 1994). Es ist somit ein Bestandteil der Adhäsions-Kontakte und dient der Verknüpfung mit dem Zytoskelett (Ozawa et al., 1989; Nagafuchi et al., 1989). Ozawa et al. (1989) haben daher angenommen, dass die Zelladhäsionsmoleküle  $\alpha$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin an einer adhäsionsabhängigen Signaltransduktion beteiligt sind (Ozawa et al., 1989).  $\beta$ -Catenin wurde des Weiteren im Zellkern detektiert, wo es als ein Aktivator für die Transkription der Zielgene des TCF/LEF-Transkriptionskomplexes fungiert (Molenaar et al., 1996). Das  $\beta$ -Catenin ist folglich ein Protein, dessen Lokalisation und Regulation für die Zellmigration (Näthke et al., 1996) und die Signaltransduktion wichtig sind (Funayama et al., 1995; Vleminckx et al., 1997).

##### **1.7.4.1. Die nukleäre Translokation von $\beta$ -Catenin**

Eine Erhöhung der  $\beta$ -Catenin Menge im Zytoplasma bzw. im Nukleus wurde vor allem für HPV-assoziierte Karzinome gezeigt (Stenner et al., 2011; Rampias et al., 2010). Es werden verschiedene Mechanismen der nukleären Translokation des  $\beta$ -Catenins diskutiert. Dazu zählt beispielsweise der kanonische WNT-Signalweg (Rampias et al., 2010) (Abbildung 2). Eine Studie von Rampias et al. von 2010 an HPV16-positiven oropharyngealen und zervikalen Zelllinien hat gezeigt, dass der WNT-Signalweg in HPV-positiven Tumorzellen aktiv ist. Dabei akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Zellkern und ein Teil ist dort transkriptionell aktiv. Diese Anreicherung im Nukleus wird mit der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 in Zusammenhang gebracht (Rampias et al., 2010). Es wird vermutet, dass das Onkogen E6 die Aktivität des kanonischen WNT-Signalwegs erhöht (Bonilla-Delgado et al., 2012). In Versuchen wurde gezeigt, dass sich  $\beta$ -Catenin in Abwesenheit des TCF/LEF-Komplexes vorwiegend im Zytoplasma befindet. Werden die beiden Proteine TCF und LEF exprimiert, so transloziert das  $\beta$ -Catenin in den Zellkern und führt durch Komplexbildung mit dem Transkriptionskomplex TCF/LEF zu dessen Aktivierung (Molenaar et al., 1996).



**Abbildung 2** Der Wnt-Signalweg.

**Links:** Inaktiver WNT-Signalweg ohne aktivierendes Wnt-Signal am Frizzled Rezeptor. Die Bindung des  $\beta$ -Catenins an den sogenannten *destruction*-Proteinkomplex, bestehend aus Axin, APC, GSK3 $\beta$  und CK1 führt zur Phosphorylierung und anschließendem Abbau des  $\beta$ -Catenins.

**Rechts:** Aktiver WNT-Signalweg. Durch Bindung eines Wnt-Signalproteins an den Frizzled-Rezeptor und den Co-Rezeptor LRP5/6, kann die Bindung des Proteinkomplexes (bestehend aus Axin, GSK3 $\beta$ , Dishevelled, CK1 und APC) im Zellinneren an diesen erfolgen. Durch eine Signalkaskade kann APC an das  $\beta$ -Catenin binden und es kommt zur Vervielfältigung und der Akkumulation des  $\beta$ -Catenins im Zytoplasma und dessen Einschleusung in den Zellkern, um dort durch Bindung an den TCF/LEF Rezeptor die Transkription von dessen Zielgenen zu initiieren.

*APC = Adenomatous polyposis coli protein, GSK3 = Glycogen synthase kinase 3, CK1 $\alpha$  = Casein kinase 1 $\alpha$ , Dishevelled = Dishevelled protein, Axin = axis inhibition protein, Frizzled = Frizzled receptor, TCF/LEF = T-cell factor/lymphoid enhancer factor, LRP5/6 = low-density lipoprotein receptor-related protein 5 & 6*

Abgewandelt nach (Daniel, 2007) und (Nanan et al., 2012)

Weitere Mechanismen, die für die nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin diskutiert werden, sind die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) (Hu et al., 2015), sowie der Siah-1 abhängige ubiquitin/proteasomale Signalweg, der bei HPV-positiven Tumorzellen für den Abbau von  $\beta$ -Catenin mitverantwortlich ist. Es wird vermutet, dass die Onkoproteine E6 und E7 HPV-positiver Karzinome diesen Signalweg beeinflussen (Rampias et al., 2010).

### 1.7.4.2. $\beta$ -Catenin und die Entstehung von Tumoren

Im Zytoplasma bildet  $\beta$ -Catenin einen Komplex mit dem Adenomatous-polyposis-coli-Protein (APC) und der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Rubinfeld et al., 1993; Rubinfeld et al., 1996). Verluste beim Spleißen der RNA von Proteinen oder Mutationen von Proteinen, die am WNT-Signalweg (Abbildung 2) beteiligt sind, können zur Tumorentstehung führen (zusammengefasst in Polakis, 2012). Wenn das  $\beta$ -Catenin dadurch nicht mehr an den Komplex binden kann, akkumuliert es und kann im Zellkern durch Aktivierung des TCF/LEF-Transkriptionskomplexes (Molenaar et al., 1996) die Transkription verschiedener Zielgene auslösen (Korinek et al., 1997) (Abbildung 2). Hierzu zählen die Transkription von c-Myc (He et al., 1998), matrilysin (Crawford et al., 1999), cyclin D1 (Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999). Eine erhöhte Expression von c-Myc findet man in kolorektalen Karzinomen (He et al., 1998). Eine Erhöhung des Cyclin D1 wurde unter anderem in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Jiang et al., 1992) und im hepatozellulären Karzinom (Nishida et al., 1994) beobachtet. Folglich können einerseits Mutationen, oder in HPV-assoziierten Tumoren die Onkogene E6 und E7, eine ungehemmte Expression von  $\beta$ -Catenin sowie seine Translokation in den Zellkern bedingen. Dort ist  $\beta$ -Catenin Aktivator des TCF/LEF-Transkriptionskomplexes. Durch dessen ungebremste Aktivierung kann es zur Überexpression von beispielsweise c-Myc, Cyclin D1 und matrilysin kommen, was zu zellulärer Proliferation und Tumorentstehung führen kann. Die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern führt des Weiteren zur Instabilität der Zell-Zell-Kontakte und kann somit den Metastasierungsprozess begünstigen.

### 1.7.5. Das p120-Catenin, Bindungspartner des E-Cadherin

Das p120ctn bindet zusammen mit  $\beta$ -Catenin oder  $\gamma$ -Catenin an E-Cadherin und ist Bestandteil des Cadherin-Catenin-Komplexes an der Zellmembran (Reynolds et al., 1994; Daniel et al., 1995). p120ctn unterstützt die lateralen Verbindungen zwischen verschiedenen E-Cadherin-Molekülen und bindet an dessen juxtamembranäre Domäne. Dieser zytoplasmatische Anhang des E-Cadherin ist wichtig für eine stabile Verbindung zwischen benachbarten Zellen und verhindert deren Ablösung aus dem Zellverband (Yap et al., 1998). Somit spielt p120ctn eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Zellmotilität (Chen et al., 1997). Neben der Funktion als Bestandteil des Cadherin-Catenin-Komplexes ist p120ctn des Weiteren ein Zielprotein der Src-Tyrosinkinase (*cellular und sarcoma* Tyrosinkinase) (Linder et al., 1988; Reynolds et al.

1989). Phosphoryliertes p120ctn (pp120ctn) an der Zellmembran ist mit einem erhöhten Karzinogeneserisiko verbunden. Bei Patienten mit potenziell malignen oralen Läsionen wurde gezeigt, dass die Translokation von pp120ctn von der Zellmembran ins Zytoplasma mit einer malignen Transformation assoziiert ist (Ma et al., 2012). Die Phosphorylierung des p120ctn durch Tyrosinkinase ist auch für die Regulation der GTPase Rho A mitverantwortlich (Castaño et al., 2007). Durch die Kontrolle der kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Cdc 42, Rac) im Zytoplasma kann p120ctn die Zellmotilität beeinflussen (Grosheva et al., 2001). Studien an NSCLC (non-small cell lung cancer) Tumorzellen haben den Zusammenhang zwischen reduziertem E-Cadherin und p120ctn an der Zellmembran und erhöhten GTPasen (Rac1, Cdc42, RhoA) im Zytoplasma gezeigt (Liu et al., 2009). In Studien an Pankreaskarzinomgewebe (Mayerle et al., 2003) und Zelllinien oraler Plattenepithelkarzinome (Lo Muzio et al., 2002) wurde gezeigt, dass eine Zunahme des p120ctn sowie seine Translokation ins Zytoplasma bzw. in den Nukleus mit einem geringer differenzierten Phänotypen der Tumorzellen und einem geringeren Überleben der Tumorpatienten korreliert. Die Translokation des p120ctn ist teilweise mit einem Verlust von E-Cadherin assoziiert (van Hengel et al., 1999) und in einigen Fällen zusätzlich auch mit dem Verlust von  $\beta$ -Catenin (Sarrió et al., 2004). Es wird vermutet, dass durch den gleichzeitigen Verlust des E-Cadherins der Metastasierungsprozess gefördert wird (Anastasiadis et al., 2000). p120ctn ist ein spezifischer Bindungspartner des Transkriptionsfaktors Kaiso und bindet diesen vermutlich an der gleichen Stelle, an der es sonst an der Zellmembran einen Komplex mit dem E-Cadherin bildet (Daniel et al., 1999). Zwei Studien haben gezeigt, dass p120ctn durch Beeinflussung des nukleären Kaisos dessen Hemmung seiner Zielgene aufheben kann (Kelly et al., 2004; Spring et al., 2005). Kaiso wird eine Rolle bei der Karzinogenese zugeschrieben (Kelly et al., 2006). Es besteht eine mögliche Verbindung zwischen dem  $\beta$ -Catenin/TCF-LEF1-Wnt Signalweg und dem Signalweg des p120ctn/Kaiso (Park et al., 2005; Daniel, 2007).

## 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, Risikofaktoren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx (OPSCC) zu identifizieren und mögliche Überlebensunterschiede zwischen kurativ behandelten Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC zu ermitteln. Zusätzlich sollten molekulare Unterschiede zwischen metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren mit unterschiedlichem HPV-Status identifiziert und das Überleben anhand dieser Faktoren analysiert werden. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass der Entstehung von OPSCC zwei Tumorentitäten zugrunde liegen: das HPV-assoziierte und das HPV-negative OPSCC.

Zur Erreichung der Ziele wurden die klinischen Daten von 396 Patienten mit invasiven OPSCC in den Jahren 2000 – 2009 retrospektiv ausgewertet. Folgende Parameter wurden erhoben: Tumorstadium, anatomische Lokalisation, Geschlecht, Alter, Leistungszustand, Tabak- und Alkoholkonsum und Therapie. Anschließend wurde das Überleben der Patienten in Abhängigkeit verschiedener Faktoren untersucht. Wesentlich war die Erhebung des HPV-Status in Kooperation mit der „Abteilung für angewandte Tumorbiologie“ in Heidelberg.

Für die molekulare Analyse wurde ein Paarvergleichs-Kollektiv gebildet (n=40). Die Patienten wurden nach Tumorausdehnung, Alter bei Diagnose und Geschlecht gepaart. Die Hälfte des Kollektivs wies Lymphknotenmetastasen auf. In dieses Kollektiv wurden Patienten mit OPSCC der Tumorausdehnung T1-T3 einbezogen. Tumorschnitte wurden immunhistochemisch angefärbt und bezüglich der zellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn untersucht. Zusätzlich sollte das Überleben der 40 Patienten anhand des immunhistochemischen Nachweises der Catenine im Zellkern der Primärtumore analysiert und in Verbindung mit dem Metastasenstatus beurteilt werden.

Ziel der Arbeit war:

- die Analyse von Risikofaktoren für Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC und Überlebensunterschiede zwischen beiden Gruppen auch in Bezug auf die durchgeführte Therapie.
- Ermittlung ob molekulare Unterschiede für die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn zwischen den beiden Tumorentitäten bestehen und ob sie eine Rolle für das Überleben der untersuchten Patienten spielen.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1. Material

**Tabelle 1: Laborgeräte**

Bezeichnung	Modell/Produktnummer	Hersteller/Lieferant
<b>Färbekammer</b>	Stain Tray™	Carl Roth
<b>Färbekästen</b>	Färbekästen nach Schiefferdecker	Carl Roth
<b>Kühlgeräte</b> Kühlschrank Tiefkühlschrank	Liebherr Comfort Liebherr Premium Nofrost Liebherr Premium	Liebherr
<b>Magnetrührer</b>	IKA RH basic2	IKA®
<b>Mikroskop</b>	DM2500	Leica
<b>Paraffin-Streckbad</b>	1052	GFL
<b>pH-Meter</b>	HI-2211	HANNA® instruments
<b>Pipetten</b> P2N P10N P20N, P200N, P1000N P100N	Gilson Pipetman® Neo 7-4390 Gilson Pipetman® Neo 7-4391 Gilson Pipetman® Neo Starter Kit, 7-4397 Gilson Pipetman® Neo 7-4393	Gilson
<b>Schüttler</b> Schüttler Wippschüttler Mini Blot Mixer Vortex-Schüttler	Shaker mit Plattform 7-0031 PMR-30 Schüttler mit Festwinkelplattform Mini Blot Schüttler, 3-D/700-0245 Lab Dancer 444-0004	neoLab Grant VWR® VWR VWR
<b>Reaktionsgefäßgestell</b>	Reaktionsgefäßgestell 1-5137	Neolab
<b>Reiskocher</b>	Tefal Steam Cuisine	Tefal
<b>Schlittenmikrotom</b>	SM2010 R	Leica
<b>Trockenschrank</b>	Model ED53	Binder
<b>Waage</b>	Kern PCB 2500-2	KERN & SOHN GmbH
<b>Zentrifugen</b> Zentrifuge Mini-Zentrifuge Kühlzentrifuge	Thermo Scientific™ Heraeus™ Pico17 Sprout® / 9945800 Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco21	Thermo Scientific Kobe Thermo Scientific

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Modell/Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Deckgläser</b> 18x18 mm 24x40 mm 21x26 mm	01-1818/1 01-2440/1 01-2126/1	R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik
<b>Einmal-Pipetten</b> 5 ml 10 ml 25 ml	606180 607180 760180	Greiner Bio-One
<b>Hydrophober Stift</b>	Liquid Blocker Super Pap pen for immunostaining, Z672548-1EA	Sigma-Aldrich
<b>Küvette Plastik</b>	M900-EasyDip™	Simport® Scientific Inc.
<b>Objektträger</b>	Superfrost Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik
<b>Objektträgerhalter</b>	M905- 12DGY	Simport® Scientific Inc.
<b>Objektträgerküvette Glas</b>	Wheaton® 900620	WHEATON®
<b>Pinzette</b>	Präzisionspinzette	DUMONT®
<b>Pipettenspitzen</b> 10 µl 200 µl  1000 µl	TXLF-10-R-S 701.189.105 70.1189.215 (mit Filter) 613-0458	Axygen Sarstedt Sarstedt Axygen
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 ml Safe Lock tube 2 ml Safe Lock tube 1,5 ml tube 1,5 ml protein low bind tube 1,5 ml DNA low bind tube	Eppendorf
<b>Schneideklängen für Mikrotom</b>	Microtome blade A 35 und R35 819 low profile microtome blade	Feather Leica

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	A-7030	Sigma Aldrich
TRS (Demaskierungslösung), 10-fach konzentriert	S1699	DAKO
Einschlussmittel für Xylol	Roti®-Histokitt II, T160.1	Carl Roth
Ethanol 99%	A4930,1000	Applichem
Ethanol 96% vergällt mit 1% MEK	A2551,5000	Applichem
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	T865.1	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	A2942	Applichem
Roticlear®	A538.1	Carl Roth
Roti®-Mount FluorCare Wasserlösliches Einschlussmittel	HP19.1	Carl Roth
Roti®-Mount FluorCare DAPI, wasserlösliches Einschlussmittel mit Farbstoff für Fluoreszenz	HP20.1	Carl Roth
Tris-Base	A2264	Applichem
Tween®20	A4974	Applichem
Xylol	CN80.1	Carl Roth
Wasserstoffperoxid, 30%	A1134, 0250	Applichem

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Beschreibung	Zusammensetzung	Produktnummer	Hersteller
TRS (pH 6)	10 x TRS (pH 6)	für Gebrauch 1:10 in VE-H <sub>2</sub> O verdünnt	S1699	DAKO
TBS-Puffer	Waschlösung	24,2 g Tris-Base +80g NaCl 10-fach konzentriert, für Gebrauch 1:10 in VE- H <sub>2</sub> O verdünnt	s. Tabelle 3	
TBST-Puffer	Waschlösung mit Tween®20	TBS (1x) + 0,1% Tween®20	s. Tabelle 3	
TRS/TBST	Demaskierungslösung mit Waschlösung und Tween®20	TBST (1x) Gemischt im Verhältnis 1:1 mit TRS (1x)	s. Tabelle 3	

**Tabelle 5: Primärantikörper**

Bezeichnung	Antigen/Spezifität	Produktnummer	Hersteller
<b>Anti-CTNND1 (Anti p120ctn- Antikörper)</b>	Wirt: Hase Reaktivität mit Gewebe vom Menschen, Maus, Ratte	HPA015955	Sigma Aldrich
<b>Anti-β-Catenin Antikörper</b>	Wirt: Maus Reaktivität mit Gewebe vom Menschen	610153	Becton Dickinson

**Tabelle 6: Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Antigen/Spezifität	Produktnummer	Hersteller
<b>Anti-Hase Antikörper</b>	Wirt: Ziege Spezifität für Hase	Im ABC-Kit enthalten	Vector laboratories
<b>Anti-Maus Antikörper</b>	Wirt: Pferd Spezifität für Maus	Im ABC-Kit enthalten	Vector laboratories
<b>Anti-Hase-Antikörper FITC</b>	Wirt: Ziege Spezifität für Hase	F9887	Sigma Aldrich
<b>Anti-Maus-Antikörper Cy3</b>	Wirt: Schaf Spezifität für Maus	C2181	Sigma Aldrich

**Tabelle 7: Kits**

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
<b>VECTASTAIN® ABC-Peroxidase Kits, Hase IgG</b>	PK-4001	Vector laboratories
<b>VECTASTAIN® ABC-Peroxidase Kits, Maus IgG</b>	PK-4002	Vector laboratories
<b>Vector® NovaRED Substrat Kit</b>	SK-4800	Vector laboratories

**Tabelle 8: Software**

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
<b>SPSS statistics, Version 22</b>	IBM	Statistische Auswertung
<b>Microsoft Excel 2010</b>	Microsoft Corporation	Datenverarbeitung
<b>Microsoft Word 2010</b>	© 2010 Microsoft Corporation	Erstellung der Arbeit
<b>Power Point 2010</b>	Microsoft Corporation	Erstellung von Abbildungen
<b>Citavi® 3</b>	Swiss Academic Software	Literaturverwaltung

---

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Datenerhebung und Auswahlkriterien der Patienten

In Zusammenarbeit mit dem „Gießener Tumordokumentationssystem“ (GTDS) des Institutes für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität in Gießen (JLU Gießen), konnten Patienten mit Oropharynxkarzinomen gemäß der Richtlinien der Internationalen Klassifikation onkologischer Erkrankungen, dem ICD-0 (Fritz et al., 2000) und den zugehörigen Diagnosecodes (C01, C05.1, C05.2, C09.0, C09.1, C09.9, C10.0, C10.2 sowie C10.3) zusammengetragen werden. Von Patienten mit Zustimmung und entsprechender Diagnose, im Zeitraum 01.01.2000 – 31.12.2009, wurden letztendlich 396 Patienten mit invasiven Plattenepithelkarzinomen in die Arbeit eingeschlossen. Patienten mit Carcinoma in situ und Adenokarzinomen wurden ausgeschlossen. Zu den 396 Patienten wurden von Doktoranden der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf-Halschirurgie und plastische Operationen am Universitätsklinikum in Gießen, Daten zum Tumor (Tumorgröße und Tumorstadium sowie Differenzierungsgrad (Grading)) und der Metastasierung erfasst. Wenn vorhanden, wurde das pathologische TNM-System (pTNM) verwendet, ansonsten das klinische TNM-Stadium (cTNM). Die Einteilung in TNM- und UICC Stadium erfolgte anhand der Kriterien des American Joint Committee of Cancer (AJCC) von 2002 (Greene, 2002). Es wurden des Weiteren Daten zum Alkohol- und Tabakkonsum, dem Geschlecht und Alter der Patienten, sowie der Diagnosezeitpunkt erfasst. Anhand vorhandener klinischer Daten der Patienten wurde der Leistungszustand nach ECOG (Oken et al., 1982) eingeteilt. Die Therapie wurde in kurative und palliative Therapie untergliedert. Eine alleinige Chemotherapie wurde als palliative Therapie definiert. Die kurative Therapie war untergliedert in Operation oder primäre Radiatio mit oder ohne Chemotherapie sowie Operation mit adjuvanter Radiatio mit oder ohne Chemotherapie. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Exzision von Tumorzellen infiltrierter und suspekter Halslymphknoten sowie gegebenenfalls befallener umgebender Strukturen wie Muskeln, Nerven und Blutgefäße, eine sogenannte *Neck dissection* (ND), durchgeführt wurde. Von 14 der 396 Patienten des Gesamtkollektivs mit OPSCC lag kein Tumorgewebe vor, daher konnte kein HPV-Status für diese Patienten ermittelt werden. Zu den verbliebenen 382 Patienten wurden Tumor- und Metastasenproben herausgesucht, aufgearbeitet und in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Heidelberg in der dortigen Abteilung für „Angewandte Tumorbiologie“ auf das Vorhandensein des humanen Papillomviren (HPV) untersucht. Für die Analyse des

---

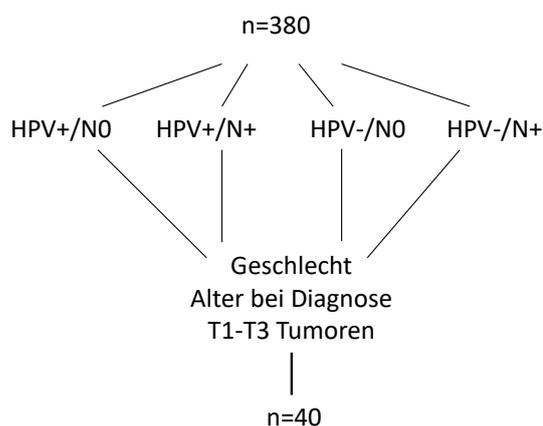
Überlebens der Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit die aktualisierten Daten von 2013 verwendet. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission an der JLU in Gießen lag vor (AZ 151/11) und (AZ 296/11).

### **2.2.2. Einteilung und Definition der Risikofaktoren**

Zur Einschätzung der Komorbidität der Patienten, wurde der ECOG – Leistungsfähigkeits-Status angewendet (Oken et al., 1982). Zur besseren statistischen Vergleichbarkeit wurden in dieser Arbeit die ECOG-Schweregrade 0-1 als moderater (besserer Leistungszustand) und 2-4 als niedriger Leistungszustand (schlechterer Leistungszustand) zusammengefasst. Da die Patienten mit OPSCC zum Diagnosezeitpunkt lebend waren, fand keine Berücksichtigung des Grad 5 statt. Eine Zusammenfassung von Stadien wurde ebenfalls für die Metastasierung in die regionären Halslymphknoten gewählt, um eine bessere statistische Auswertbarkeit zu erhalten. Hierzu wurden die Stadien N1-N3 zu N+ zusammengefasst und N0 als Stadium ohne Halslymphknotenmetastasen definiert. Als weiteres Tumorcharakteristikum wurde die Tumorausdehnung untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden das T1- und T2-Stadium (Tumor < 4 cm), sowie T3 und T4 als jeweils eine Variable betrachtet. Die Einteilung des Alkoholkonsums erfolgte nach Standardgläsern (1 Standardglas  $\hat{=}$  10g Alkohol). Die Aufnahme von  $\geq 2$  Standardgläsern Alkohol pro Tag wurde als regelmäßiger Alkoholkonsum bewertet, wohingegen die Aufnahme von weniger als 2 Standardgläsern als kein Alkoholabusus betrachtet wurde. Als Raucher wurden Personen definiert, die  $\geq 3$  Zigaretten pro Woche geraucht haben. Einige Patienten haben ausschließlich Zigarillos oder Pfeife geraucht. Dies wurde jedoch nicht gesondert betrachtet, sodass diese Patienten zusammen mit den Zigarettenrauchern als Raucher eingeteilt wurden. Als Nichtraucher wurden Patienten definiert, die nie geraucht oder zum Diagnosezeitpunkt seit mindestens 16 Jahren nicht mehr aktiv geraucht haben. Diese Einteilung erfolgte, um das Risikoprofil der ehemaligen Raucher besser an das der Nichtraucher anzupassen. 15 Jahre nach Rauchstopp entspricht das Risikoprofil auch bezüglich koronarer Herzkrankheit dem von Nichtrauchern (IARC Working Group on Reversal of Risk After Quitting Smoking ©2007) (19.10.2016. <http://www.cancer.org/healthy/stayawayfromtobacco/benefits-of- quitting-smoking-over-time>, Stand 19.10.2016). Der Tabakkonsum der Raucher wurde in Packungsjahren (packyears (py)) angegeben (Bellamy et al., 2011) und lag zwischen 0,6 – 132,0 py.

### 2.2.3. Auswahl Paarvergleichs-Kollektiv

Aus dem Gesamtkollektiv von 380 Patienten mit vorhandenem Tumorgewebe und analysiertem HPV-Status wurde für die immunhistochemischen Färbungen von Tumorgewebeschnitten mit den Antikörpern der Proteine  $\beta$ -Catenin und p120ctn ein Paarvergleichs-Kollektiv gebildet. Die Hauptkriterien für die Auswahl dieser Patienten waren der HPV-Status des Tumors (HPV-assoziiert (HPV+) oder HPV-negativ (HPV-)) sowie der Metastasenstatus der Halslymphknoten (N0 (nicht in die regionären Lymphknoten metastasiert) /N+ (in die regionären Lymphknoten metastasiert)). Es wurden nur Patienten mit T1-T3 Tumoren eingeschlossen. Die Größe der ausgewählten Gruppen orientierte sich an der kleinsten Gruppe, mit dem Ziel balancierte Gruppenstärken zu erhalten. Diese Gruppe bestand aus 10 Patienten. Um möglichst eine gleiche Verteilung des Alters wie im großen Kollektiv zu erhalten, wurde das Alter in  $< 56$  Jahre (40%) und  $\geq 56$  Jahre (60%) ausgewertet. Allerdings mussten acht Fälle aufgrund korrigierter Analyseergebnisse des HPV-Status (Testwiederholung bei uneindeutigen Proben) nachträglich ausgetauscht werden. Daher entspricht die Verteilung nicht mehr der im Gesamtkollektiv. Es wurden drei weitere Gruppen mit jeweils 10 Patienten gebildet, die in drei Kriterien gepaart wurden: Alter bei Diagnose ( $<56$  Jahre oder  $\geq 56$  Jahre), Geschlecht und Tumorgöße. Daraus ergaben sich insgesamt  $n=40$  Patienten (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Bildung des Paarvergleichs-Kollektivs aus dem Gesamtkollektiv mit analysiertem HPV-Status ( $n=380$ ). Es wurden vier Gruppen für ein Paarvergleichs-Kollektiv gebildet. Die Hälfte wies HPV-assoziierte OPSCC auf (HPV+) und die andere Hälfte HPV-negative (HPV-). Wiederum die Hälfte wies Halslymphknotenmetastasen auf (N+) und die andere Hälfte nicht (N0). Die Patienten in jeder Gruppe waren in den drei Kriterien Geschlecht, Alter bei Diagnose und Tumorausdehnung mit T1-T3 Tumoren zu den Patienten der jeweils anderen drei Gruppen gepaart.

### 2.2.4. Die Aufarbeitung und HPV-Bestimmung des Tumorgewebes

Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Probeexzisionen und operativ reseziertes Tumorgewebe aufgearbeitet. Zu den Patienten des Paarvergleichs-Kollektivs wurden die entsprechenden Tumorgewebe herausgesucht, aufgearbeitet und

Tumorschnitte angefärbt. Von den 20 metastasierten Tumoren lagen nur von insgesamt 12 Metastasen Gewebeproben vor, die gefärbt werden konnten, weil einige Patienten eine primäre Chemoradiotherapie erhielten. Zunächst wurden mit dem Mikrotom 2,5 µm dünne Tumorschnitte angefertigt und zur Entfaltung in ein Wasserbad mit 40,0° C gelegt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37,0°C im Trockenschrank getrocknet.

Der HPV-Nachweis der Tumorgewebeproben erfolgte am Universitätsklinikum Heidelberg in der Abteilung für Angewandte Tumorbiologie. Dort wurde der immunhistochemische Nachweis von p16INK4a im Tumorgewebe sowie der Nachweis und die Genotypisierung von HPV an extrahierter DNA durch eine multiplexe Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) erbracht. HPV-assoziierte Tumoren definieren sich sowohl durch die p16INK4a-Positivität in immunhistochemischen Färbungen als auch durch den Nachweis von HPV-DNA. In der Diagnostik von OPSCC wird heutzutage der standardisierte immunhistochemische Nachweis von p16INK4a zur Detektion einer onkogenen HPV-Infektion verwendet (Wittekindt et al., 2005; Hoffmann et al., 2010; Smeets et al., 2007). Einen sichereren Nachweis von HPV in Gewebeproben stellt die Kombination aus PCR und dem immunhistochemischen Nachweis von p16INK4a dar (Hoffmann et al., 2010; Smeets et al., 2007). Als HPV-assoziiert wurde die Probe definiert, bei der Hochrisiko HPV-DNA nachgewiesen wurde und zusätzlich 70% der Tumorzellen eine starke diffuse Färbung von p16INK4a im Zytoplasma und Zellkern aufwiesen, welches eine typische HPV-induzierte Transformation darstellt (Prigge et al., 2015; Reuschenbach et al., 2013; Klussmann et al., 2003:1). Diskordante Ergebnisse zwischen dem p16INK4a- und HPV-DNA-Status wurden in der vorliegenden Arbeit als unbekannt angesehen.

### **2.2.5. Immunhistochemische Färbungen**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunhistochemie (IHC) über eine indirekte Färbung durchgeführt. Hierbei wird auf den histologischen Schnitt ein spezifischer Primärantikörper gegeben, der an das zu untersuchende Antigen bindet. An den Primärantikörper bindet im Weiteren ein Sekundärantikörper, an den Biotin gekoppelt ist. Um die Färbereaktion zu ermöglichen, wird die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) angewandt. Das Glykoprotein Avidin im ABC-Mix besitzt mehrere Bindungsstellen für Biotin und kann daher mehrere Biotinmoleküle miteinander vernetzen. An das Biotin ist eine Peroxidase gekoppelt. Im Weiteren entsteht durch eine Peroxidasereaktion die Umsetzung eines löslichen Substrats zu unlöslichem Farbstoff.

---

Die spezifische Anfärbung erfolgt nur dann, wenn der Sekundärantikörper an einen Primärantikörper bindet. Zu jedem Färbedurchgang der IHC-Färbungen wird üblicherweise eine Negativkontrolle mitgefärbt, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wird, um zu überprüfen, ob sich unspezifische Strukturen anfärben, die eine Fehlerquelle für die Beurteilung darstellen können. Für die Negativkontrolle wurden in dieser Arbeit FFPE-Tumorschnitte verwendet.

### **2.2.5.1 Immunhistochemische Färbung: p120ctn**

Zunächst wurden die Tumorgewebe-Schnitte entparaffiniert und in einer Alkoholreihe mit absteigendem Alkoholgehalt rehydriert.

#### **Tabelle 9: Entparaffinierung und Rehydrierung**

2 x 10 min Roticlear  
2 x 5 min Ethanol 100%  
2 x 5 min Ethanol 96%  
1 x 5 min Ethanol 70%  
Kurz in eine Küvette mit VE-H<sub>2</sub>O

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte für 45 min in einer Küvette mit TRS bei pH=6 im Reiskocher erhitzt. Danach wurde die Küvette mit den Schnitten bei Raumtemperatur (RTP) 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in einer 1:1 Mischung aus TRS und TBST gewaschen, um den pH-Wert zu neutralisieren. Die Schnitte wurden dann drei Mal für 2 min mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und eine hydrophobe Barriere um den Tumorschnitt aufgetragen. Um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte für 20 min mit 3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 Mal für jeweils 2 min mit VE-H<sub>2</sub>O und ein Mal mit TBST-Puffer für 5 min gewaschen. Unspezifische Antigene in den Schnitten wurden für mind. 40 min mit 2% bovinem Albuminserum (BSA) verdünnt in TBST geblockt. Ein einminütiger Waschschriff mit TBST folgte. Der Primärantikörper anti-CTNND1 wurde mit 1% BSA in TBST 1:200 verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Diese wurden zunächst 30 min bei RTP in Färbekammern auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper auf den Schnitten über Nacht (ü.N.) in einer feuchten Färbekammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst für etwa 30 min auf dem Wippschüttler bei RTP bewegt, anschließend zwei Mal für 5 min in TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper

---

(anti-Hase-AK), der nach Herstellerangaben verdünnt wurde, für eine Stunde bei RTP inkubiert. Es folgte ein 5 min Waschschrift mit TBST auf dem OT und ein 5 min Waschschrift mit TBST in der Küvette. Für den Färbvorgang wurde der ABC-Mix (Hase), anhand der im Kit vorhandenen Beschreibung, hergestellt. Hierzu wurden die Substanzen A und B nach Herstellerangaben mit TBST verdünnt und vor dem Auftragen 30 min bei RTP inkubiert. Anschließend wurde der ABC-Mix auf die Tumorschnitte pipettiert und für 40 min inkubiert. Nachfolgend wurden diese 5 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde das NovaRED-Substrat aus dem Vector® NovaRED Substrat Kit, anhand der im Kit vorhandenen Beschreibung angefertigt. Die Schnitte wurden für 22 min mit NovaRED Substrat auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte zunächst ein 5 min VE-H<sub>2</sub>O-Waschschrift auf dem OT und anschließend 5 min in der Küvette. Des Weiteren wurden die Schnitte für 20 s mit der Kernfärbung Hämalaun in einer Küvette gegengefärbt und unter kaltem, fließendem Leitungswasser für 10 min gebläut. Die Tumorschnitte wurden schlussendlich in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tabelle 10), mit dem Einschlussmittel Roti®-Histokitt II luftdicht mittels Deckgläsern versiegelt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

**Tabelle 10: Dehydrierung der Tumorschnitte**

- 1 x 1 min Ethanol 70%
- 2 x 1 min Ethanol 96%
- 2 x 1 min Ethanol 100%
- 2 x 3 min Roticlear
- 1 x 5 min Xylol

**2.2.5.2 Immunhistochemische Färbung:  $\beta$ -Catenin**

Die Schritte der immunhistochemischen Färbung des  $\beta$ -Catenins entsprachen weitestgehend denen der Färbung des p120ctn (Kapitel 2.2.5.1). Allerdings unterschieden sich einige Schritte, die im Folgenden aufgeführt sind.

**Abweichung zum p120ctn IHC-Protokoll:**

Für die Blockung von unspezifischen Antigenen, wurden die Schnitte hier mit 3% BSA, in TBST für 90 min inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Objektträger für 5 min mit TBST auf dem Wippschüttler inkubiert. Der  $\beta$ -Catenin-Antikörper (Maus) wurde im Verhältnis 1:600 mit 1% BSA in TBST verdünnt. Die Schnitte wurden nach der Inkubation des Sekundärantikörpers 2 x 5 min mit TBST auf dem OT und 1 x 5 min in einer Küvette gewaschen. Nach 40-minütiger Inkubation mit dem ABC-Mix bei RTP auf

---

dem Schüttler folgten 2 x 5 min Waschvorgang mit TBST auf dem OT und 1 x 5 min in der Küvette. Das NovaRED-Substrat wurde für 14 min bei RTP auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein kurzer Waschvorgang aller OT mit VE-H<sub>2</sub>O in einer Küvette und anschließend wurde für 25 s die Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die Schnitte wurden nachfolgend für 15 min unter kaltem, fließendem Leitungswasser gebläut. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 1x10 s in Ethanol 70%, 2 x 10 s in Ethanol 96%, 2 x 10s in Ethanol 100% und schlussendlich mit 2x3 min in Roticlear und 1 x 5 min in Xylol.

### **2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der parallelen Anfärbung mehrerer spezifischer Antigene, um deren Lokalisation zueinander sichtbar machen zu können. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die Lokalisation von p120ctn und  $\beta$ -Catenin in Tumorzellen von OPSCC an ausgewählten Schnitten des Paarvergleich-Kollektivs (8 Primärtumoren, 2 Metastasen) exemplarisch darzustellen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 1,5  $\mu$ m dünne Schnitte verwendet, um Überlagerungseffekte zu vermeiden. Die Tumorschnitte wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 9). Die Schritte der Demaskierung, der Inkubation bei RTP sowie der Neutralisierung des pH-Wertes entsprachen Abschnitt 2.2.5.1. Im Anschluss wurden die Schnitte 5 min mit TBST und kurz in VE-H<sub>2</sub>O gewaschen sowie die hydrophoben Barrieren um die Schnitte herum aufgetragen. Nachfolgend wurden 2% BSA in TBST verdünnt und zur Blockierung für ca. 1 h auf die Schnitte pipettiert. Der  $\beta$ -Catenin Antikörper wurde 1:300 und der p120ctn Antikörper 1:100 mit 1% BSA in TBST verdünnt und die Schnitte mit den Primärantikörpern ü.N. bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte für 10 s mit TBST auf dem OT sowie anschließend drei Mal mit TBST für jeweils 5 min in einer Küvette gewaschen. Für  $\beta$ -Catenin wurde ein Cy3 gekoppelter anti-Maus Antikörper und für p120ctn ein FITC gekoppelter anti-Hase Antikörper als Sekundärantikörper aufgetragen und für etwa 1 h bei RTP inkubiert. Die Verdünnung für den Sekundärantikörper betrug jeweils 1:800 in 2% BSA in TBST. Es folgten drei Waschschritte für jeweils 5 min mit TBST und anschließend ein kurzer Waschschritt mit VE-H<sub>2</sub>O. Aus Roti Mount FluorCare mit DAPI und Roti Mount FluorCare ohne DAPI wurde eine 1:1 Mischung hergestellt, um eine zu starke Zellkernfärbung zu vermeiden. Nach dem Auftragen der Mischung auf die Schnitte, wurden diese mit Deckgläsern eingedeckelt und mit Klarlack seitlich abgedichtet.

### 2.2.7. Beurteilung der $\beta$ -Catenin und p120ctn Expression

Die IHC-gefärbten Tumorschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop DM2500 von Leica mit dem 10er, 20er und 40er Objektiv angeschaut und durch zwei Beobachter ausgewertet. Zum Zeitpunkt der Auswertung war der HPV-Status der Tumorprobe für den Auswerter unbekannt. Es wurde die Membranständigkeit und Lokalisation des Catenins in den Zellen beurteilt. Bei der zytoplasmatischen Lokalisation wurde unterschieden zwischen Zellen mit sowohl membranständigem als auch zytoplasmatischem Catenin (inhomogener) oder homogener Verteilung des Catenins im Zytoplasma mit fast keiner nachweisbaren Lokalisation an der Zellmembran. Die Färbeintensität des Zytoplasmas wurde semiquantitativ beurteilt und eingeteilt in keine bis geringe, geringe bis mäßige, mäßige, mäßig bis starke sowie starke Färbeintensität. Für die statistische Auswertung wurden diese als schwache (keine bis geringe, geringe bis mäßige) und starke Färbung (mäßige, mäßig bis starke und starke Färbeintensität) zusammengefasst. Für die Beurteilung der Zellkernfärbung wurde dichotom zwischen „ja“ und „nein“ unterschieden. Wurden die Zellkerne als gefärbt beurteilt, wurde zusätzlich die Häufigkeit gefärbter Zellkerne quantitativ beurteilt. Hierzu wurde unterschieden zwischen einzelnen ( $< 20\%$  der Kerne gefärbt), wenigen ( $\geq 20\% - 50\%$  der Zellkerne gefärbt) und vielen gefärbten Zellkernen ( $> 50\%$  der Zellkerne gefärbt).

### 2.3. Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten fand in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS) sowie der Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ des Institutes für Medizinische Informatik an der Justus-Liebig-Universität in Gießen statt. Gearbeitet wurde mit der 22. Version des Statistikprogrammes SPSS von IBM, sowie mit Microsoft Excel 2010 von Microsoft Corporation. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ergebnis aller Tests als statistisch signifikant gewertet falls der p-Wert  $\leq 0,05$  war.

Durch die logistische Regression wurde untersucht, ob sich in den Jahren 2000-2009 eine Erhöhung der HPV-assoziierten OPSCC an den neudiagnostizierten Oropharynxkarzinomen nachweisen ließ. Für die Auswertung von Kreuztabellen und der Analyse ob zwischen Testvariablen ein statistischer Zusammenhang besteht, wurde der Chi-Quadrat Test nach Pearson angewendet (Pearson 1900). Als Voraussetzung hierfür wurde ein Erwartungswert  $\geq 5$  für jede Zelle vorausgesetzt. Für Kreuztabellen mit geringeren Erwartungswerten und für die Auswertungen der immunhistochemischen

---

Färbungen des Paarvergleich-Kollektivs, wurde stattdessen der exakte zweiseitige Test nach Fisher zur Wahrscheinlichkeitsermittlung verwendet.

Für die Überlebensanalysen wurden der Logrank-Test und Überlebenskurven nach Kaplan-Meier angewendet (Kaplan et al. 1958). Die Überlebenszeiten wurden mit dem medianen Überleben mit einem Konfidenzintervall von 95% angegeben. Für die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC konnte der Median des Überlebens nicht immer bestimmt werden, da häufig mehr als 50% der Patienten bis zum Ende der Beobachtungszeit lebend waren. Für diese Fälle wurde der Median mit nicht definiert (n.d.) angegeben. Das Gesamtüberleben wurde ab dem Diagnosezeitpunkt analysiert. Zur bi- und multivariaten Analyse unter der Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren, wurde die Cox-Regression angewendet (Cox 1972). Durch die Hazard ratio wurde untersucht, ob sich das Sterberisiko zwischen zwei Gruppen bezüglich eines definierten Risikofaktors unterscheidet. Ein Wert von 1 bedeutet, dass es keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe für das Risiko eines Ereignisses gibt. Ein Ergebnis  $< 1$  bedeutet, dass das Risiko kleiner ist als in der Kontrollgruppe. Ist das Ergebnis größer als 1, liegt das Risiko höher als in der Kontrollgruppe.

## **2.4. Einteilung von TNM- und UICC-Stadium**

### **2.4.1. TNM-Klassifikation**

Die Einteilung von Tumoren des Oropharynx erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Tumoren werden anhand von Größe und Ausbreitung in verschiedene Stadien unterteilt. Das „T“ steht für Tumor, das „N“ für Lymphknoten und das „M“ für Metastase. Nach Diagnosestellung und Beurteilung durch weitere Diagnostik wie beispielsweise der Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MR), Szintigrafien, Auswertung von Probiopsien durch den Pathologen sowie klinischen Untersuchungen, kann in multidisziplinären Konferenzen das TNM-Stadium anhand der offiziellen Einteilung bestimmt werden. Diese Einteilung hilft bei der Entscheidung, welche Therapieform gewählt werden kann und welche Prognose der Patient hat. Die untenstehende Einteilung ist inzwischen überarbeitet worden und nicht mehr aktuell. Für die vorliegende Arbeit wurde die sechste überarbeitete TNM-Klassifikation angewandt (Patel et al., 2005; Greene, 2002). Ab dem 1. Januar 2017 gilt die achte Auflage der TNM-Klassifikation, die erstmalig HPV-positive Oropharynxkarzinome mit p16-Überexpression von den HPV-negativen Oropharynxkarzinomen differenziert. Die beiden Tumorentitäten unterscheiden sich in der aktuellen Klassifikation sowohl in der

TNM- als auch der UICC-Stadieneinteilung voneinander (Brierley et al., 2017; O'Sullivan et al., 2015).

**Tabelle 11: Sechste überarbeitete TNM-Klassifikation des OPSCC**

<b>T-Stadium</b>	<b>Definition</b>
T1	Die maximale Tumorgöße beträgt 2 cm
T2	Tumorgöße > 2 cm aber ≤ 4 cm
T3	Der Tumor ist größer als 4 cm
T4	Der Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
T4a	Infiltration des Larynx, der äußeren Zungenmuskulatur, der Lamina medialis des Proc. Pterygoideus, dem harten Gaumen oder des Unterkiefers
T4b	Infiltration des M. pterygoideus lateralis, der Lamina lateralis des Proc. pterygoideus, des lateralen Nasopharynx, der Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
<b>N-Stadium</b>	
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem Halslymphknoten auf der ipsilateralen Seite des Tumors, Größe ≤ 3 cm
N2a	Metastase(n) in einem solitären Halslymphknoten auf der Seite des Tumors. Dieser ist größer als 3 und kleiner als 6 cm
N2b	Metastasen in mehreren Halslymphknoten auf der ipsilateralen Seite des Tumors, die einzelnen befallenen Lymphknoten sind maximal 6 cm groß.
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Halslymphknoten, größte Ausdehnung maximal 6 cm.
N3	Lymphknotenmetastase größer als 6 cm in der Ausdehnung
<b>M-Stadium</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

(Patel et al., 2005; Greene, 2002)

#### **2.4.2. UICC-Stadien**

Die internationale Organisation „Union internationale contre le cancer“ (UICC) hat verschiedene TNM-Stadien zu sogenannten UICC-Stadien zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumoren anhand der sechsten überarbeiteten Version der TNM-Klassifikation in die UICC-Stadien 0 bis IVC eingeteilt (Stand 2002):

**Tabelle 12: UICC-Stadien des OPSCC, Stand 2002**

<b>UICC-Stadium</b>	<b>T-Stadium</b>	<b>N-Stadium</b>	<b>M-Stadium</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4 a	N0, N1, N2	M0
Stadium IV b	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV c	Jedes T	Jedes N	M1

(Patel et al., 2005; Greene, 2002)

Inzwischen gilt die überarbeitete achte Version der TNM-Klassifikation maligner Tumoren mit dem Veröffentlichungsjahr 2017 (Brierley et al., 2017; O'Sullivan et al., 2015).

### 3.0 Ergebnisse

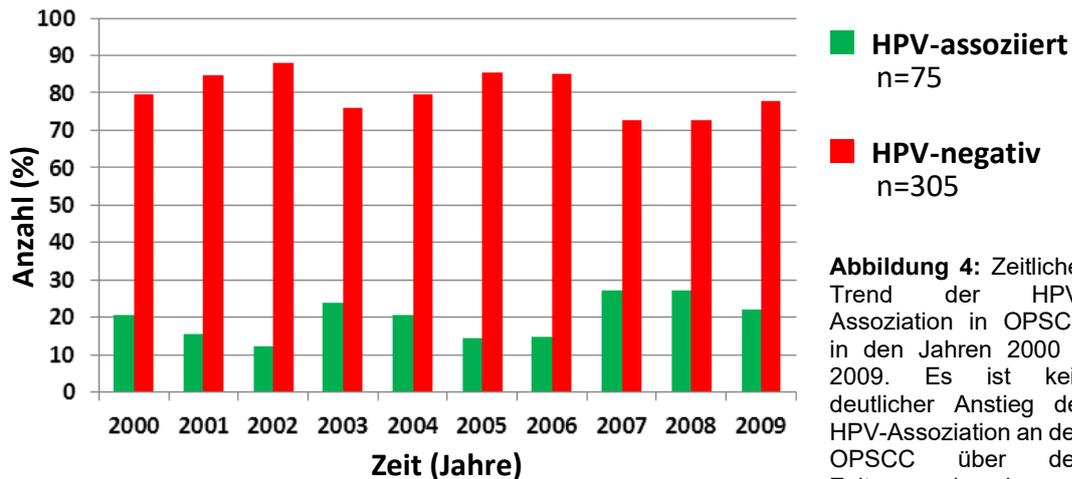
#### 3.1. Retrospektive Analyse zur HPV-Prävalenz im Zeitraum 2000-2009

Nach der HPV-DNA-Untersuchung und der p16INK4a-Immunhistochemiefärbung der OPSCC-Tumorproben, konnten 75 Tumoren als HPV-assoziiert und 305 als HPV-negativ eingeordnet werden. Es wurden insgesamt 16 Tumoren mit unklarem HPV-Status oder fehlendem Tumormaterial von der Analyse ausgeschlossen. In Tabelle 13 ist der prozentuale Anteil der HPV-Assoziation in den Jahren 2000 – 2009 dargestellt. Der jährliche Anteil HPV-assoziiierter OPSCC liegt während der Jahre 2000 – 2004 zwischen 12,1% und 24,1% (Mittelwert 18,4%). In den Jahren 2005 – 2009 sind es hingegen zwischen 14,6% – 27,3% (Mittelwert 20,9%). Es ist also eine leichte Zunahme des Anteils an HPV-assoziierten OPSCC festzustellen, die jedoch nicht signifikant ist ( $p = 0,251$ ) (Tabelle 13). Insgesamt liegt der prozentuale Anteil HPV-assoziiierter Karzinome an der Gesamtzahl der Oropharynxkarzinome im Zeitraum 2000 – 2009 bei etwa 20% und der HPV-negativer Karzinome bei etwa 80% (Abbildung 4).

**Tabelle 13: Zeitlicher Trend der HPV-Assoziation von OPSCC-Patienten in den Jahren 2000-2009**

Diagnosejahr	Gesamtzahl Patienten		Auswertbare Fälle		HPV-assoziiert			p-Wert*	HPV-negativ		
	n		n		n	%	Mittelwert (%)		n		%
2000	43		39		8	20,5		31	79,5		
2001	40		39		6	15,4		33	84,6		
2002	33	187	33	179	4	12,1	18,4	29	146	87,9	81,6
2003	31		29		7	24,1		22	75,9		
2004	40		39		8	20,5		31	79,5		
2005	42		41		6	14,6		35	85,4		
2006	49		47		7	14,9		40	85,1		
2007	45	209	44	201	12	27,3	20,9	32	159	72,7	79,1
2008	35		33		9	27,3		24	72,7		
2009	38		36		8	22,2		28	77,8		
Gesamt	396		380		75		19,7	305		80,3	

\*: p-Wert für Trendanalyse ermittelt durch logistische Regression



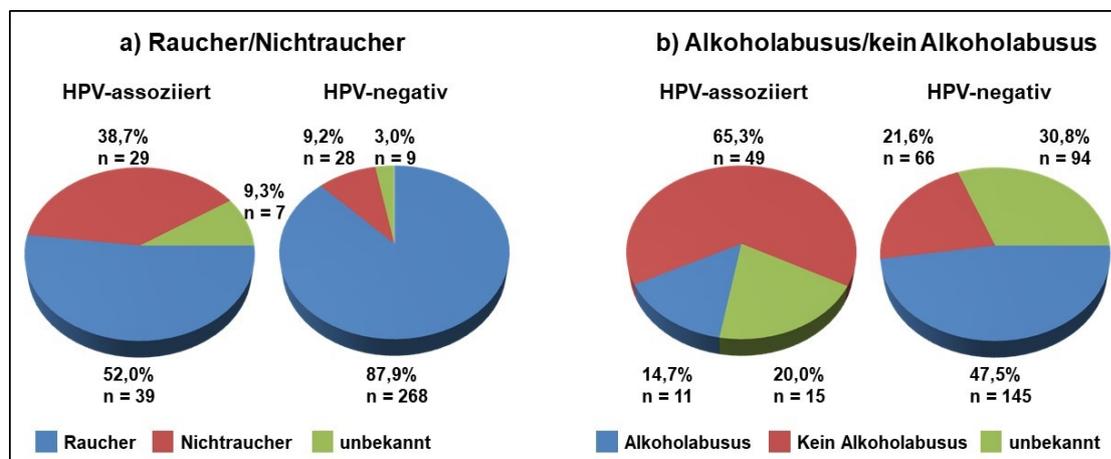
### 3.2. Verteilung von Risikofaktoren im Kollektiv

Für Patienten mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC wurden potenzielle Risikofaktoren für das Überleben analysiert. Hierzu wurden der regelmäßige Tabak- und Alkoholkonsum, der Leistungszustand nach ECOG, das Geschlecht und das Alter bei Diagnose ausgewertet (Tabelle 14). Die Analyse hat ergeben, dass Männer etwa dreimal häufiger als Frauen von OPSCC betroffen sind. Der Anteil von Frauen und Männern mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC ist in etwa gleich groß (Männer 76,0% zu 77,4% und Frauen 24,0% zu 22,6%). Zum Diagnosezeitpunkt liegt das mediane Alter aller Patienten bei 59,2 Jahren. Patienten mit HPV-assozierten Tumoren haben ein medianes Alter von 59,5 Jahren (41,7 – 88,1 Jahre) und Patienten mit HPV-negativen OPSCC von 59,0 Jahren (38,8 – 91,2 Jahre). Zum Diagnosezeitpunkt ist kein signifikanter Altersunterschied zwischen Patienten mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC festzustellen ( $p = 0,704$ ). Von den Patienten mit HPV-assozierten OPSCC haben 69,3% einen moderaten und 29,3% einen niedrigen Leistungszustand, während 63,3% der Patienten mit HPV-negativen OPSCC einen moderaten und 36,1% einen niedrigen ECOG aufweisen. Es ist kein signifikanter Unterschied des Leistungszustandes zwischen Patienten beider Tumorentitäten zu erkennen (Tabelle 14). Für die Lebensgewohnheiten zeigt sich, dass Patienten mit HPV-negativen OPSCC signifikant häufiger einen höheren Alkoholkonsum aufweisen als Patienten mit HPV-assozierten OPSCC (Tabelle 14). Patienten mit HPV-assozierten OPSCC sind gleichsam signifikant häufiger Nichtraucher. 38,7% der Patienten mit HPV-assozierten Tumoren und 9,2% der Patienten mit HPV-negativen Tumoren sind Nichtraucher (Abbildung 5).

**Tabelle 14: Analyse patientenbezogener Risikofaktoren in Relation zum HPV-Status des OPSCC**

	alle Patienten (n=396)		HPV-assoziiert (n=75)		HPV-negativ (n=305)		p-Wert*
	n	%	n	%	n	%	
<b>Geschlecht</b>							
Männlich	306	77,3	57	76,0	236	77,4	0,799
Weiblich	90	22,7	18	24,0	69	22,6	
<b>Alter</b>							
Jung (<60 Jahre)	210	53,0	38	50,7	162	53,1	0,704
Alt (≥60 Jahre)	186	47,0	37	49,3	143	46,9	
<b>Leistungszustand (ECOG)</b>							
Moderat [0-1]	252	63,6	52	69,3	193	63,3	0,288
Niedrig [2-4]	141	35,6	22	29,3	110	36,1	
Unbekannt	3	0,8	1	1,3	2	0,7	
<b>Alkoholkonsum (1 Standardglas = 10g Alkohol)</b>							
≥2 Standardgläser	161	40,7	11	14,7	145	47,5	<b>≤ 0,001</b>
<2 Standardgläser	123	31,1	49	65,3	66	21,6	
Unbekannt	112	28,3	15	20,0	94	30,8	
<b>Tabakkonsum</b>							
Raucher (≥ 3 Zigaretten/Woche)	319	80,6	39	52,0	268	87,9	<b>≤ 0,001</b>
Nichtraucher	60	15,2	29	38,7	28	9,2	
Unbekannt	17	4,3	7	9,3	9	3,0	

\*:p-Werte ermittelt über Pearson Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ )  
Signifikante p-Werte sind fett geschrieben.



**Abbildung 5:** Darstellung der prozentualen Verteilung von den Risikofaktoren Rauchen (a) und Alkoholabusus (b) von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC. Der prozentuale Anteil der Raucher (a) und Patienten mit anamnestischen Alkoholabusus (b) ist höher bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC als bei den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren.

### 3.3. Analyse von Tumorlokalisierung und Tumorstadium

Die anatomischen Begrenzungen des Oropharynx sind die Vorderwand, die Hinterwand, das Oropharynxdach und die Seitenwand (s. Kapitel 1.6).

Oropharynxkarzinome in den Tonsillen, die zur Seitenwand zählen, sind signifikant häufiger HPV-assoziierte als HPV-negative Tumoren (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Die Verteilung des HPV-Status auf unterschiedliche Lokalisationen, das Tumorstadium und den Metastasenstatus**

	Alle Patienten (n=396)		HPV-assoziiert (n=75)		HPV-negativ (n=305)		p-Wert*	
	n	%	n	%	n	%		
<b>Lokalisation</b>								
Vorderwand	137	34,6	19	25,3	111	36,4	<b>0,002</b>	
Hinterwand	12	3,0	0	0,0	11	3,6		
Dach	58	14,6	6	8,0	52	17,0		
Seitenwand	189	47,7	50	66,7	131	43,0		
<b>Seitenwand</b>								
Tonsille	95	59,0	40	87,0	49	45,4	<b>≤ 0,001</b>	
Fossa tonsillaris	45	28,0	5	10,9	39	36,1		
Gaumenbögen	21	13,0	1	2,2	20	18,5		
unbekannt	28		4		23			
<b>Tumorausdehnung</b>								
T1-2	187	47,9	51	68,9	132	43,9	<b>≤ 0,001</b>	
T3-T4a/b	203	52,1	23	31,1	169	56,1		
unbekannt	6		1		4			
<b>N-Kategorie</b>								
N0	103	26,7	11	14,9	88	29,6	<b>0,010</b>	
N+	283	73,3	63	85,1	209	70,4		
unbekannt	10		1		8			
<b>M-Kategorie</b>								
M0	341	92,9	61	89,7	268	94,0	0,203	
M1	26	7,1	7	10,3	17	6,0		
unbekannt	29		7		20			
<b>UICC-Stadien</b>								
I	nicht metastasiert	40	10,2	4	5,4	36	11,9	<b>0,011</b>
II	metastasiert	34	8,7	5	6,8	27	8,9	
III		56	14,3	18	24,3	36	11,9	
IVa	lokal	177	45,2	35	47,3	135	44,6	
IVb	metastasiert	59	15,1	5	6,8	52	17,2	
IVc		26	6,6	7	9,5	17	5,6	
unbekannt		4		1		2		

\*:p-Wert ermittelt durch Pearson Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ )

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben

Die Prozentwerte sind nur für die auswertbaren Fälle erfasst

Nur die auswertbaren Fälle (ohne Unbekannte) sind im Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ ) berücksichtigt

Die HPV-assoziierten OPSCC sind außerdem signifikant häufiger kleinere Tumoren (T1-/T2-Stadium) als die HPV-negativen OPSCC ( $p \leq 0,001$ ). Die Untersuchung der Tumorstadien lässt erkennen, dass die meisten Tumoren ein UICC-Stadium IVa aufweisen. Es bestehen dennoch signifikante Unterschiede zwischen den HPV-assoziierten und den HPV-negativen OPSCC in Bezug auf die Verteilung auf die UICC-Stadien. Die HPV-assoziierten OPSCC sind in den Stadien I und II unterrepräsentiert und finden sich häufiger im UICC Stadium III. Analog hierzu finden sich regionale

Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger bei HPV-assoziierten als bei HPV-negativen OPSCC.

### 3.4. Analyse der Therapie von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC

Von den 380 Patienten mit bekanntem HPV-Status haben 19 (5,2%) eine palliative Behandlung erhalten, wohingegen 347 (94,8%) in kurativer Absicht behandelt wurden (Tabelle 16). Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC wurden signifikant häufiger in kurativer Intention behandelt als Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Insgesamt erhielten 198 Patienten eine Tumorexstirpation. Ein operativer Eingriff als alleinige Therapie wurde an 47 lokal begrenzten Tumoren durchgeführt. 144 Patienten erhielten eine Operation mit adjuvanter Therapie. 66,2% der HPV-assoziierten Tumoren und 54,6% der HPV-negativen Tumoren wurden operiert (Tabelle 16).

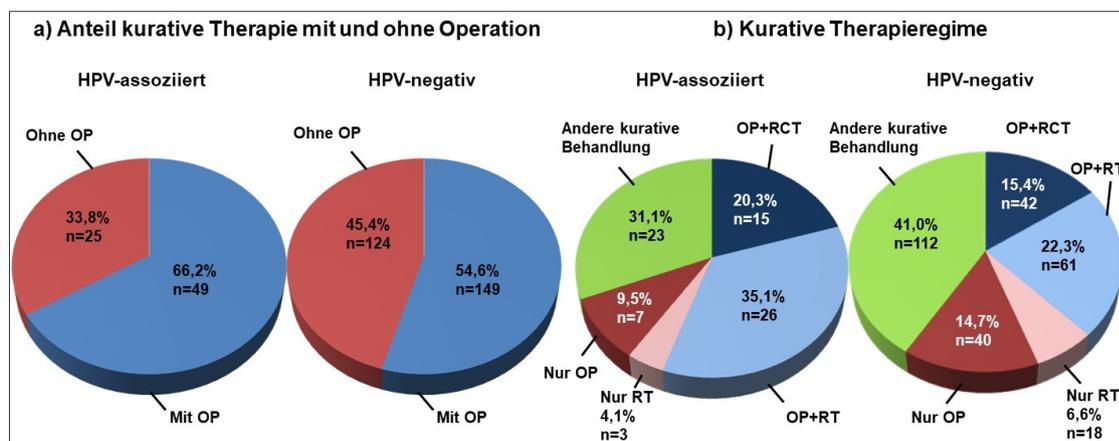
**Tabelle 16: Analyse angewandter Therapiemodalitäten in beiden Tumorentitäten**

Therapie	Untersuchte Patienten (n=380)		HPV-assoziiert (n=75)		HPV-negativ (n=305)		p-Wert *
	n	%	n	%	n	%	
<b>Nicht kurativ</b>	19	5,2	0	0,0	19	6,5	<b>0,018</b>
Kurativ	347	94,8	74	100,0	273	93,5	
Unbekannt	14		1		13		
<b>Kurativ ohne Chirurgie</b>	149	42,9	25	33,8	124	45,4	0,085
<b>Kurativ mit Chirurgie</b>	198	57,1	49	66,2	149	54,6	
<b>Kurativ, nur Chirurgie</b>	47	24,6	7	14,6	40	28,0	0,081
<b>Kurativ, Chirurgie + RT/RCT</b>	144	75,4	41	85,4	103	72,0	
Anderes kuratives Behandlungsregime	156		26		130		
<b>Monomodale kurative Therapie</b>	68	20,1	10	13,9	58	21,7	0,184
<b>Multimodale kurative Therapie</b>	271	79,9	62	86,1	209	78,3	
Unbekannt	8		2		6		

RT: Radiotherapie; RCT: Radiochemotherapie; \*p-Werte ermittelt durch exakten Chi-Quadrat Test ( $\chi^2$ ) nach Fisher  
Der p-Wert bezieht sich auf den Vergleich zwischen Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen Tumoren  
Signifikante p-Werte sind fett geschrieben.

Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren haben häufiger eine Operation erhalten als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (Abbildung 6a). Es besteht jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der durchgeführten kurativen Therapie mit oder ohne Operation. Es besteht des Weiteren kein Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der Wahl einer multi- oder monomodalen Behandlung. Nach chirurgischer Intervention schloss sich bei 85,4% der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren und 72,0% der Patienten mit HPV-negativen

Tumoren eine adjuvante Behandlung mit Radiochemotherapie oder ausschließlich Bestrahlung an. Insgesamt ist der Anteil der adjuvanten Behandlungen bei Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren etwas höher als bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Abbildung 6b).

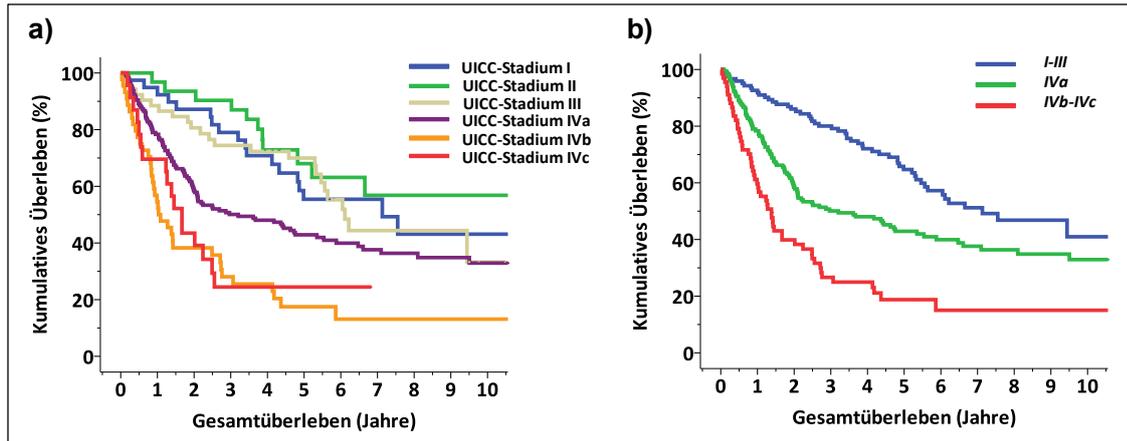


**Abbildung 6:** Prozentuale Verteilung kurativer Therapieformen von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC. Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC haben sowohl häufiger eine kurative Therapie mit Operation (a) sowie eine multimodale kurative Therapie (b) erhalten als Patienten mit HPV-negativen OPSCC.

OP: Operation; RCT: Radiochemotherapie; RT: Radiotherapie

### 3.5. Univariate Analyse des Gesamtüberlebens

Die univariate Analyse des Gesamtüberlebens von kurativ behandelten Patienten hat signifikante Überlebensunterschiede zwischen den UICC-Tumorstadien ergeben (Abbildung 7a). Das schlechteste Überleben haben Patienten mit Tumoren im UICC-Stadium IVb und IVc (Abbildung 7a und 7b). Abbildung 7a zeigt, dass Patienten mit Tumoren mit niedrigerem UICC-Stadium ein besseres Überleben aufweisen im Vergleich zu solchen mit Tumoren mit höherem UICC-Stadium. In Tabelle 17a sind die Unterschiede (p-Werte, ermittelt über den Logrank-Test) zwischen den einzelnen UICC-Stadien dargestellt. Es bestehen keine signifikanten Überlebensunterschiede zwischen Patienten mit Tumoren im UICC-Stadium I und II oder III. Patienten im Stadium I, II und III unterscheiden sich im Überleben jedoch jeweils signifikant von Stadium IVa. Tumorpatienten im Stadium IVa unterscheiden sich ebenfalls signifikant im Überleben von Patienten mit UICC-Stadium IVb und IVc. Das Überleben von Patienten mit UICC-Stadium IVb und IVc unterscheidet sich hingegen nicht signifikant voneinander (Tabelle 17a). Daher konnten 3 Patientengruppen zusammengefasst werden, die sich im Überleben signifikant voneinander unterscheiden: Stadium I-III, Stadium IVa, Stadium IVb und IVc (Abbildung 7b und Tabelle 17b).



**Abbildung 7:** Überlebensunterschiede zwischen kurativ behandelten Patienten anhand des UICC-Stadiums. Patienten im UICC-Stadium I-III unterscheiden sich nicht signifikant voneinander im Überleben. Es bestehen signifikante Überlebensunterschiede zwischen Patienten mit OPSCC im Stadium I-III und IVa sowie IVa und den Stadien IVb und IVc (a). Patienten mit OPSCC in den UICC-Stadien IVb und IVc unterscheiden sich bezüglich des Überlebens nicht signifikant voneinander (Tabelle 17a). Es ließen sich daher drei UICC-Gruppen zusammenfassen, die sich im Überleben signifikant voneinander unterscheiden (b). Signifikante Überlebensunterschiede ( $p \leq 0,001$ ) bestehen zwischen UICC-Stadium I-III ( $n=122$ ) und Stadium IVa ( $n=157$ ), sowie zwischen Stadium IVa und Stadium IVb und IVc ( $n=67$ ) (Tabelle 17b)

**Tabelle 17: Vergleich des Überlebens der UICC-Stadien von kurativ behandelten Patienten (n=346)**

UICC-Stadien	a)						b)	
	I n = 39	II n = 31	III n = 52	IVa n = 157	IVb n = 44	IVc n = 23		p-Wert
I		0,412	0,891	<b>0,040</b>	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	Stadium I-III vs. IV a	$\leq 0,001$
II	0,412		0,348	<b>0,007</b>	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	Stadium IVa vs. IVb-IVc	$\leq 0,001$
III	0,891	0,348		<b>0,043</b>	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	Stadium I-III vs. IVb-IVc	$\leq 0,001$
IVa	<b>0,040</b>	<b>0,007</b>	<b>0,043</b>		$\leq 0,001$	<b>0,042</b>		
IVb	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$		0,575		
IVc	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	<b>0,042</b>	0,575			

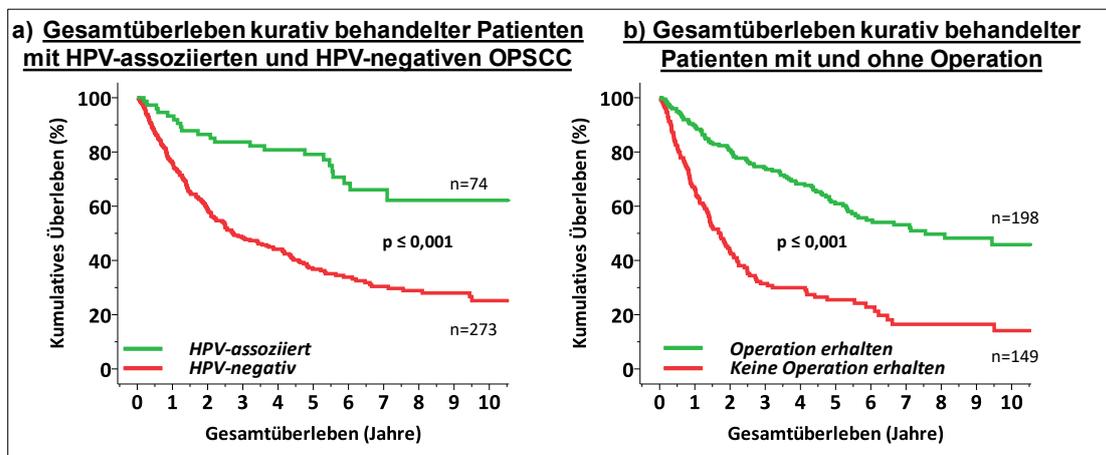
Alle angegebenen p-Werte wurden über den Logrank-Test ermittelt

Signifikante Überlebensunterschiede zwischen den UICC-Stadien ( $p \leq 0,05$ ) sind fett geschrieben

### 3.6. Gesamtüberleben kurativ behandelter Patienten mit OPSCC

Das mediane Gesamtüberleben von Patienten mit erhobenem HPV-Status, die in kurativer Intention behandelt wurden, beträgt 4,36 Jahre und die 5-Jahres Überlebensrate (5-JÜR) 45,9 % (Tabelle 18). Die 5-JÜR von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC beträgt 79,1% und von Patienten mit HPV-negativen Tumoren 36,8%. Das relative Sterberisiko von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt 68,6% unter dem der Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Das mediane Überleben liegt bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC bei 2,73 Jahren und kann für die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC nicht angegeben werden, da bis zum Ende der Beobachtungszeit weniger als 50% dieser Patienten verstarben. Tabelle 18 und Abbildung 8a lassen erkennen, dass kurativ behandelte Patienten mit HPV-assoziierten

Tumoren ein signifikant besseres Überleben aufweisen als Patienten mit HPV-negativen Tumoren.



**Abbildung 8:** Gesamtüberleben kurativ behandelter Patienten mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC (a). Patienten mit HPV-assozierten OPSCC zeigen ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit HPV-negativen OPSCC ( $p \leq 0,001$ ). Das Gesamtüberleben kurativ behandelter Patienten mit Operation ( $n=198$ ) ist signifikant besser als das von Patienten mit kurativer Therapie ohne operativen Eingriff ( $n=149$ ) (b).

\* $p$ = analysiert durch den Logrank-Test

Signifikante Überlebensunterschiede bestehen auch zwischen jüngeren und älteren Patienten und Patienten mit unterschiedlichen Leistungszuständen (ECOG-Stadien). Das mediane Überleben von Patienten mit besserem Leistungszustand beträgt 5,88 Jahre im Vergleich zu niedrigem Leistungszustand mit 1,42 Jahre. Das relative Sterberisiko liegt in der Gruppe mit niedrigerem Leistungszustand rund 2,6-fach höher als bei Patienten mit besserem Leistungszustand. Tabelle 18 zeigt, dass sich das Überleben zwischen Patienten mit und ohne Operation signifikant voneinander unterscheidet. Die Überlebensrate ohne chirurgischen Eingriff liegt nach 5 Jahren bei 25,5% und bei Patienten mit operativer Tumorexstirpation bei 60,9% (Abbildung 8b). Operierte Patienten weisen ein etwa 66% geringeres Sterberisiko auf als Patienten ohne Operation. Patienten, die eine chirurgische Entfernung der metastasierten Halslymphknoten und von Tumorzellen infiltriertem Gewebe (*neck dissection*, ND) erhalten haben, haben ein signifikant besseres Überleben verglichen mit Patienten, die keine ND erhalten haben (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Überleben von kurativ behandelten Patienten mit OPSCC (n=347)  
in Abhängigkeit von Risikofaktoren**

	n	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-JÜR (%)	p-Wert **	HR $\alpha$	(95% KI)
<b>Kurativ behandelte Patienten</b>	347	4,36	45,9			
<b>HPV</b>						
HPV-negativ	273	2,73	36,8	<b>≤ 0,001</b>	1 0,314	(0,201 - 0,489)
HPV-assoziiert	74	n.d.*	79,1			
<b>Alter</b>						
jung (<60)	185	5,88	53,1	<b>≤ 0,001</b>	1 1,631	(1,237 - 2,150)
alt (≥ 60)	162	2,49	37,8			
<b>Leistungszustand</b>						
(ECOG 0-1)	235	5,88	55,8	<b>≤ 0,001</b>	1 2,551	(1,919 - 3,392)
(ECOG 2-4)	110	1,42	24,6			
<b>Kurative Therapie</b>						
Ohne Operation	149	1,73	25,5	<b>≤ 0,001</b>	1 0,340	(0,256 - 0,451)
Mit Operation	198	7,55	60,9			
Ohne Neck dissection	161	1,98	31,1	<b>≤ 0,001</b>	1 0,445	(0,336 - 0,589)
Mit Neck dissection	184	7,10	59,3			
<b>UICC-Stadien</b>						
Stadium I-III	122	7,13	64,7	I-III vs. IVa <b>≤ 0,001</b>	1 1,784	(1,274 - 2,497)
Stadium IVa	157	3,21	42,9	IVa vs. IVb- IVc <b>≤ 0,001</b>	1 1,927	(1,372 - 2,706)
Stadium IVb-IVc	67	1,38	18,8	I-III vs. IVb- IVc <b>≤ 0,001</b>	1 1,966	(1,615 - 2,393)

\*Mediane Überlebenszeit (Jahre) nach Kaplan-Meier

\*\*p-Werte ermittelt durch Logrank-Test; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

$\alpha$  HR: Hazard ratio, relatives Sterberisiko

5JÜR: 5-Jahres-Überlebensrate

95% KI: 95%-Konfidenzintervall

\*n.d.: nicht definiert. Nach Ende der beobachteten Zeit leben noch mehr als 50% der untersuchten Patienten

Da die operierten Patienten ein signifikant besseres Überleben aufweisen als die nicht operierten Patienten wurden eventuelle Unterschiede zwischen beiden Gruppen analysiert (Tabelle 19). Jüngere Patienten und Patienten mit besserem Leistungszustand wurden signifikant häufiger operiert als Patienten in höherem Alter oder mit schlechterem Leistungszustand. Eine Operation wurde seltener an größeren Tumoren durchgeführt. Zwischen den Tumorausdehnungen T1 und T2 ist ein Trend erkennbar, dass Patienten mit T1-Tumoren häufiger operiert wurden als Patienten mit

T2-Tumoren ( $p = 0,086$ ). Für Patienten mit OPSCC und UICC-Stadium IVb und IVc wurde die Operation signifikant seltener gewählt als für niedrigere UICC-Stadien (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Analyse der Eigenschaften von Patienten mit Tumorexstirpation oder Neck dissection**

	Mit Operation		Ohne Operation		p-Wert*	Mit ND**		Ohne ND**		p-Wert*
	n	%	n	%		n	%	n	%	
<b>Alter</b>										
jung	116	62,7	69	37,3	<b>0,023</b>	111	60,3	73	39,7	<b>0,005</b>
alt	82	50,6	80	49,4		73	45,3	88	54,7	
<b>Geschlecht</b>										
weiblich	46	59,0	32	41,0	0,698	41	53,9	35	46,1	0,903
männlich	152	56,5	117	43,5		143	53,2	126	46,8	
<b>ECOG</b>										
ECOG 0-1	156	66,4	79	33,6	<b>≤ 0,001</b>	143	61,1	91	38,9	<b>≤ 0,001</b>
ECOG 2-4	40	36,4	70	63,6		39	35,8	70	64,2	
<b>HPV-Status</b>										
HPV+	49	66,2	25	33,8	0,073	48	65,8	25	34,2	<b>0,017</b>
HPV-	149	54,6	124	45,4		136	50,0	136	50,0	
<b>Alkoholkonsum***</b>										
ja	79	56,0	62	44,0	0,086	77	54,6	64	45,4	0,629
nein	74	66,7	37	33,3		64	57,7	47	42,3	
<b>Tabakkonsum***</b>										
ja	157	56,3	122	43,7	0,222	149	53,8	128	46,2	0,994
nein	34	65,4	18	34,6		28	53,8	24	46,2	
<b>T-Stadium</b>										
T1	71	91,0	7	9,0	0,086	52	66,7	26	33,3	<b>0,032</b>
T2	82	82,0	18	18,0		80	80,8	19	19,2	
T3	35	43,8	45	56,2	<b>≤ 0,001</b>	38	47,5	42	52,5	<b>≤ 0,001</b>
T4	10	11,5	77	88,5		14	16,3	72	83,7	
	T1 vs. T3				<b>≤ 0,001</b>	T1 vs. T3				<b>0,015</b>
	T1 vs. T4				<b>≤ 0,001</b>	T1 vs. T4				<b>≤ 0,001</b>
	T2 vs. T4				<b>≤ 0,001</b>	T2 vs. T4				<b>≤ 0,001</b>
<b>UICC-Stadium</b>										
UICC I-III	108	88,5	14	11,5	<b>≤ 0,001</b>	79	65,3	42	34,7	0,199
UICC IVa	80	51,0	77	49,0		90	57,7	66	42,3	
UICC IVb-IVc	10	14,9	57	85,1	<b>≤ 0,001</b>	15	22,4	52	77,6	<b>≤ 0,001</b>

\*p-Wert ermittelt durch Pearson Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ )

ND: Neck dissection

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben

Alkoholkonsum: ja  $\geq 2$  Standardgläser/Tag; nein  $< 2$  Standardgläser/Tag; (1 Standardglas  $\cong 10g$  Alkohol)

Tabakkonsum: ja ( $\geq 3$  Zigaretten/ Woche)

Es wurde analysiert, ob eine Operation häufiger gewählt wurde in Bezug zu den individuellen Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum sowie HPV-Status. Die Untersuchung hat ergeben, dass eine Operation unabhängig von diesen Faktoren durchgeführt wurde. Es ist jedoch erkennbar, dass Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren und Patienten ohne regelmäßigen Alkoholkonsum geringfügig häufiger operiert wurden als Patienten mit HPV-negativen OPSCC beziehungsweise mit regelmäßigem Alkoholkonsum (Tabelle 19). Eine Neck dissection (ND) haben vor allem jüngere Patienten und Patienten mit einem besseren Leistungszustand erhalten. Darüber hinaus haben Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren in höherem Maß eine ND erhalten als Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Tabelle 19). Patienten mit

Tumoren im T2-Stadium haben häufiger eine *Neck dissection* erhalten als Patienten mit Tumoren im T1-Stadium ( $p = 0,032$ ) (Tabelle 19).

### **3.7. Analyse des Gesamtüberlebens von kurativ behandelten Patienten mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC**

Für die Patienten mit HPV-assozierten Tumoren ergab sich ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit jüngerem Alter zum Diagnosezeitpunkt, einem besseren Leistungszustand und für Patienten, die operiert worden sind (Tabelle 20). Als keine signifikanten Faktoren für ein besseres Überleben wurden das Geschlecht ( $p=0,640$ ), der Tabakkonsum ( $p=0,881$ ) sowie der Alkoholkonsum ( $p=0,368$ ) ermittelt. Für Patienten mit HPV-negativen OPSCC wurden ein jüngerer Alter bei Diagnosestellung, ein besserer Leistungszustand, die Wahl der operativen Therapie und zusätzlich das Tumorstadium als signifikante Faktoren für ein besseres Überleben ermittelt (Tabelle 22). Die Untersuchung des Tabakkonsums ( $p=0,548$ ) und des Alkoholkonsums ( $p=0,203$ ) sowie des Geschlechts ( $p=0,632$ ) wurden als nicht signifikante Faktoren für das Gesamtüberleben ermittelt.

Patienten  $\geq 60$  Jahre zum Diagnosezeitpunkt mit HPV-assozierten Tumoren weisen ein etwa 3,2-fach höheres relatives Sterberisiko auf als junge Patienten ( $< 60$  Jahre). Bei den älteren Patienten mit HPV-negativen Tumoren liegt das relative Sterberisiko um etwa 1,6-fach höher. Die Analyse des Leistungszustandes nach ECOG zeigt für beide Patientengruppen, dass das relative Sterberisiko mit einem schlechteren Leistungszustand rund 3-fach höher liegt als mit einem besseren (Tabelle 20). Die Analyse der Therapie hat ergeben, dass sowohl eine Operation mit Tumorexstirpation als auch eine Operation mit ND signifikant mit einem besseren Überleben der untersuchten Patienten mit HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC einhergehen. Das relative Sterberisiko liegt nach einem solchen Eingriff signifikant niedriger als ohne (Tabelle 20). Die 5-JÜR für operierte Patienten mit HPV-assozierten Tumoren ermittelt sich zu 93,8% im Vergleich zu nicht Operierten mit 46,5% (Tabelle 20). Patienten mit HPV-negativen OPSCC weisen eine 5-JÜR von rund 21,4% ohne und 49,4% mit Operation auf und das relative Sterberisiko für Patienten mit Operation errechnet sich zu rund 60,3% niedriger als ohne Operation.

Das UICC-Stadium stellt vor allem bei den HPV-negativen Tumoren einen wichtigen Einflussfaktor für das Überleben dar. Es bestehen signifikante Überlebensunterschiede zwischen UICC-Stadium I-III und IVa, zwischen Stadium IVa und IVb-IVc sowie zwischen Stadium I-III und IVb-IVc (Tabelle 20). Für Patienten mit HPV-assozierten

OPSCC bestehen signifikante Überlebensunterschiede zwischen dem Stadium I-III und IVb-IVc, nicht jedoch zwischen UICC-Stadium I-III und UICC-Stadium IVa oder UICC-Stadium IVa und UICC-Stadium IVb-IVc (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Analyse verschiedener Risikofaktoren für das Überleben kurativ behandelter Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC**

	HPV-assoziierte OPSCC (n=74)					HPV-negativen OPSCC (n=273)				
	n	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-JÜR (%)	p-Wert **	HR $\kappa$ (95% KI)	n	Mediane Überlebenszeit (Jahre)	5-JÜR (%)	p-Wert **	HR $\kappa$ (95% KI)
<b>Alter</b>										
jung (<60)	38	n.d.*	94,6	<b>0,010</b>	1 3,211 (1,255 - 8,220)	147	4,12	42,3	<b>0,003</b>	1 1,564 (1,166 - 2,097)
alt ( $\geq$ 60)	36	7,10	62,8			126	2,01	30,4		
<b>Leistungszustand</b>										
(ECOG 0-1)	51	n.d.*	90,0	<b>0,004</b>	1 3,327 (1,403 - 7,889)	184	4,63	45,9	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 2,560 (1,891 - 3,465)
(ECOG 2-4)	22	n.d.*	50,6			88	1,21	18,3		
<b>Kurative Therapie</b>										
Ohne Operation	25	4,76	46,5	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 0,161 (0,066 - 0,395)	124	1,45	21,4	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 0,397 (0,295-0,534)
Mit Operation	49	n.d.*	93,8			149	4,98	49,4		
Ohne Neck dissection	25	6,05	55,5	<b>0,002</b>	1 0,278 (0,117 - 0,664)	136	1,83	26,7	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 0,523 (0,389 - 0,704)
Mit Neck dissection	48	n.d.*	93,6			136	4,63	47,0		
<b>UICC-Stadien</b>										
Stadium I-III	26	n.d.*	96,2	I-III vs. IVa 0,288	1 1,763 (0,611-5,085)	96	6,11	56,1	I-III vs. IVa <b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 1,909 (1,337 - 2,726)
Stadium IVa	35	n.d.*	76,4	IVa vs. IVb-IVc 0,236	1 1,883 (0,651-5,447)	122	1,99	33,2	IVa vs. IVb-IVc <b>0,001</b>	1 1,855 (1,294 - 2,661)
Stadium IVb-IVc	12	n.d.*	58,3	I-III vs. IVb-IVc <b>0,048</b>	1 1,820 (0,972-3,407)	55	1,28	10,1	I-III vs. IVb-IVc <b><math>\leq</math> 0,001</b>	1 2,094 (1,692 - 2,592)

\*Mediane Überlebenszeit (Jahre) nach Kaplan-Meier

\*\*p-Werte ermittelt durch Logrank-Test; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

$\kappa$  HR: Hazard ratio, relatives Sterberisiko

5JÜR: 5-Jahres-Überlebensrate

95% KI: 95%-Konfidenzintervall

\*n.d.: nicht definiert, weil auch nach Ende der beobachteten Zeit noch mehr als 50% der untersuchten Patienten leben

### 3.8. Multivariate Analyse des Überlebens

Die Auswertungen des Gesamtüberlebens in den univariaten Analysen haben signifikant bessere Überlebensraten der operierten Patienten ergeben (Kapitel 3.6.). Es wurde daher für kurativ behandelte Patienten eine bivariate und eine multivariate Analyse durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine Operation, unter Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren, einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben darstellt. Die bivariate Analyse durch Cox-Regression zum prognostischen Wert der Operation inkludierte die Variablen kurative Therapie mit/ohne Operation und den HPV-Status des Tumors (Tabelle 21a). Die Analyse der Interaktion zwischen dem HPV-Status des OPSCC und der kurativen Therapie mit/ohne Operation hat keine Signifikanz ( $p=0,133$ ) ergeben und wurde daher nicht in die bivariate Analyse eingeschlossen. Die Untersuchung hat ergeben, dass unabhängig vom HPV-Status das Gesamtüberleben von Patienten inklusive einer operativen Therapie signifikant besser ist als von Patienten

ohne operativen Eingriff (Tabelle 21a). Dabei liegt das relative Risiko zu sterben unter Berücksichtigung des HPV-Status bei den operierten Patienten im Vergleich zu den nicht operierten Patienten bei 36,6% (Tabelle 21b).

**Tabelle 21: Bivariate Analyse zum Überleben von Patienten mit kurativer Therapie mit/ohne Operation unter Berücksichtigung des HPV-Status**

a)

n=347	HR**	95% KI	p-Wert*
<b>Kurative Therapie</b>			
Ohne Operation	1		
Mit Operation	0,394	(0,293 - 0,531)	≤ <b>0,001</b>
<b>HPV-Status des Tumors</b>			
HPV-negativ	1		
HPV assoziiert	0,487	(0,273 - 0,869)	<b>0,015</b>
<b>Interaktionsterm kurative Therapie mit Operation x HPV-Status</b>			
Nein	1		
Ja	0,502	(0,204 - 1,235)	0,133

\*:p-Werte ermittelt durch Cox-Regression; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

\*\* : HR=Hazard ratio, relatives Sterberisiko

KI: Konfidenzintervall

b)

n=347	HR**	95% KI	p-Wert*
<b>Kurative Therapie</b>			
Ohne Operation	1		
Mit Operation	0,366	(0,276 - 0,485)	≤ <b>0,001</b>
<b>HPV-Status des Tumors</b>			
HPV-negativ	1		
HPV assoziiert	0,350	(0,224 - 0,547)	≤ <b>0,001</b>

\*:p-Werte ermittelt durch Cox-Regression; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

\*\* : HR=Hazard ratio, relatives Sterberisiko

KI: Konfidenzintervall

Für die multivariate Analyse wurden zunächst die Variablen HPV-Status, Leistungszustand und UICC-Stadien in die Analyse einbezogen. Die Interaktionen zwischen kurativer Therapie mit/ohne Operation und die jeweils anderen möglichen Einflussvariablen ergaben keine signifikanten Interaktionen (Tabelle 22a) und wurden nicht in die multivariate Cox-Regressionsanalyse inkludiert (Tabelle 22b). Die multivariate Analyse hat ergeben, dass sich unabhängig vom HPV-Status, UICC-Stadium des Tumors und dem Leistungszustand des Patienten die Operation positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirkt. Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren liegt das relative Sterberisiko um 43,7% niedriger bei Patienten mit Operation verglichen mit nicht operierten Patienten (Tabelle 22b).

**Tabelle 22: Multivariate Analyse zum Überleben kurativ behandelter Patienten in Abhängigkeit von weiteren Einflussfaktoren (HPV-Status, Tumorstadium, Leistungszustand)**

a)

n=347	HR**	95% KI	p-Wert*
<b>Kurative Therapie</b>			
Ohne Operation	1		
Mit Operation	0,716	(0,277 - 1,853)	0,491
<b>HPV-Status des Tumors</b>			
HPV-negativ	1		
HPV assoziiert	0,427	(0,233 - 0,782)	<b>0,006</b>
<b>UICC-Tumorstadien</b>			
Stadium I-III	1		
Stadium IVa	1,534	1	<b>0,006</b>
Stadium IVb-IVc	1,534	(1,132 - 2,079)	
<b>Leistungszustand</b>			
ECOG 0-1	1		
ECOG 2-4	1,923	(1,318 - 2,804)	<b>0,001</b>
<b>Interaktionsterm kurative Therapie mit Operation x HPV-Status</b>			
Ja	0,528		
Nein	1	(0,209 - 1,335)	0,177
<b>Interaktionsterm kurative Therapie mit Operation x UICC-Tumorstadien</b>			
Ja	0,888		
Nein	1	(0,553 - 1,426)	0,623
<b>Interaktionsterm kurative Therapie mit Operation x Leistungszustand</b>			
Ja	1		
Nein	1,177	(0,647 - 2,143)	0,594

\*:p-Werte ermittelt durch Cox-Regression; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

\*\* : HR=Hazard ratio, relatives Sterberisiko

KI: Konfidenzintervall

b)

n=347	HR**	95% KI	p-Wert*
<b>Kurative Therapie</b>			
Ohne Operation	1		
Mit Operation	0,563	(0,401 - 0,789)	<b>0,001</b>
<b>HPV-Status des Tumors</b>			
HPV-negativ	1		
HPV assoziiert	0,306	(0,193 - 0,483)	<b>≤ 0,001</b>
<b>UICC-Tumorstadien</b>			
Stadium I-III	1		
Stadium IVa	1,433	1	<b>0,002</b>
Stadium IVb-IVc	1,433	(1,140 - 1,801)	
<b>Leistungszustand</b>			
ECOG 0-1	1		
ECOG 2-4	2,071	(1,540 - 2,787)	<b>≤ 0,001</b>

\*:p-Werte ermittelt durch Cox-Regression; signifikante p-Werte sind fett geschrieben

\*\* : HR=Hazard ratio, relatives Sterberisiko

KI: Konfidenzintervall

### 3.9. Analyse von Unterschieden zwischen Paarvergleich-Kollektiv und Gesamtkollektiv

Aus dem Gesamtkollektiv von 380 Patienten wurde ein Paarvergleichs-Kollektiv aus 40 Patienten gebildet (Kapitel 2.2.3). Durch die Bildung eines Paarvergleich-Kollektivs anhand der kleinsten Gruppe (n=10), ergeben sich trotz Paarung nach Alter und Geschlecht der Patienten sowie der Tumorausdehnung (T1-T3), Unterschiede zwischen dem Paarvergleichs-Kollektiv (n=40) und dem Gesamtkollektiv (n=380) (Tabelle 23). Im Paarvergleichs-Kollektiv sind die Patienten älter aber weisen einen besseren Leistungszustand auf als im Gesamtkollektiv (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Vergleich von Eigenschaften des Gesamtkollektivs und des Paarvergleich-Kollektivs**

	Gesamtkollektiv, n=380						Paarvergleichs-Kollektiv (n=40)					
	alle Patienten (n=380)		HPV-assoziiert (n=75)		HPV-negativ (n=305)		alle Patienten (n=40)		HPV-assoziiert (n=20)		HPV-negativ (n=20)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Geschlecht</b>												
Männlich	293	77,1	57	76,0	236	77,4	32	80,0	16	80,0	16	80,0
Weiblich	87	22,9	18	24,0	69	22,6	8	20,0	4	20,0	4	20,0
<b>Alter</b>												
Jung (<56 Jahre)	146	38,4	32	42,7	114	37,4	8	20,0	4	20,0	4	20,0
Alt (≥56 Jahre)	234	61,6	43	57,3	191	62,6	32	80,0	16	80,0	16	80,0
<b>Leistungszustand (ECOG)</b>												
Moderat [0-1]	245	64,5	52	69,3	193	63,3	31	77,5	15	75,0	16	80,0
Niedrig [2-4]	132	34,7	22	29,3	110	36,1	9	22,5	5	25,0	4	20,0
Unbekannt	3	0,8	1	1,3	2	0,7						
<b>Alkoholkonsum*</b>												
≥2 Standardgläser	156	41,1	11	14,7	145	47,5	12	30,0	3	15,0	9	45,0
<2 Standardgläser	115	30,3	49	65,3	66	21,6	21	52,5	15	75,0	6	30,0
Unbekannt	109	28,7	15	20,0	94	30,8	7	17,5	2	10,0	5	25,0
<b>Tabakkonsum</b>												
Raucher**	307	80,8	39	52,0	268	87,9	22	55,0	6	30,0	16	80,0
Nichtraucher	57	15,0	29	38,7	28	9,2	15	37,5	12	60,0	3	15,0
Unbekannt	16	4,2	7	9,3	9	3,0	3	7,5	2	10,0	1	5,0
<b>UICC-Stadium</b>												
I	40	10,5	4	5,3	36	11,8	6	15,0	3	15,0	3	15,0
II	32	8,4	5	6,7	27	8,9	9	22,5	5	25,0	4	20,0
III	54	14,2	18	24,0	36	11,8	7	17,5	5	25,0	2	10,0
IVa	170	44,7	35	46,7	135	44,3	13	32,5	5	25,0	8	40,0
IVb	57	15,0	5	6,7	52	17,0	2	5,0	0	0,0	2	10,0
IVc	24	6,3	7	9,3	17	5,6	3	7,5	2	10,0	1	5,0
unbekannt	3	0,8	1	1,3	2	0,7	0	0,0				
<b>Tumorausdehnung</b>												
T1	80	21,1	22	29,3	58	19,0	12	30,0	6	30,0	6	30,0
T2	103	27,1	29	38,7	74	24,3	20	50,0	10	50,0	10	50,0
T3	87	22,9	11	14,7	76	24,9	8	20,0	4	20,0	4	20,0
T4	105	27,6	12	16,0	93	30,5	/	/	/	/	/	/
unbekannt	5	1,3	1	1,3	4	1,3	/	/	/	/	/	/

\*Alkoholkonsum durchschnittlich pro Tag; 1 Standardglas = 10g Alkohol

\*\*Raucher: Konsum ≥ 3 Zigaretten/Woche

Darüber hinaus sind weniger Patienten Raucher und weisen einen anamnestischen Alkoholabusus auf als im Gesamtkollektiv. Besonders der Anteil von Nichtrauchern unter den Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren ist im Paarvergleichs-Kollektiv höher als im Gesamtkollektiv (Tabelle 23). In Bezug auf das UICC-Stadium ist erkennbar, dass der Anteil an OPSCC mit UICC-Stadium II im Paarvergleichs-Kollektiv 22,5% beträgt und somit verhältnismäßig höher liegt als im Gesamtkollektiv mit 8,4% (Tabelle 23).

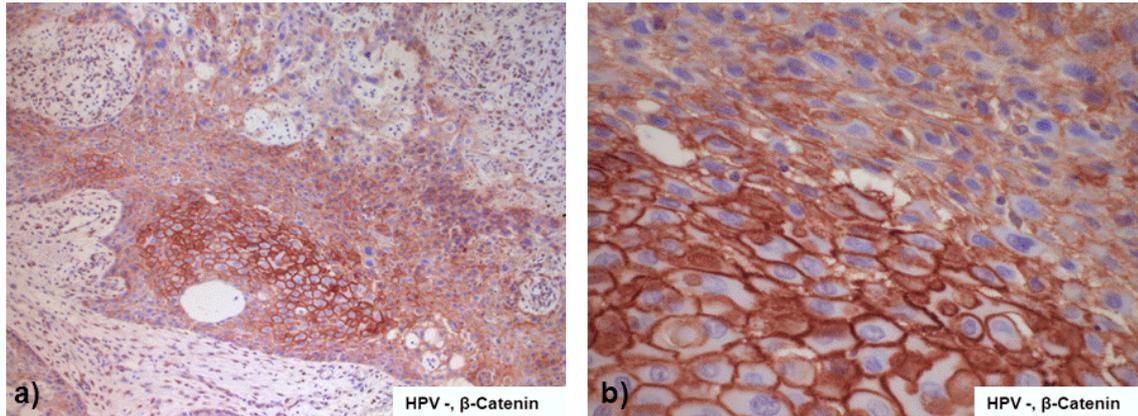
### 3.10. Auswertung und Einteilung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte

Normalerweise finden sich  $\beta$ -Catenin und p120ctn vor allem an der Zellmembran (Abbildung 9). Anhand von immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitten des Paarvergleich-Kollektivs wurde untersucht, wo im Tumorgewebe und Metastasengewebe  $\beta$ -Catenin und p120ctn lokalisiert sind und ob es diesbezüglich potenzielle Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC gibt. Bei der Analyse der gefärbten Tumorschnitte unter dem Mikroskop war zu erkennen, dass die Catenine bei keinem der untersuchten Tumoren nur an der Zellmembran zu finden sind, sondern die häufigste Lokalisation das Zytoplasma ist. Daher wurde vor allem die Anfärbung und Lokalisation der Catenine in Bezug auf das Zytoplasma genauer untersucht.



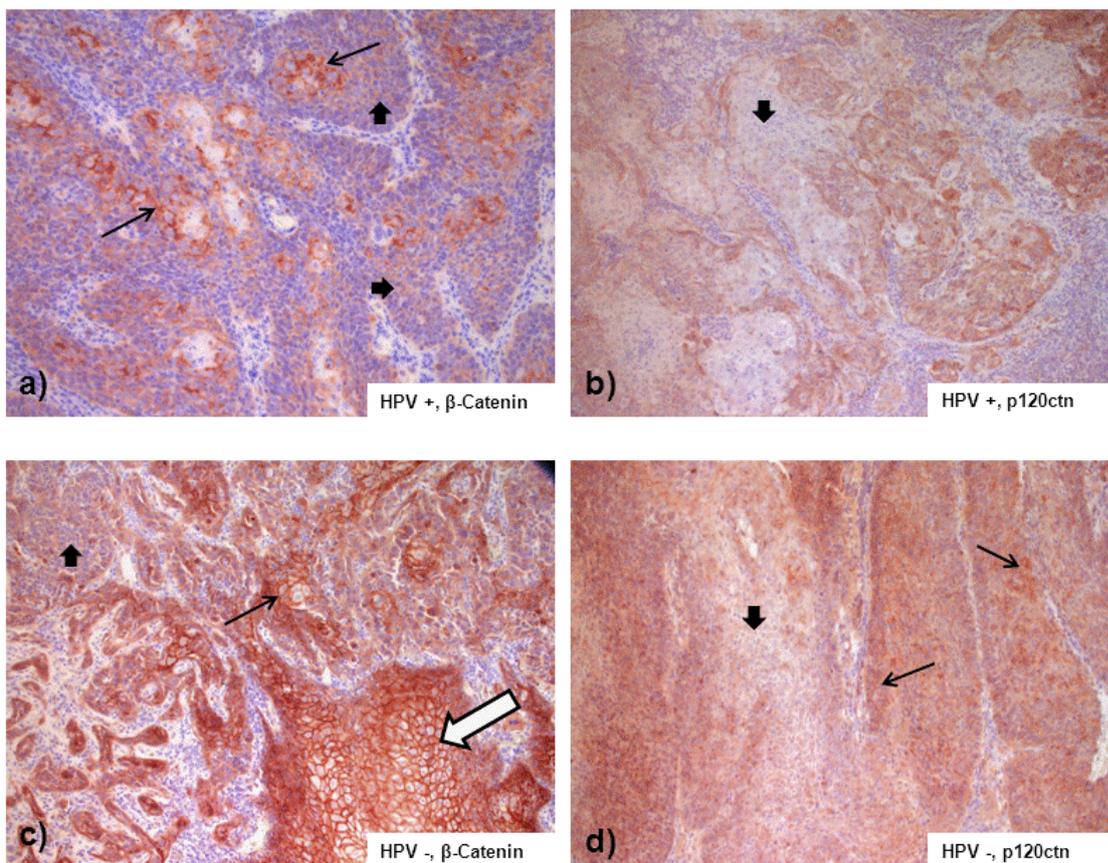
**Abbildung 9.** Immunhistochemische Färbung zur Analyse von  $\beta$ -Catenin (a, b) und p120ctn (c) an der epithelialen Zellmembran von OPSCC. Erkennbar ist die Verteilung von  $\beta$ -Catenin an der Zellmembran mit 20er Objektiv (a) und 40er Objektiv (b). In c) ist p120ctn in der immunhistochemischen Färbung an der Zellmembran abgebildet. Aufgenommen mit 10er Objektiv.

Abbildung 10 zeigt die Auflösung der Membranständigkeit und Anfärbung des Zytoplasmas (Abbildung 10b). Bei der Anfärbung des Zytoplasmas wurde semiquantitativ zwischen inhomogen zyttoplasmatisch verteiltem Catenin, mit noch teilweise bestehender membranärer Lokalisation und der homogenen zyttoplasmatischen Verteilung in der Tumorphläche unterschieden (Abbildung 11).



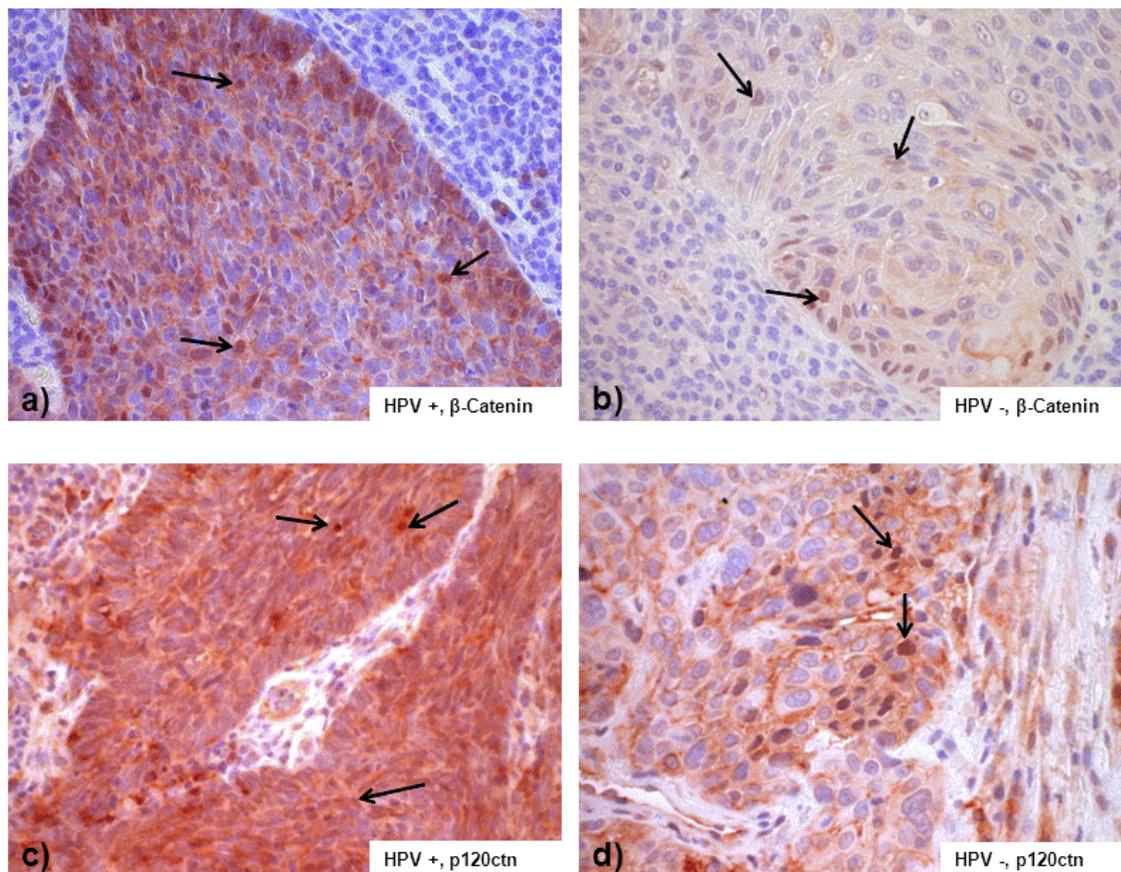
**Abbildung 10.** Auflösung der Membranständigkeit von  $\beta$ -Catenin in der immunhistochemischen Färbung eines HPV-negativen OPSCC in einer Vergrößerung mit 10er Objektiv a). Man erkennt die großen mit Hämalaun (blau) gefärbten Zellkerne (a, b). Der gleiche Abschnitt, aufgenommen mit 40er Objektiv ist in b) abgebildet. Im unteren Teil des Bildes sieht man deutlich das membranständige  $\beta$ -Catenin an der Zellmembran (b). Im oberen Teil des Bildes sind diese Grenzen nicht mehr so deutlich zu erkennen. Es ist hauptsächlich das Zytoplasma gefärbt.

Die Färbeintensität des Zytoplasmas mit den Antikörpern wurde für die statistische Auswertung dichotom in schwache und starke Färbung eingeteilt (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Einteilung von homogenem und inhomogenem gefärbtem Zytoplasma von Tumoren mit zwei unterschiedlichen Färbeintensitäten schwach (b) und stark (a, c, d). Tumor a) ist in Vergrößerung mit 20er Objektiv aufgenommen. Tumoren b), c) und d) sind in einer Vergrößerung mit 10er Objektiv aufgenommen. Die dicken schwarzen Pfeile zeigen homogenes Zytoplasma. Die dünnen Pfeile zeigen auf inhomogen gefärbtes Zytoplasma. Der weiße Pfeil in c) zeigt auf membranständiges  $\beta$ -Catenin.

Um die mögliche nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn in Tumorgewebe zu untersuchen wurde beurteilt, ob und wie hoch der Anteil der gefärbten Zellkerne ist (Abbildung 12). Für jeden Färbeporgang wurde eine Negativkontrolle angefertigt (Kapitel 2.2.5.). Diese enthielten keinen Primärantikörper, aber alle anderen Schritte wurden entsprechend dem Färbeprotokoll (Kapitel 2.2.5.1. und 2.2.5.2.) durchgeführt. Alle Negativkontrollen waren negativ und wiesen dementsprechend keine Färbung außer der Hämalaun Färbung auf.



**Abbildung 12.** Immunhistochemische Färbungen zur Analyse der nukleären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin (a, b) und p120ctn (c, d) an OPSCC. Die Pfeile zeigen auf gefärbte Zellkerne. Alle Abbildungen aufgenommen mit 40er Objektiv.

### 3.11. Auswertung der immunhistochemischen Färbung für $\beta$ -Catenin

Die immunhistochemischen Färbungen der Primärtumoren des Paarvergleich-Kollektivs dienten vor allem zur Analyse, ob eine Translokation des  $\beta$ -Catenins von der Zellmembran in den Zellkern stattgefunden hat und ob hierbei Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC festzustellen sind. Fasst man alle Fälle zusammen, bei denen mindestens einzelne Zellkerne angefärbt sind ergibt dies, dass

bei 50% der HPV-assoziierten und 35% der HPV-negativen OPSCC eine Translokation von  $\beta$ -Catenin nachweisbar war (Tabelle 24b). Bis auf einen Fall bei den HPV-negativen OPSCC mit vielen gefärbten Zellkernen, sind bei beiden Tumorentitäten vor allem einzelne und wenige Zellkerne gefärbt. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbungen ist überwiegend mäßig. Das  $\beta$ -Catenin ist vor allem inhomogen im Zytoplasma lokalisiert und weist noch membranständige Anteile auf (Tabelle 24a). Für die weitere statistische Auswertung wurden die Kriterien Häufigkeit gefärbter Zellkerne, Färbeintensität des Zytoplasmas und Lokalisation des Catenins im Zytoplasma als dichotome Variablen zusammengefasst (Tabelle 24b). Hierbei wurden die zwei Fälle mit gleichen Anteilen an homogener und inhomogener Verteilung im Zytoplasma (Tabelle 24a) nicht berücksichtigt.

**Tabelle 24a: Deskriptive Analyse der immunhistochemischen Färbung für  $\beta$ -Catenin**

	Analysierte Tumorschnitte (n=40)		HPV-assoziiert		HPV-negativ		HPV-assoziiert		HPV-negativ	
			(n=20)		(n=20)		NO	N+	NO	N+
			n	%	n	%	n	%	(n=10)	(n=10)
<b>Analyse Zellkernfärbung</b>										
<b>Häufigkeit gefärbter Zellkerne</b>										
keine Zellkerne gefärbt	23	57,5	10	50,0	13	65,0	4	6	6	7
einzelne (< 20% der Zellkerne gefärbt)	11	27,5	7	35,0	4	20,0	6	1	2	2
wenige ( $\geq$ 20% – 50% der Zellkerne gefärbt)	5	12,5	3	15,0	2	10,0	0	3	2	0
viele (> 50% der Zellkerne gefärbt)	1	2,5	0	0,0	1	5,0	0	0	0	1
<b>Analyse Färbeintensität des Zytoplasmas</b>										
<b>Färbeintensität <math>\beta</math>-Catenin</b>										
keine bis geringe Färbung	6	15,0	2	10,0	4	20,0	1	1	4	0
geringe bis mäßige Färbung	12	30,0	5	25,0	7	35,0	2	3	2	5
mäßige Färbung	16	40,0	11	55,0	5	25,0	6	5	3	2
mäßige bis starke Färbung	3	7,5	1	5,0	2	10,0	1	0	1	1
starke Färbung	3	7,5	1	5,0	2	10,0	0	1	0	2
<b>Analyse der <math>\beta</math>-Catenin Lokalisation</b>										
<b><math>\beta</math>-Catenin Lokalisation</b>										
Zytoplasma inhomogen	29	72,5	14	70,0	15	75,0	8	6	5	10
Zytoplasma homogen	9	22,5	5	25,0	4	20,0	2	3	4	0
gleiche Anteile inhomogen/homogen	2	5,0	1	5,0	1	5,0	0	1	1	0

NO: nicht in die Halslymphknoten metastasiert; N+: in die Halslymphknoten metastasiert

Insgesamt bestehen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC in den untersuchten Tumorschnitten des Paarvergleich-Kollektivs. Es ist jedoch zu erkennen, dass alle zehn der metastasierten HPV-negativen OPSCC eine inhomogene Zytoplasmafärbung mit noch membranständigen Anteilen aufweisen, wohingegen sechs der HPV-assoziierten OPSCC inhomogene Lokalisation und drei eine homogene Verteilung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma zeigen (Tabelle 24b).

**Tabelle 24b: Analyse dichotomer Variablen zur Beurteilung von Unterschieden zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen als auch metastasierten und nicht metastasierten OPSCC für  $\beta$ -Catenin**

	Auswertbare Fälle		HPV-assoziiert		HPV-negativ		p-Wert*	N0			N+		
			n	%	n	%		n	%	p-Wert*	n	n	p-Wert*
<b>Analyse Zellkernfärbung</b>													
<b>Zellkern gefärbt dichotom</b>													
nein (keine Zellkerne gefärbt)	23	57,5	10	50,0	13	65,0	0,523	4	6	0,656	6	7	1,000
ja (einzelne, wenige, viele Zellkerne)	17	42,5	10	50,0	7	35,0		6	4		4	3	
<b>Analyse Färbeintensität des Zytoplasmas</b>													
<b>Färbeintensität <math>\beta</math>-Catenin dichotom</b>													
schwache Färbung	18	45,0	7	35,0	11	55,0	0,341	3	6	0,370	4	5	1,000
starke Färbung	22	55,0	13	65,0	9	45,0		7	4		6	5	
<b>Analyse der <math>\beta</math>-Catenin Lokalisation</b>													
<b><math>\beta</math>-Catenin Lokalisation dichotom</b>													
Zytoplasma inhomogen	29	76,3	14	73,7	15	78,9	1,000	8	5	0,350	6	10	0,087
Zytoplasma homogen	9	23,7	5	26,3	4	21,1		2	4		3	0	

HPV-assoziiert: HPV+; HPV-negativ: HPV-

N0: nicht in die Halslymphknoten metastasiert; N+: in die Halslymphknoten metastasiert

\*p-Werte ermittelt nach exaktem zweiseitigem Test nach Fisher.

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben

### 3.12. Auswertung der immunhistochemischen Färbung für p120ctn

Die Analyse der Lokalisation des p120ctn der immunistochemisch gefärbten Tumorschnitte hat ergeben, dass 18 der 40 Tumoren gefärbte Zellkerne aufweisen. Die HPV-assoziierten OPSCC weisen in 40% der Fälle viele gefärbte Zellkerne auf im Vergleich zu den HPV-negativen mit nur 5% (Tabelle 25a). Von den nicht metastasierten OPSCC weisen fünf der HPV-assoziierten und keiner der HPV-negativen OPSCC viele gefärbte Zellkerne auf (Tabelle 25a). Die Färbeintensität der Tumorschnitte und die Lokalisation des p120ctn im Zytoplasma zeigen eine ähnliche Verteilung für die HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC. Die Analyse von zusammengefassten dichotomen Variablen zeigt, dass mehr HPV-assoziierte Tumoren eine Zellkernfärbung aufweisen als HPV-negative. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant (Tabelle 25b). Die p120ctn-AK Färbung weist signifikant mehr gefärbte Zellkerne auf bei starker Färbeintensität des Tumorschnittes ( $p=0,005$ ) (Ergebnis nicht in Tabelle 25 abgebildet). Die Analyse der Tumorgewebe von metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren hat insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC bezüglich der Verteilung auf die Kriterien Zellkernfärbung, Färbeintensität und Lokalisation im Zytoplasma ergeben (Tabelle 25b).

**Tabelle 25a: Deskriptive Analyse der immunhistochemischen Färbung für p120ctn**

	Analysierte Tumorschnitte (n=40)		HPV-assoziert (n=20)		HPV-negativ (n=20)		HPV-assoziert (n=10)		HPV-negativ (n=10)	
	n	%	n	%	n	%	n	n	n	n
<b>Analyse Zellkernfärbung</b>										
<b>Häufigkeit gefärbter Zellkerne</b>										
keine Zellkerne gefärbt	22	55,0	9	45,0	13	65,0	4	5	7	6
einzelne (< 20% der Zellkerne gefärbt)	2	5,0	1	5,0	1	5,0	1	0	1	0
wenige (≥ 20% – 50% der Zellkerne gefärbt)	7	17,5	2	10,0	5	25,0	0	2	2	3
viele (> 50% der Zellkerne gefärbt)	9	2,5	8	40,0	1	5,0	5	3	0	1
<b>Analyse Färbeintensität des Zytoplasmas</b>										
<b>Färbeintensität p120ctn</b>										
keine bis geringe Färbung	10	25,0	5	25,0	5	25,0	2	3	5	0
geringe bis mäßige Färbung	9	22,5	3	15,0	6	30,0	1	2	1	5
mäßige Färbung	14	35,0	9	45,0	5	25,0	5	4	3	2
mäßige bis starke Färbung	3	7,5	0	0,0	3	15,0	0	0	1	2
starke Färbung	4	10,0	3	15,0	1	5,0	2	1	0	1
<b>Analyse der p120ctn Lokalisation</b>										
<b>p120ctn Lokalisation</b>										
Zytoplasma inhomogen	24	60,0	12	60,0	12	60,0	6	6	4	8
Zytoplasma homogen	14	35,0	8	40,0	6	30,0	4	4	5	1
gleiche Anteile inhomogen/homogen	2	5,0	0	0,0	2	10,0	0	0	1	1

NO: nicht in die Halslymphknoten metastasiert; N+: in die Halslymphknoten metastasiert

**Tabelle 25b: Analyse dichotomer Variablen zur Beurteilung von Unterschieden zwischen HPV-assozierten und HPV-negativen als auch metastasierten und nicht metastasierten OPSCC für p120ctn**

	Auswertbare Fälle		HPV-assoziert		HPV-negativ		p-Wert*	NO			N+		
	n	%	n	%	n	%		HPV+	HPV-	p-Wert*	HPV+	HPV-	p-Wert*
<b>Analyse Zellkernfärbung</b>													
<b>Zellkern gefärbt dichotom</b>													
nein (keine Zellkerne gefärbt)	22	55,0	9	45,0	13	65,0	0,341	4	7	0,370	5	6	1,000
ja (einzelne, wenige, viele Zellkerne)	18	45,0	11	55,0	7	35,0		6	3		5	4	
<b>Analyse Färbeintensität des Zytoplasmas</b>													
<b>Färbeintensität p120ctn</b>													
schwache Färbung	19	47,5	8	40,0	11	55,0	0,527	3	6	0,370	5	5	1,000
starke Färbung	21	52,5	12	60,0	9	45,0		7	4		5	5	
<b>Analyse der p120ctn Lokalisation</b>													
<b>p120ctn Lokalisation dichotom</b>													
Zytoplasma inhomogen	24	63,2	12	60,0	12	66,7	0,745	6	4	0,656	6	8	0,303
Zytoplasma homogen	14	36,8	8	40,0	6	33,3		4	5		4	1	

HPV-assoziert: HPV+; HPV-negativ: HPV-

NO: nicht in die Halslymphknoten metastasiert; N+: in die Halslymphknoten metastasiert

\*p-Werte ermittelt nach exaktem zweiseitigem Test nach Fisher.

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben

### 3.13. Analyse der Zellkernfärbung in den Metastasen

Es wurde deskriptiv analysiert ob Primärtumoren, die eine Färbung der Zellkerne in der IHC für  $\beta$ -Catenin beziehungsweise für p120ctn aufweisen, auch eine Färbung der Zellkerne in den Metastasen zeigen. Für die Färbung der sechs HPV-assozierten OPSCC mit gefärbter Metastase (HPV+N+) sind jeweils in drei Tumoren

Übereinstimmungen der Kernfärbungen von Primärtumor und Metastase detektierbar. Für die Färbung mit dem  $\beta$ -Catenin-AK an HPV-negativen metastasierten (HPV-N+) Primärtumoren und den zugehörigen Metastasen ist eine Übereinstimmung in vier Fällen (66,7%) ermittelbar. Bei der p120ctn immunhistochemischen Färbung gibt es zwei Fälle mit übereinstimmenden Ergebnissen im Primärtumor (HPV-) und der Metastase mit keinen gefärbten Zellkernen (33,3%). Fünf der sechs HPV-assoziierten Metastasen weisen in der immunhistochemischen Färbung für  $\beta$  Catenin gefärbte Zellkerne auf und vier der sechs Metastasen haben in der p120ctn immunhistochemischen Färbung gefärbte Zellkerne. Bei den HPV-negativen Metastasen sind in vier Metastasen die Zellkerne positiv für  $\beta$ -Catenin gefärbt und in zwei Fällen für p120ctn (Tabelle 26).

**Tabelle 26: Vergleich gefärbter Zellkerne im Primärtumor und der Metastase**

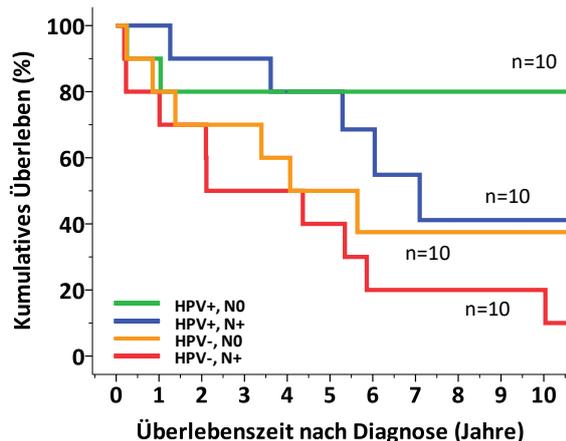
		HPV+N+						HPV-N+					
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b><math>\beta</math>-Catenin</b>	Primarius Kern gefärbt	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
	Metastase Kern gefärbt	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
<b>p120ctn</b>	Primarius Kern gefärbt	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	Metastase Kern gefärbt	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0

I-XII: Tumorproben

1	Zellkern gefärbt
0	Zellkern nicht gefärbt

### 3.14. Analyse des Überlebens des Paarvergleich-Kollektivs

Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne Halslymphknotenmetastasen weisen ein signifikant besseres Überleben auf als Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit Metastasen in den Halslymphknoten (Abbildung 13). Das mediane Überleben der Gruppe mit dem Tumorstatus HPV+/N0 konnte nicht analysiert werden, da mehr als 50% dieser Patienten auch zum Ende der Beobachtungszeit noch am Leben sind. Das mediane Überleben für die HPV+/N+ Patienten liegt bei 7,10 Jahren, für die HPV-/N0 Patienten bei 4,07 Jahren und für die HPV-/N+ Patienten bei 2,11 Jahren.



	HPV+NO	HPV+N+	HPV-NO	HPV-N+
HPV+NO		0,271	0,108	<b>0,005</b>
HPV+N+	0,271		0,427	0,054
HPV-NO	0,108	0,427		0,372
HPV-N+	<b>0,005</b>	0,054	0,372	

p-Wert analysiert durch Log Rank-Test

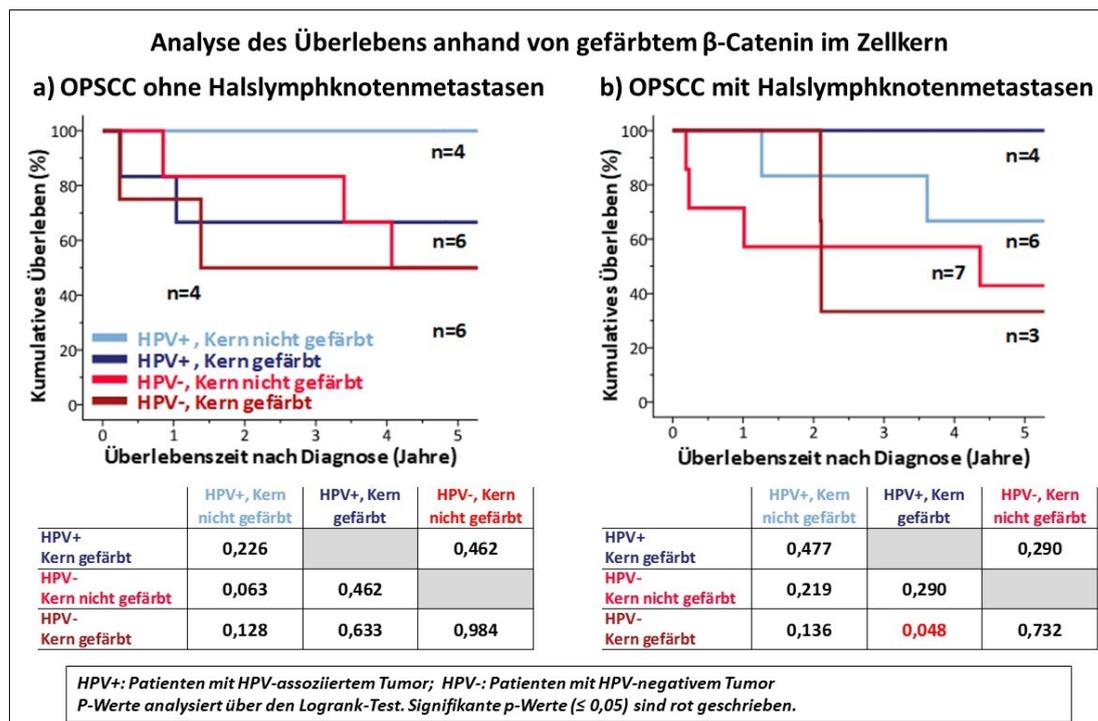
**Abbildung 13:** Analyse des Überlebens der vier Gruppen des Paarvergleich-Kollektivs. Gezeigt sind die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für Patienten mit HPV-assoziierten (HPV+) und HPV-negativen (HPV-) OPSCC, sowie mit Halslymphknotenmetastasen (N+) und ohne Halslymphknotenmetastasen (N0). Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne Halslymphknotenmetastasen (HPV+, N0) haben ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit Halslymphknotenmetastasen (HPV-, N+).

### 3.15. Analyse des Überlebens von Patienten anhand der Anfärbung der Zellkerne in der immunhistochemischen Färbung

Es sollte analysiert werden, ob die Anfärbung von  $\beta$ -Catenin beziehungsweise p120ctn in Zellkernen von Primärtumoren mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert ist. Hierzu wurden Patientengruppen mit HPV-assoziierten und HPV-negativen, sowie metastasierten und nicht metastasierten OPSCC getrennt voneinander betrachtet, um das Überleben mit und ohne Zellkernfärbung des jeweils untersuchten Catenins zu analysieren.

#### 3.15.1. Überleben anhand der Zellkernfärbung für $\beta$ -Catenin

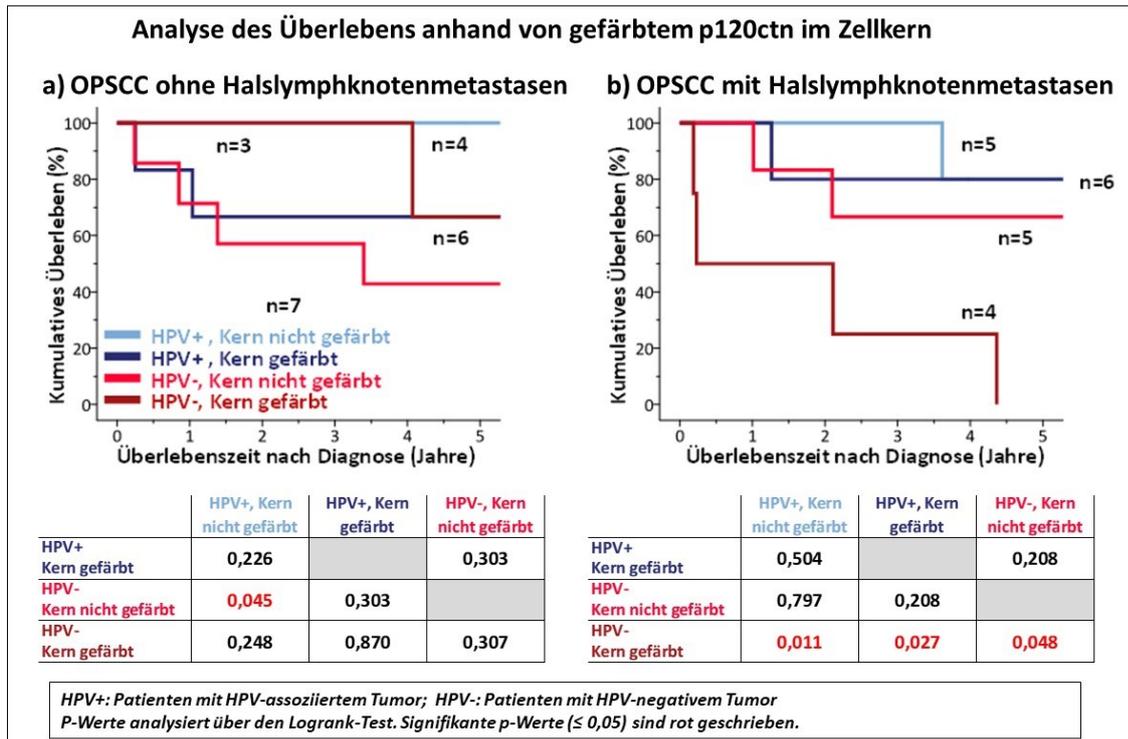
Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne Zellkernfärbung des  $\beta$ -Catenin im Primärtumor weisen das beste Überleben auf (Abbildung 14a). Das schlechteste Überleben haben Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit Zellkernfärbung. Für Patienten mit nicht lokoregionär metastasierten OPSCC ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben für HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC mit und ohne Färbung der Zellkerne (Abbildung 14a). Im Unterschied hierzu hat sich für die Überlebensanalyse von Patienten mit lokoregionär metastasierten OPSCC ergeben, dass Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit Zellkernfärbung das beste Überleben haben. Patienten mit HPV-negativen OPSCC und Zellkernfärbung haben ein signifikant schlechteres Überleben ( $p = 0,048$ ) (Abbildung 14b).



**Abbildung 14:** Überlebenskurven nach Kaplan-Meier von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ohne (a) und mit Halslymphknotenmetastasen (b) mit und ohne Färbung der Zellkerne des Primärtumors in der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von  $\beta$ -Catenin. Bei den metastasierten OPSCC haben Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit Färbung der Zellkerne ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC mit Zellkernfärbung ( $p = 0,048$ ) (b).

### 3.15.2. Überleben anhand der Zellkernfärbung für p120ctn

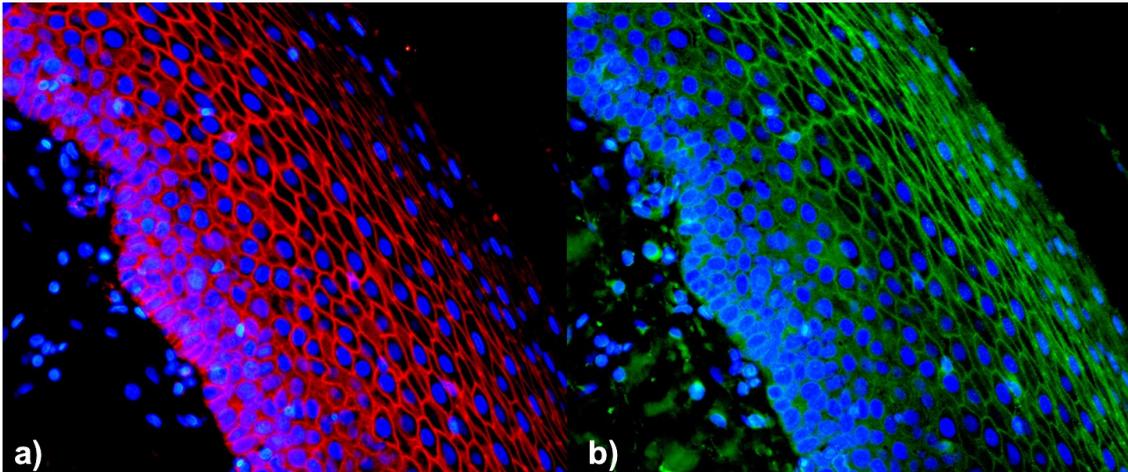
Die Überlebensanalyse von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ohne Halslymphknotenmetastasen hat ergeben, dass Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne immunhistochemischen Nachweis des p120ctn in Zellkernen des Primärtumors das beste Überleben aufweisen. Patienten mit HPV-negativen OPSCC ohne Zellkernfärbung weisen ein signifikant schlechteres Überleben auf ( $p = 0,045$ ) (Abbildung 15a). Für die Patienten mit Halslymphknotenmetastasen zeigt sich, dass solche mit HPV-negativen OPSCC mit Zellkernfärbung ein signifikant schlechteres Überleben aufweisen als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC sowie HPV-negativen OPSCC ohne Färbung der Zellkerne (Abbildung 15b).



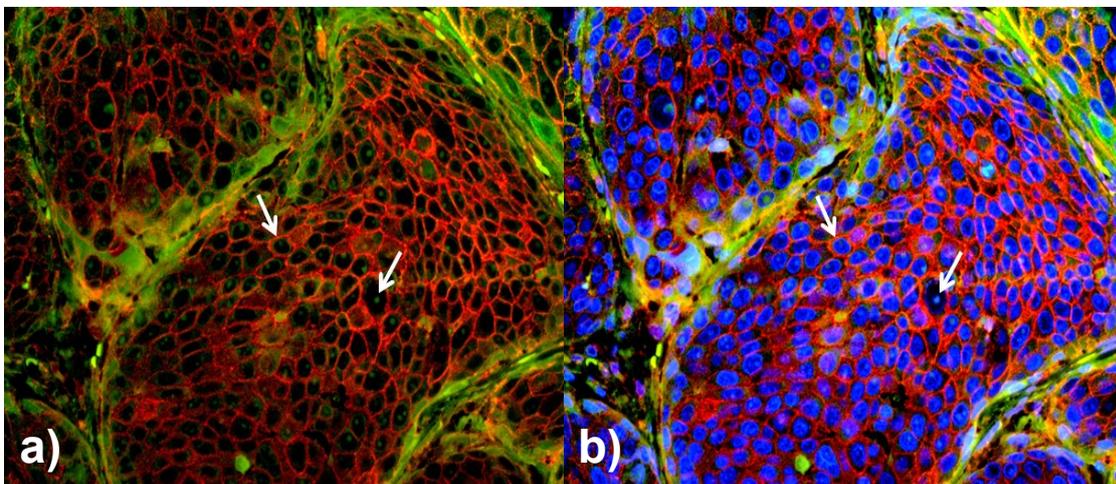
**Abbildung 15:** Überlebenskurven nach Kaplan-Meier von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ohne (a) und mit Halslymphknotenmetastasen (b) mit und ohne Färbung der Zellkerne des Primärtumors in der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von p120ctn. Patienten mit nicht metastasierten HPV-negativen OPSCC ohne Zellkernfärbung haben ein schlechteres Überleben als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ohne Zellkernfärbung (a). Bei den metastasierten OPSCC haben Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit Färbung der Zellkerne ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC und HPV-negativen OPSCC ohne Zellkernfärbung (b).

### 3.16. Darstellung der Lokalisation von $\beta$ -Catenin und p120ctn in der Immunfluoreszenzfärbung von Tumorgewebe

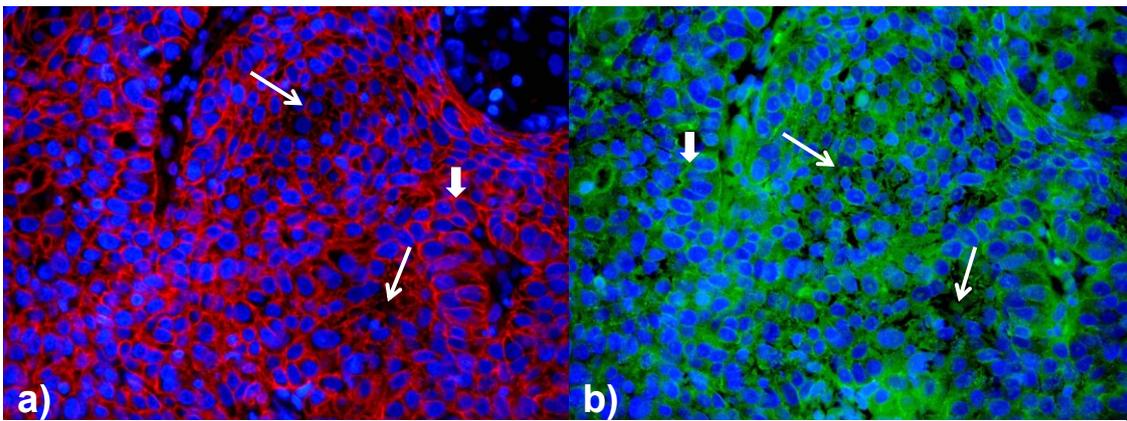
Zur besseren Darstellung der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn im Tumorgewebe, wurden an acht Primärtumoren und zwei Metastasen des Paarvergleich-Kollektivs exemplarisch Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es wurden zwei Tumoren mit dem Status HPV-/N0, drei mit HPV+/N0, zwei mit HPV+/N+ und ein Tumor mit dem Status HPV-/N+, sowie eine Metastase mit HPV-assoziiertem und eine mit HPV-negativem Nachweis angefärbt. Abbildung 16 zeigt die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn an der epithelialen Zellmembran. Die Lokalisation von p120ctn im Zellkern war besonders in den beiden Metastasen erkennbar (Abbildung 17). Bei einigen Tumoren konnten, die sich von der Membran ablösenden Catenine und der Verlust der Catenine in den Zellen visualisiert werden (Abbildung 18). Da nur einige Schnitte gefärbt wurden, dienen die Ergebnisse lediglich zur Veranschaulichung der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn.



**Abbildung 16** Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin (rot, a) und p120ctn (grün, b) an der epithelialen Zellmembran eines HPV-assoziierten Primärtumors. Die Zellkerne erscheinen blau gefärbt. Aufgenommen mit 40er Objektiv.



**Abbildung 17** Immunfluoreszenzfärbung einer HPV-assoziierten Metastase zur Darstellung gefärbter Zellkerne (weiße Pfeile). Aufgenommen mit 40er Objektiv. P120ctn (grün) ist deutlich im Zellkern zu erkennen (a, b). Das  $\beta$ -Catenin (rot) befindet sich hauptsächlich an der Zellmembran (a, b). In (b) ist das Overlay mit DAPI Zellkernfärbung (blau) dargestellt.



**Abbildung 18** Immunfluoreszenzfärbung eines HPV-negativen OPSCC, aufgenommen mit dem 40er Objektiv. Es zeigt die Auflösung der Membranständigkeit (a) des  $\beta$ -Catenins (rot) und des p120-Catenins (b, grün). Mit den dünnen weißen Pfeilen sind exemplarisch Bereiche mit der Auflösung der Membranständigkeit des Catenins markiert. Die dicken weißen Pfeile markieren membranständiges Catenin.

## 4.0 Diskussion

### 4.1. Retrospektive Analyse

#### 4.1.1. Zeitlicher Trend der HPV-Assoziation

Die Prävalenz HPV-assoziiierter OPSCC ist in den USA in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen (Chaturvedi et al., 2011). In Stockholm/Schweden wurden steigende Inzidenzzahlen für HPV-assoziierte Tonsillenzinome zwischen 1970-2002 gezeigt (Näsman et al., 2009). Die Prävalenzrate für HPV-assoziierte OPSCC in der vorliegenden Arbeit liegt für den Zeitraum 2000 – 2004 bei 18,4% und 2005 – 2009 bei 20,9%. Erkennbar ist ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der HPV-assoziierten Karzinome an der Gesamtzahl der neudiagnostizierten OPSCC. Vergleichbar sind die Prävalenzraten mit denen einer Studie mit Daten aus zwei großen niederländischen Universitätskrankenhäusern, die für den Zeitraum 2000-2006 eine Prävalenz von 19,4% für HPV-positive OPSCC ermittelt haben (Rietbergen et al., 2013). Die multizentrische Studie an oralen Karzinomen und OPSCC von Herrero et al, die Daten aus 9 Ländern (Italien, Spanien, Nordirland, Polen, Indien, Kuba, Kanada, Australien und dem Sudan) ausgewertet hat, hat einen Wert von 18,3% für HPV-assoziierte OPSCC zwischen 1996 – 1999 angegeben (Herrero et al., 2003). Deutlich höhere Prävalenzraten wurden für HPV-positive Zungengrundkarzinome im Stadtgebiet Stockholm in Schweden mit 58% im Zeitraum 1998 – 2001 und 84% in den Jahren 2004 – 2007 ermittelt (Attner et al., 2010). In den USA wurden Patienten mit OPSCC zwischen Juli 2002 – Mai 2005 untersucht und 206 von 323 (63,8%) untersuchten Tumoren waren HPV-assoziiert (Ang et al., 2010). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum die Prävalenzrate beeinflussen können, da Patienten mit HPV-positiven OPSCC seltener starke Raucher sind und weniger häufig einen Alkoholabusus aufweisen als HPV-negative Tumorpriente (Rietbergen et al., 2013; Herrero et al., 2003). Des Weiteren können sexuelle Gewohnheiten Einfluss auf die Rate von Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren nehmen. Es wurde gezeigt, dass HPV-assoziierte Tumorpriente anamnestisch mehr als einen Sexualpartner aufweisen und häufiger Oralsex praktizieren (Herrero et al., 2003). In Ländern des indischen Subkontinents gibt es andere Risikofaktoren wie das Kauen von Betel, das die Prävalenzrate HPV-negativer Tumoren anhebt (Herrero et al., 2003). Somit kann die Herkunft sowie Lebensgewohnheiten der Patienten die Rate von HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC beeinflussen.

#### **4.1.2. Biometrische Merkmale und Charakteristika von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC**

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert wie sich das Geschlecht, das Alter zum Diagnosezeitpunkt (<60 Jahre; ≥60 Jahre) und der Leistungszustand der Patienten auf HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC verteilen. Keiner dieser drei Charakteristika weist eine signifikante Abhängigkeit zum HPV-Status auf. Im Gesamtkollektiv sind zwar deutlich mehr Männer (77,3%) als Frauen (22,7%) von einem OPSCC betroffen, jedoch ist kein signifikanter Unterschied der Verteilung in Bezug auf den HPV-Status ermittelbar. Das Geschlecht ist des Weiteren kein signifikanter Faktor für das Überleben von Patienten mit OPSCC. In den Niederlanden hat die Arbeitsgruppe von Rietbergen et al. 71,8% Männer und 28,2% Frauen mit HPV-positiven und 65,5% Männer und 34,4% Frauen mit HPV-negativen OPSCC angegeben (Rietbergen et al., 2013). Interessanterweise ist hier im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine höhere Prozentzahl an Frauen unter den HPV-negativen Patienten zu erkennen. Eine andere Studie aus den USA hat niedrigere Prozentzahlen der Frauen in beiden Tumorentitäten ermittelt (Ang et al., 2010). Die unterschiedliche Geschlechtsverteilung könnte durch sexuelle Praktiken und Lebensgewohnheiten erklärbar sein. Eine höhere Anzahl an sexuellen Partnern sowie Oralsex wird mit der Entstehung HPV-positiver OPSCC und der regelmäßige Konsum von Alkohol und Tabak mit der Entstehung HPV-negativer OPSCC assoziiert (Rietbergen et al., 2013; Herrero et al., 2003). Das ermittelte mediane Alter der untersuchten Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt zum Diagnosezeitpunkt bei 59,5 Jahren und das der Patienten mit HPV-negativen OPSCC bei 59 Jahren und weist somit keinen signifikanten Altersunterschied zwischen beiden Patientengruppen auf. Das mediane Alter wurde auch in anderen Studien aus Köln für Patienten mit Tonsillenkarcinomen und aus den Niederlanden für Patienten mit OPSCC mit rund 60 Jahren angegeben (Klussmann et al., 2003:1; Rietbergen et al., 2013). Im Gegensatz hierzu haben andere Studien gezeigt, dass Patienten mit HPV-positiven Tonsillenkarcinomen in Stockholm (Hammarstedt et al., 2006) sowie Patienten mit HPV-positiven OPSCC im UICC-Stadium III und IV in den USA (Ang et al., 2010) zum Diagnosezeitpunkt ein signifikant niedrigeres medianes Alter aufweisen als Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Möglicherweise bedingt das nahezu gleiche mediane Alter beider Gruppen, dass kein signifikanter Unterschied im Leistungszustand zwischen den hier untersuchten Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC ermittelt wurde (Tabelle 16). Patienten beider Tumorentitäten weisen ein geringeres relatives Sterberisiko sowohl bei jüngerem Alter, als auch mit einem besseren Leistungszustand

auf. Beide Faktoren könnten eine bessere Ausgangslage für eine physisch belastende Therapie darstellen, wie beispielsweise eine Chemo- oder Strahlentherapie. Somit könnten ein jüngeres Alter und ein moderater Leistungszustand die besseren Überlebensprognosen bedingen. Anhand von multivariaten Cox-Analysen wurde beispielsweise ein besseres Überleben nach Chemotherapie für Patienten mit OPSCC und einem besseren Leistungszustand gezeigt (Blanchard et al., 2011). Des Weiteren könnten Komorbiditäten in der vorliegenden Arbeit dazu beigetragen haben, dass Patienten einen niedrigeren Leistungszustand hatten und schneller verstarben als Patienten mit moderatem ECOG. Die Todesursache wurde in der Datenbank mit 396 Patienten nicht erfasst und konnte daher nicht als Todesursache berücksichtigt werden.

### **4.1.3. Analyse der Risikofaktoren**

#### **4.1.3.1. Tabak- und Alkoholkonsum**

Regelmäßiger Tabak- und Alkoholkonsum begünstigen die Entstehung von OPSCC (Ang et al., 2010; Herrero et al., 2003) und stellen dosisabhängige Risikofaktoren dar (Herrero et al., 2003; Rietbergen et al., 2013). In Übereinstimmung mit anderen Studien aus den USA, waren in der vorliegenden Arbeit signifikant mehr Patienten mit HPV-negativen OPSCC aktive Raucher oder haben in der Vergangenheit geraucht, beziehungsweise tranken regelmäßig Alkohol im Vergleich zu den Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC (Fakhry et al., 2008; Ang et al., 2010). Der Alkoholkonsum wurde in der vorliegenden Arbeit in Standardgläsern angegeben. Ein Vergleich mit anderen Studien war jedoch schwierig, da der Konsum in Studien unterschiedlich eingeteilt wurde. Korrekte Daten zum Tabak- und Alkoholkonsum sind außerdem schwer zu erheben. Ein Grund hierfür ist die gefürchtete Stigmatisierung der Patienten. Daher geben viele ihren Konsum geringer an als er tatsächlich ist. Vermutlich sind somit Patienten, die eigentlich der Gruppe der Patienten mit Alkoholabusus zuzurechnen wären, in die Gruppe der nicht regelmäßig Alkohol trinkenden Patienten eingeteilt worden. Des Weiteren befanden sich auf Grund der Einteilung der Patienten anhand des Tabakkonsums (Kapitel 2.2.2.) viele nicht mehr aktiv rauchende Patienten in der Gruppe der Raucher. Hierzu gehören Patienten, die seit weniger als 16 Jahren Nichtraucher sind. Dadurch könnte das Sterberisiko in der Gruppe der Raucher in Richtung eines niedrigeren Sterberisikos beeinflusst worden sein. Diese Faktoren könnten dazu beigetragen haben, dass das Risikoprofil der Patienten verfälscht worden ist und entgegen der Erwartung (Rietbergen et al., 2013; Ang et al., 2010; Broglie et al.,

2013), der Tabak- und Alkoholkonsum weder bei den HPV-assoziierten noch bei den HPV-negativen Patienten signifikante Faktoren für das Überleben darstellen.

#### **4.1.3.2. HPV-Status**

Einer der wichtigsten Faktoren für das Überleben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten stellt der HPV-Status dar. Die 5-Jahres Überlebensrate von kurativ behandelten Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt bei 79,1% und die der Patienten mit HPV-negativen OPSCC bei 36,8%. Das relative Sterberisiko von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt um etwa 2/3 niedriger als das der Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Die bessere Überlebensprognose von Patienten mit HPV-assoziierten im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen OPSCC deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Fakhry et al., 2008; Licitra et al., 2006; Rietbergen et al., 2013). Das relative Sterberisiko von Patienten mit OPSCC im UICC Stadium III und IV liegt bei Patienten mit HPV-positiven OPSCC um 61% unter dem von Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Fakhry et al., 2008). Mögliche Ursachen für das längere Überleben sind eine vermutete erhöhte Sensitivität für Chemotherapie und Chemoradiatio HPV-positiver im Vergleich zu HPV-negativen HNSCC-Tumoren (Fakhry et al., 2008). Diese könnte bedingt sein durch eine geringere Anzahl von Mutationen in der DNA von HPV-positiven verglichen mit HPV-negativen Tumoren (Stransky et al., 2011). Auf Grund der deutlichen Überlebensunterschiede zwischen Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC steigt die Bedeutung von Risikomodellen für die Identifizierung von effektiveren Therapien mit geringerer Morbidität. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass unabhängig von der durchgeführten Therapie vor allem der HPV-Status signifikant für das Überleben von Patienten mit OPSCC ist (Wagner et al., 2017). Dieses Ergebnis stimmt überein mit zwei weiteren Studien zu Risikomodellen, die den HPV-Status als unabhängigen starken prognostischen Faktor identifiziert haben (Ang et al., 2010, Rietbergen et al., 2013). Aber auch der Leistungsstatus stellt einen weiteren Risikofaktor für das Überleben dar (Wagner et al., 2017). Weitere wichtige Prognosefaktoren unterscheiden sich in den Modellen. Unsere Studie hat zusätzlich das T- und N-Stadium des Tumors, den ECOG und das Alter der Patienten in das Modell einbezogen (Wagner et al., 2017). Eine andere Studie hat die Packungsjahre der Raucher als Risikofaktor integriert (Ang et al. 2010). Anstelle des ECOG hat eine weitere Studie eine umfangreichere Klassifizierung für die Komorbidität einbezogen (Rietbergen et al., 2013). Die drei erwähnten Studien unterschieden sich jedoch in der Auswahl des Patientenkollektivs und der primär durchgeführten Therapie, sodass auch mögliche

Unterschiede bezüglich wichtiger Risikofaktoren für die Modelle der Studien erklärt werden könnten. Alle drei Studien haben jedoch gezeigt, dass es Patientengruppen mit unterschiedlichen Überlebensprognosen gibt, die sich in niedriges, mittleres und hohes Risiko einteilen lassen. Somit könnten Risikomodelle in Zukunft zu einer besseren Therapiewahl und Überlebensprognose beitragen (Wagner et al., 2017; Ang et al., 2010; Rietbergen et al., 2013). Die überarbeitete TNM-Klassifikation in der 8. Auflage hat inzwischen in der Einteilung HPV-positive und HPV-negative OPSCC unterschieden und somit erstmals einen nicht-anatomischen Risikofaktor für das Überleben berücksichtigt (Brierley et al., 2017; O'Sullivan et al., 2015).

#### **4.1.3.3. Tumoreigenschaften und Metastasierung**

Für die HPV-assoziierten Tumoren hat sich ergeben, dass sie im UICC-Stadium I und II unterrepräsentiert sind und sich signifikant häufiger im UICC-Stadium III finden. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die schnellere lokoregionäre Metastasierung HPV-assoziiierter OPSCC sein, da der Halslymphknotenstatus im Gegensatz zu Stadium I und II ab dem UICC-Stadium III positiv sein kann. Die Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC weisen signifikant häufiger lokoregionäre Metastasen (85,1%) auf verglichen mit Patienten mit HPV-negativen OPSCC (70,4%). Eine Studie aus zwei niederländischen Universitätskrankenhäusern hat für Patienten mit HPV-positiven OPSCC gezeigt, dass diese zwar häufiger kleiner sind aber häufiger Lymphknotenmetastasen aufweisen als HPV-negative OPSCC (Rietbergen et al., 2013). Entgegen dieses Resultates hat eine andere Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen positivem HPV-Status und Tumorstadium des OPSCC festgestellt (Licitra et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit ließen sich aus dem Gesamtkollektiv drei UICC-Gruppen für eine bessere statistische Auswertbarkeit zusammenfassen, die signifikante Unterschiede im Überleben aufwiesen: UICC-Stadium I –III, IVa und IVb-IVc. Für Patienten mit HPV-negativen OPSCC ergeben sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Überlebensunterschiede zwischen den drei zusammengefassten UICC-Gruppen, während für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC signifikante Überlebensunterschiede nur zwischen UICC I-III und IVb-IVc bestehen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine bessere Sensitivität HPV-positiver OPSCC für Chemotherapie und Chemoradiatio darstellen (Fakhry et al., 2008). Hierdurch könnten Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC im Stadium IVa und Stadium IVb und IVc und entsprechender Therapie, eine bessere Überlebensprognose erhalten haben und der Überlebensunterschied zwischen den Gruppen nicht mehr signifikant

sein im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Die detailliertere Untersuchung der Tumorausdehnung hat die Ergebnisse anderer Studien bestätigt, dass HPV-assoziierte OPSCC häufiger kleine (T1-T2) als große Tumorgößen (T3-T4) aufweisen (Ang et al., 2010; Rietbergen et al., 2013; Fakhry et al., 2008). Bei den HPV-negativen OPSCC ist kein signifikanter Unterschied der Verteilung auf die Tumorausdehnung nachweisbar. Eine mögliche Ursache für diesen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten könnte deren Ätiologie darstellen. Das HPV-negative OPSCC wird häufiger durch Tabak- und Alkoholkonsum verursacht und weist eine Häufung von Mutationen in Tumorsuppressorproteinen auf (Stransky et al., 2011). Dieses könnte zu schnellerem Tumorwachstum führen, wobei fortlaufender Alkohol- und Tabakkonsum das Tumorwachstum weiter fördern könnte. Eine weitere mögliche Erklärung stellt die schnellere lokoregionäre Metastasierung HPV-assoziiierter OPSCC dar (Andl et al., 1998; Paz et al., 1997). Diese führt früher zu vergrößerten Halslymphknoten und könnte einen früheren Arztbesuch und infolgedessen eine frühere Diagnose bereits kleiner Tumoren erklären. Die Analyse der Fernmetastasierung hat keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Tumorentitäten ergeben. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die schnellere Metastasierung nur für die Halslymphknoten, allerdings nicht für die Fernmetastasierung zutrifft. Möglicherweise ist hier die Lokalisation in den Tonsillen als lymphatisches Organ von Bedeutung, da Tumorzellen durch den lymphatischen Abstrom schneller in die lokalen Lymphknoten immigrieren können.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass HPV-positive HNSCC vor allem von den Tonsillen, aber auch vom Zungengrund ausgehen (Klussmann et al., 2003:1; Fakhry et al., 2008; Rietbergen et al., 2013). Ein Vergleich beider Tumorentitäten in der vorliegenden Arbeit zeigt Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, da signifikant häufiger HPV-assoziierte OPSCC (80,0%) in den Tonsillen lokalisiert sind als HPV-negative (37,4%).

#### **4.1.4. Analyse unterschiedlicher Therapieverfahren**

Bezüglich der Wahl einer mono- oder multimodalen Behandlung wurde kein Zusammenhang zum HPV-Status des Tumors festgestellt ( $p = 0,184$ ). Erkennbar ist jedoch, dass unter den HPV-assoziierten OPSCC der Anteil adjuvant therapierter Patienten höher liegt als bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC, auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant ist. Eine Vermutung hierfür ist die frühe lokoregionäre Metastasierung HPV-assoziiierter Tumoren. Des Weiteren sind keine signifikanten

Unterschiede in der Wahl einer Operation und dem HPV-Status der OPSCC ( $p = 0,085$ ) ermittelbar, obwohl innerhalb der HPV-assoziierten Tumoren prozentual ein höherer Anteil operiert wurde als innerhalb der HPV-negativen. Dieses könnte dadurch begründet werden, dass HPV-assoziierte Tumoren signifikant häufiger ein T1 und T2-Stadium aufweisen und eine Operation eher für kleine Tumoren gewählt worden ist, da die Operation eine höhere Wahrscheinlichkeit einer totalen Tumorresektion beinhaltet im Vergleich zu größeren Tumoren. Des Weiteren lassen sich die Ergebnisse dadurch erklären, dass sich derzeitige Therapieempfehlungen für das OPSCC nicht am HPV-Status orientieren, sondern vielmehr an der Tumorausdehnung und dem Status der Metastasierung ((NCCN Guidelines) Head and Neck Cancers. Version 2.2013 <http://www.nccn.org>, Stand 07.02.2016) (Panwar et al., 2014; Licitra et al., 2009). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten operierten Patienten weisen einen höheren Anteil mit signifikant besserem Leistungszustand und einem jüngeren Alter zum Diagnosezeitpunkt auf als nicht operierte Patienten. Dies könnte die Durchführung einer operativen Tumorresektion begünstigen und daher dazu beigetragen haben, dass für diese Patienten eher eine Operation gewählt wurde.

#### **4.1.5. Analyse des Überlebens nach Operation**

Es wurde eine multivariate Analyse durchgeführt mit dem Ergebnis, dass sich eine Operation als Therapieform positiv auf das Überleben von Patienten mit OPSCC auswirkt, unabhängig von den Faktoren HPV-Status, Leistungszustand nach ECOG und UICC-Stadium des Tumors. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Seikaly et al. überein, die den Vorteil für das Überleben nach einer Operation, allerdings in Verbindung mit adjuvanter Behandlung, für sowohl fortgeschrittene p16-positive als auch p16-negative OPSCC gezeigt hat (Seikaly et al., 2016). Die Überlebensanalyse von kurativ behandelten Patienten mit OPSCC in der vorliegenden Arbeit hat ergeben, dass operierte Patienten eine höhere 5-JÜR im Vergleich zu nicht operierten aufweisen. Das relative Sterberisiko für Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt mit operativer Therapie 83,9% niedriger als ohne Operation. Für Patienten mit HPV-negativen OPSCC liegt das relative Sterberisiko rund 60,3% niedriger nach Operation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC durch einen operativen Eingriff einen zusätzlichen Überlebensvorteil erhalten, im Vergleich zu solchen die mit primärer Chemoradiatio oder Radiatio therapiert wurden. Es ist jedoch zu beachten, dass die operierten Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC einen besseren Leistungszustand und kleinere Tumoren

hatten als solche, die eine primäre Chemoradiatio oder Radiatio bekommen haben. Allerdings stimmt das Ergebnis überein mit einer Studie an fortgeschrittenen OPSCC mit Tumorstadium III und IV. Diese hat gezeigt, dass eine multimodale Therapie mit Operation bei p16-positiven Patienten ein besseres 5-Jahres krankheitsspezifisches Überleben aufweist als das von p16-negativen Patienten mit gleichem Therapieregime und das von Patienten mit p16-positivem Status und Chemoradiatio (Seikaly et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich ein Überlebensvorteil durch Entfernung vom Tumor befallener Halslymphknoten und umliegendem Gewebe für sowohl Patienten mit HPV-assoziierten als auch HPV-negativen OPSCC gezeigt. Daher scheint der Status der regionären Metastasierung auch für das Überleben der Patienten mit HPV-assoziierten Patienten wichtig zu sein. Dieses Ergebnis widerspricht einer Studie, die gezeigt hat, dass der N-Status nur Einfluss auf die Prognose von Patienten mit HPV-negativen OPSCC hat, nicht aber auf die Prognose von Patienten mit HPV-positiven OPSCC (Rietbergen et al., 2013).

## **4.2. Experimenteller Teil**

### **4.2.1. Überlebensanalyse des Paarvergleich-Kollektivs**

Das Ergebnis, dass Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ein längeres Überleben aufweisen als Patienten mit HPV-negativen OPSCC haben zahlreiche Studien gezeigt (Ang et al., 2010; Licitra et al., 2006). Anhand von immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern für  $\beta$ -Catenin und p120ctn wurde in der vorliegenden Arbeit das Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC anhand des nukleären Nachweises der Catenine in Primärtumoren untersucht. Hierbei ist vor allem die Kernfärbung mit p120ctn in metastasierten Primärtumoren HPV-negativer OPSCC ein prognostisch schlechter Faktor für das Überleben. Die Zellkernfärbung mit p120ctn wurde auch in Pankreaskarzinomen (Mayerle et al., 2003) und oralen Karzinomen (Lo Muzio et al., 2002) mit niedrigerem Überleben in Verbindung gebracht. Die Ergebnisse hier könnten dafürsprechen, dass die Kernfärbung von p120ctn auch in OPSCC mit einem schlechteren Überleben, insbesondere von Patienten mit HPV-negativen OPSCC, assoziiert ist. Allerdings sollten die Ergebnisse aufgrund der geringen Stichprobengröße mit Vorsicht betrachtet werden. Für die Färbung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern von Primärtumoren mit Halslymphknotenmetastasen haben Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit Zellkernfärbung das beste Überleben. Patienten mit HPV-negativen OPSCC und Zellkernfärbung haben ein signifikant schlechteres Überleben.

Dieses wurde jedoch nicht für OPSCC ohne Halslymphknotenmetastasen gezeigt. Eine neuere Studie hat ebenfalls ein schlechteres Überleben von operierten Patienten mit HPV-negativen OPSCC und niedriger membranärer  $\beta$ -Catenin Expression sowie mit nukleärer  $\beta$ -Catenin Expression gezeigt (García-Pedrero et al., 2017).

#### **4.2.1. Immunhistochemischer Nachweis von $\beta$ -Catenin und p120ctn**

In Studien wurde gezeigt, dass  $\beta$ -Catenin in HPV-assoziierten Tonsillenkarzinomen überwiegend im Zellkern lokalisiert ist (Stenner et al., 2011). Dieses hat auch die Studie von Hu et al. (2015) an HPV-positiven und negativen Zelllinien von HNSCC gezeigt. Die Analyse der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte des Paarvergleich-Kollektivs hat keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC bezüglich der Lokalisation des  $\beta$ -Catenins im Tumorgewebe ergeben. Es fanden sich für  $\beta$ -Catenin weiterhin auch keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen Tumoren in der Häufigkeit der gefärbten Zellkerne. Für p120ctn konnte in der dichotomen Einteilung der Kernfärbung kein signifikanter Zusammenhang zum HPV-Status festgestellt werden. Es wurden jedoch mehr gefärbte Zellkerne in den HPV-assoziierten Tumoren detektiert als in den HPV-negativen. In den immunhistochemischen Färbungen wurde bei jedem Färbevorgang eine entsprechende Negativkontrolle durchgeführt (Kapitel 2.2.5.). Diese Kontrollen wiesen keine Färbungen auf und daraus ist zu schließen, dass es nicht zur Anfärbung unspezifischer Strukturen der Tumorschnitte gekommen ist. In den Tumorschnitten war häufig ein Teil des Plattenepithels nicht von Tumorzellen infiltriert, sodass eine interne Positivkontrolle mit normaler Membranfärbung der untersuchten Catenine zum Vergleich mit den Tumorabschnitten vorlag. Die Färbeintensität der Gewebeschnitte unterschied sich zum Teil deutlich voneinander. Dies wies jedoch keine Abhängigkeit zum HPV-Status auf. Ein möglicher Grund könnte der Zustand der in Paraffin eingebetteten Tumorschnitte sein, die je nach Alter und Einbettung/Fixierung unterschiedliche Qualitäten aufgewiesen haben könnten. Dies könnte dazu geführt haben, dass einige Tumoren den Antikörper schlechter gebunden und daher zu einer weniger intensiven Färbung geführt haben. Im Gegensatz zur immunhistochemischen  $\beta$ -Catenin Färbung wies die p120ctn Färbung eine signifikante Abhängigkeit zwischen Färbeintensität des Tumorschnittes und der Kernfärbung auf. Das Ergebnis, dass die Häufigkeit gefärbter Zellkerne in den p120ctn-Antikörper gefärbten OPSCC mit HPV-assoziiertem Status höher lag als in den HPV-negativen OPSCC, muss mit diesem Hintergrund kritisch betrachtet werden.

Bei keinem der untersuchten Tumoren waren die Catenine nur an der Zellmembran detektierbar. Die häufigste Lokalisation war das Zytoplasma. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass jeder Tumor Areale mit der Translokation der untersuchten Catenine aufweist, wenngleich der nukleäre Nachweis in geringerem Ausmaß festgestellt wurde als der im Zytoplasma. Die Lokalisation von p120ctn im Zytoplasma ist auch in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Chen et.al, 2015) sowie in lobulären Mammakarzinomen (Sarrío et. al., 2004) beschrieben wurden. Außerdem wird p120ctn im Zytoplasma eine Interaktion mit den GTPasen zugeschrieben, die für die Regulation der Zellstabilität und Zellmotilität eine wichtige Rolle spielen (zusammengefasst in Schackmann et al., 2013). Für  $\beta$ -Catenin wurde in HPV-16 positiven HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu den HPV-negativen zwar ein signifikant höherer Anteil an  $\beta$ -Catenin im Zellkern, nicht jedoch im Zytoplasma gezeigt (Hu et al., 2015). Die Ergebnisse von Stenner et al. (2011) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da keine Abhängigkeit der Translokation des  $\beta$ -Catenins vom HPV-Status nachgewiesen werden konnte. Die Expression von p120ctn im Zytoplasma war unabhängig vom HPV-Status nachweisbar. Ein möglicher Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse zur nukleären Lokalisation der beiden Catenine in Bezug zum HPV-Status, ist die kleine Gruppengröße des Kollektivs, da jeder einzelne Fall erheblichen Einfluss auf die Statistik hat.

### 4.3. Ausblick

Die hier diskutierten Ergebnisse lassen deutlich die unterschiedlichen Risikoprofile und Überlebensprognosen von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC erkennen. Der Alkohol- und Tabakkonsum erwiesen sich entgegen vieler anderer Studien (Ang et al., 2010; Rietbergen et al., 2013; Broglie et al., 2013) als keine signifikanten Faktoren für das Überleben. Als Risikofaktoren für das Überleben wurden jedoch der Leistungszustand, die Tumorgöße, sowie das Alter und die operative Therapie der Patienten ermittelt. Als ein prognostisch günstiger Faktor für das Überleben wurden die Operation und die Durchführung einer *Neck dissection* identifiziert. Trotz der bekannten Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC, gibt es bislang noch keine Therapierichtlinien für das Oropharynxkarzinom, die sich am HPV-Status orientieren. Es wären vor allem randomisierte klinische Studien notwendig, um sinnvolle Therapieleitlinien für das HPV-assoziierte und das HPV-negative OPSCC zu erarbeiten. Zurzeit werden weltweit einige prospektive Studien zu verschiedenen Deeskalations-Therapieverfahren an HPV-

assoziierten und HPV-negativen OPSCC durchgeführt oder befinden sich in Planung. Es bleibt daher abzuwarten, ob in Zukunft Therapieleitlinien an den HPV-Status angepasst werden. Ein erster Schritt ist jedoch zunächst die Unterscheidung der zwei Tumorentitäten des Oropharynxkarzinoms, wie sie kürzlich in der aktuellen Ausgabe des UICC umgesetzt wurde (Brierley et al., 2017; O'Sullivan et al., 2015).

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde durchgeführt, um an HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC zu untersuchen, wo  $\beta$ -Catenin und p120ctn im OPSCC-Tumorgewebe nachweisbar sind. Die Catenine tragen normalerweise an der Zellmembran zur Zellstabilität bei (Reynolds et al., 1994; Daniel et al., 1995). In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem HPV-Status der untersuchten Tumoren und der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn im Zellkern nachgewiesen werden. Es wurde jedoch immunhistochemisch der zytoplasmatische und teilweise auch der nukleäre Nachweis von  $\beta$ -Catenin und p120ctn erbracht. Offen bleibt jedoch die Frage, wovon die Lokalisation abhängt. Es wäre in weiteren Studien interessant, sowohl immunhistochemische als auch Immunfluoreszenzfärbungen für alle Schnitte anzuwenden, um die Lokalisation der beiden Catenine im Tumorgewebe genauer zu untersuchen. Des Weiteren können Antikörper für  $\beta$ -Catenin und p120ctn in Immunfluoreszenzfärbungen gleichzeitig auf einem Tumorschnitt gefärbt werden. Unterschiede zwischen der Lokalisation der Catenine können so besser am selben Tumorschnitt analysiert werden. Es sind weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv notwendig, um die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn in HPV-assoziierten und HPV-negativen Primärtumoren als auch Metastasen zu untersuchen, da dieses einen entscheidenden Schritt für die Entstehung von Metastasen darstellen und somit die Überlebensprognose der Patienten beeinflussen könnte.

## 5.0 Zusammenfassung

Das Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) wird anhand der Tumorentität in das HPV-assoziierte und das HPV-negative OPSCC untergliedert. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, Risikofaktoren für beide Tumorentitäten zu identifizieren und mögliche Überlebensunterschiede sowie molekulare Unterschiede zu untersuchen. Zur Erreichung der Ziele wurden die klinischen Daten von 396 Patienten mit invasiven OPSCC aus den Jahren 2000-2009 in Zusammenarbeit mit dem „Gießener Tumordokumentationssystem (GTDS)“ ausgewertet. Folgende Parameter wurden erhoben: Tumorstadium, anatomische Lokalisation, Geschlecht, Alter, Leistungszustand, Tabak- und Alkoholkonsum, Therapie und Überleben. Der HPV-Status der Tumor- und Metastasenproben wurde in Zusammenarbeit mit der „Abteilung für angewandte Tumorbiologie“ am Universitätsklinikum in Heidelberg analysiert. Für die molekulare Analyse wurden Patienten mit OPSCC der Tumorausdehnung T1-T3 einbezogen (n=40). Diese wurden nach Geschlecht, Tumorausdehnung und Alter gepaart. Im Paarvergleichs-Kollektiv waren 50% HPV-assoziierte und -negative OPSCC. Die Hälfte der OPSCC wies Lymphknotenmetastasen auf. Immunhistochemisch angefärbte Tumorschnitte wurden bezüglich der zellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und p120ctn untersucht und das Überleben anhand des Nachweises der Catenine im Zellkern der Primärtumoren analysiert.

In den Jahren 2000-2009 waren 20% der untersuchten OPSCC HPV-assoziiert. Unabhängig vom HPV-Status waren ein besserer Leistungszustand und jüngeres Alter, sowie die kurative Therapie mit Operation mit besserem Überleben assoziiert. Die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten betrug mit HPV-assoziierten OPSCC 79,1% und mit HPV-negativen 36,8%. HPV-assoziierte OPSCC waren häufiger in den Tonsillen lokalisiert, hatten kleinere Tumorausdehnungen und waren häufiger lokal metastasiert als HPV-negative. Patienten mit HPV-negativen OPSCC wiesen häufiger regelmäßigen Tabak- und Alkoholkonsum auf als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC ( $p \leq 0,001$ ).

Die molekulare Analyse der OPSCC hat ergeben, dass  $\beta$ -Catenin und p120ctn vor allem im Zytoplasma und teilweise in den Zellkernen nachweisbar waren. p120ctn im Zellkern metastasierter Primärtumoren war für Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten zukünftig in Risikomodellen für die Stratifizierung der Therapie eingesetzt werden.

## 5.1. Abstract

Squamous cell carcinoma of the oropharynx (OPSCC) are subdivided into two tumor entities: the HPV-related and the HPV-negative OPSCC. The aim of this thesis was to identify and examine the risk factors for both tumor entities, possible differences in survival and molecular differences. Therefore, the clinical data from 396 patients with invasive OPSCC from the years 2000-2009 have been analyzed in cooperation with "Gießener Tumordokumentationssystem, (GTDS)". Following parameters have been considered: tumor stage, anatomical location, sex, age, performance status, tobacco and alcohol consumption, therapy and overall survival. The HPV-status of the tumor and metastasis samples have been analyzed in cooperation with the department of Applied Tumor Biology at the Heidelberg University Hospital/Germany. For the molecular analysis, patients with OPSCC and tumor stage T1-T3 were included (n=40). The patients were matched according to tumor stage, age and sex. Half of the patients had HPV-related and the other half HPV-negative OPSCC. Fifty percent of the OPSCC did show cervical lymph node metastases. Tumor slices were stained by immunohistochemistry and analyzed in regard to cellular location of  $\beta$ -catenin and p120ctn. In addition, the survival of the patients was examined, according to the nuclear location of  $\beta$ -catenin and p120ctn in primary tumors.

In the years from 2000 – 2009, 20% of the analyzed OPSCC were HPV-related. Independent from the HPV-status, a better performance status, younger age as well as a curative therapy with surgery were found to be associated with a better survival. The 5-year survival rate of patients with HPV-related OPSCC resulted in 79.1% and for those with HPV-negative OPSCC in 36.8%. HPV-related OPSCC were located more frequently in the tonsils, had smaller tumor sizes and were more frequently locally metastasized than HPV-negative OPSCC. A higher number of patients, consuming tobacco and alcohol frequently, were found in patients with HPV-negative OPSCC, compared to patients with HPV-related OPSCC ( $p \leq 0,001$ ).

The molecular analysis has revealed, that  $\beta$ -catenin and p120ctn were mainly located in the cytoplasm and partially in the nucleus in the examined samples from OPSCC. The detection of p120ctn in the nucleus of metastasized primary tumors has been found to be associated with a reduced survival rate for patients with HPV-negative OPSCC. The results from this examination may be used as a tool for risk models and stratification of therapies in future.

## 6.0 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
AK	Antikörper
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
Axin	<i>axis inhibition protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
ca.	circa
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
CK1 $\alpha$	Casein Kinase 1 $\alpha$
cm	Zentimeter
c-Myc	Protoonkogen
CT	Computertomographie
cTNM	TNM aufgrund klinischer Untersuchungen festgelegt
CTNND1	Catenin D1 - Gen
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dishevelled	<i>Dishevelled-Protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group – performance status</i> , Leistungsfähigkeits-Status
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
E1 – E7	„ <i>early</i> “ <i>genes 1-7</i> , frühe Gene 1-7 des HPV-Genoms
E2F	Transkriptionsfaktor
FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Frizzled	Frizzled-Membranrezeptor
G1	gut differenziertes Tumorgewebe
G2	weder gut noch schlecht differenziertes Tumorgewebe
G3	schlecht differenziertes Tumorgewebe
GSK3	Glykogensynthase-Kinase-3
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem

---

GTPase	Enzym, das in der Zelle Prozesse steuern kann über die Bindung von Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP)
h	<i>hour</i> , Stunde
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> , Karzinome des Kopf- und Halsbereichs
HNO	Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Wasser
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV+	HPV-positiver Status/ HPV-assoziiertes Status
HPV-	HPV-negativer Status
HR	<i>Hazard ratio</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H3K27	Histon H3 Lysin 27 Demethylase
ICD-O	<i>International Classification of Diseases for Oncology</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
JÜR	Jahres-Überlebensrate
kDa	Kilodalton
LRP5/6-Rezeptor	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i> ,
L1, L2	<i>„late“ genes</i> , späte Gene des HPV-Genoms
KDM6B	Lysin Demethylase 6B
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEK	Methylethylketon
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MR	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

---

ND	<i>Neck dissection</i> , chirurgische Entfernung von Tumorzellen infiltrierter Lymphknoten und umliegendem Gewebe
n.d.	nicht definiert
NES	<i>nuclear export signal</i> , nukleäres Exportsignal
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , nukleäres Lokalisationssignal
NSCLC	Non-small cell lungcancer, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
N0	Nicht in die regionären Lymphknoten metastasiert
N+	in die regionären Lymphknoten metastasiert
OPSCC	<i>oropharyngeal squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom des Oropharynx
OT	Objekträger
PE	Probeexzision
pp120	phosphoryliertes p120 Catenin
pRb	phosphoryliertes Retinoblastomprotein (s. Rb)
pTNM	pathologisch gesichertes TNM
py	<i>pack years</i> , Packungsjahre
p120ctn	p120 Catenin
p16 = p16INK4a	CDK-Inhibitor 2A ( <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> ), Tumorsuppressorprotein
p53	Tumorsuppressorprotein
Rac	kleine GTPase
Radiatio	Strahlentherapie
Rb	Retinoblastomprotein, Tumorsuppressorprotein
RCT	Radiochemotherapie
Rho	kleine GTPase
RTP	Raumtemperatur
RT	<i>radiotherapy</i> , Bestrahlungstherapie
s	Sekunde
Siah-1	<i>siah E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
Snail	Transkriptionsfaktor
Slug	Transkriptionsfaktor
SPSS	Statistik- und Analyse-Software von IBM
Src-Tyrosinkinase	auch cSrc, für <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i> , Tyrosinkinase
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline mit Tween 20</i>

TCF/LEF	<i>T-cell-factor/lymphoid enhancer factor</i> , T-Zellfaktor und Lymphozyt-Steigerungsfaktor-Rezeptor
TNM	Klassifizierung zur Einteilung von Tumoren, wobei T für Tumorgröße/Tumorausdehnung, N für Lymphknotenmetastase und M für Fernmetastase steht
TRS	<i>Target retrieval solution</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> , internationale Organisation, die die TNM-Stadien organspezifisch zu sogenannten UICC-Gruppen zusammenfasst
ü.N.	über Nacht
ÜR	Überlebensrate
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
WNT	Zusammengesetzt aus <i>wingless</i> und <i>Int-1 Gen</i>
ZEB 1	<i>Zinkfinger E-Box-Bindung Homeobox 1</i> , Transkriptionsfaktor
°C	Grad Celsius

## 7.0 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Regulierung von p16INK4a (p16).....	4
Abbildung 2:	Der WNT-Signalweg.....	9
Abbildung 3:	Bildung des Paarvergleich-Kollektivs aus dem Gesamtkollektiv.....	19
Abbildung 4:	Zeitlicher Trend der HPV-Assoziation in OPSCC in den Jahren 2000-2009.....	29
Abbildung 5:	Darstellung der prozentualen Verteilung von den Risikofaktoren Rauchen (a) und Alkoholabusus (b) von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC..	30
Abbildung 6:	Prozentuale Verteilung kurativer Therapieformen von Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC..	33
Abbildung 7:	Überlebensunterschiede zwischen kurativ behandelten Patienten anhand des UICC-Stadiums.....	34
Abbildung 8:	Gesamtüberleben kurativ behandelter Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC (a) und kurativ behandelter Patienten mit und ohne Operation (b).....	35
Abbildung 9:	Immunhistochemische Färbung zur Analyse von $\beta$ -Catenin und p120ctn an der epithelialen Zellmembran von OPSCC.....	43
Abbildung 10:	Auflösung der Membranständigkeit von $\beta$ -Catenin in der immunhistochemischen Färbung eines HPV-negativen OPSCC.....	44
Abbildung 11:	Einteilung von homogen und inhomogen gefärbtem Zytoplasma von Tumoren mit zwei unterschiedlichen Färbeintensitäten.....	44
Abbildung 12:	Immunhistochemische Färbungen zur Analyse der nukleären Lokalisation von $\beta$ -Catenin und p120ctn.....	45
Abbildung 13:	Analyse des Überlebens der vier Gruppen des Paarvergleich-Kollektivs.....	50
Abbildung 14:	Analyse des Überlebens anhand von gefärbtem $\beta$ -Catenin im Zellkern.....	51
Abbildung 15:	Analyse des Überlebens anhand von gefärbtem p120ctn im Zellkern.....	52

Abbildung 16:	Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Lokalisation von $\beta$ -Catenin und p120 <sup>ctn</sup> an der epithelialen Zellmembran..	53
Abbildung 17:	Immunfluoreszenzfärbung einer HPV-assoziierten Metastase zur Darstellung gefärbter Zellkerne.....	53
Abbildung 18:	Immunfluoreszenzfärbung eines HPV-negativen OPSCC mit Auflösung der Membranständigkeit der Catenine.....	53

## 8.0 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte.....	13
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 3:	Chemikalien.....	15
Tabelle 4:	Lösungen und Puffer.....	15
Tabelle 5:	Primärantikörper.....	16
Tabelle 6:	Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 7:	Kits.....	16
Tabelle 8:	Software.....	16
Tabelle 9:	Entparaffinierung und Rehydrierung.....	21
Tabelle 10:	Dehydrierung der Tumorschnitte.....	22
Tabelle 11:	Sechste überarbeitete TNM-Klassifikation des OPSCC.....	26
Tabelle 12:	UICC-Stadien des OPSCC, Stand 2002.....	27
Tabelle 13:	Zeitlicher Trend der HPV-Assoziation von OPSCC-Patienten in den Jahren 2000-2009.....	28
Tabelle 14:	Analyse patientenbezogener Risikofaktoren in Relation zum HPV-Status des OPSCC.....	30
Tabelle 15:	Die Verteilung des HPV-Status auf unterschiedliche Lokalisationen, das Tumorstadium und den Metastasenstatus	31
Tabelle 16:	Analyse angewandter Therapiemodalitäten in beiden Tumorentitäten.....	32
Tabelle 17:	Vergleich des Überlebens der UICC-Stadien von kurativ behandelten Patienten (n=346).....	34
Tabelle 18:	Überleben von kurativ behandelten Patienten mit OPSCC (n=347) in Abhängigkeit von Risikofaktoren.....	36
Tabelle 19:	Analyse der Eigenschaften von Patienten mit Tumorexstirpation oder <i>Neck dissection</i> .....	37
Tabelle 20:	Analyse verschiedener Risikofaktoren für das Überleben kurativ behandelter Patienten mit HPV-assozierten und HPV- negativen OPSCC.....	39
Tabelle 21:	Bivariate Analyse zum Überleben von Patienten mit kurativer Therapie mit/ohne Operation unter Berücksichtigung des HPV-Status.....	40

Tabelle 22:	Multivariate Analyse zum Überleben kurativ behandelter Patienten in Abhängigkeit von weiteren Einflussfaktoren (HPV-Status, Tumorstadium, Leistungszustand).....	41
Tabelle 23:	Vergleich von Eigenschaften des Gesamtkollektivs und des Paarvergleich-Kollektivs.....	42
Tabelle 24a:	Deskriptive Analyse der immunhistochemischen Färbung für $\beta$ -Catenin.....	46
Tabelle 24b:	Analyse dichotomer Variablen zur Beurteilung von Unterschieden zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen als auch metastasierten und nicht metastasierten OPSCC für $\beta$ -Catenin.....	47
Tabelle 25a:	Deskriptive Analyse der immunhistochemischen Färbung für p120ctn.....	48
Tabelle 25b	Analyse dichotomer Variablen zur Beurteilung von Unterschieden zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen als auch metastasierten und nicht metastasierten OPSCC für p120ctn.....	48
Tabelle 26	Vergleich gefärbter Zellkerne im Primärtumor und der Metastase.....	49

## 9.0 Literaturverzeichnis

Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12): 3655–3663.

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, Treviño 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.

Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci.* 113 (Pt 8): 1319–1334.

Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX (1998). Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.* 58 (1): 5–13.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 363 (1): 24–35.

Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E (2010). The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer.* 126: 2879–2884.

Behrens J, Mareel MM, van Roy FM, Birchmeier W (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 108 (6): 2435–2447.

Bellamy D, Booker R (2011). Chronic obstructive pulmonary disease in primary care: All you need to know to manage COPD in your practice. Fourth Edition. London: Class Publishing (Class health).

Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, Bourredjem A, Baey C, Bourhis J, Pignon JP (2011). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): A comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol.* 100 (1): 33–40.

Boller K, Vestweber D, Kemler R (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 100 (1): 327–332.

Bonilla-Delgado J, Bulut G, Liu X, Cortes-Malagon EM, Schlegel R, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Chung SH, Lambert PF, Uren A, Gariglio P (2012). The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in skin epidermis in vivo. *Mol Cancer Res.* 10 (2): 250–258.

Boyer B, Vallés AM, Edme N (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol.* 60 (8): 1091–1099.

Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune WJH, Meijer CJLM, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004). Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 96 (13): 998–1006.

- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2017). TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Wiley-Blackwell: 22-29.
- Brogie MA, Soltermann A, Rohrbach D, Haile SR, Pawlita M, Studer G, Huber GF, Moch H, Stoeckli SJ (2013). Impact of p16, p53, smoking, and alcohol on survival in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with primary intensity-modulated chemoradiation. *Head Neck*. 35 (12): 1698–1706.
- Castaño J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, García de Herreros A, Duñach M (2007). Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol Cell Biol*. 27 (5): 1745–1757.
- 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, Altekrose S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 29 (32): 4294–4301.
- Chen H, Paradies NE, Fedor-Chaiken M, Brackenbury R (1997). E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J Cell Sci*. 110 (Pt 3): 345–356.
- Chen T, Wang C, Wu F, Zhang X, Yang H, Deng X, He Q, Li W, Li G (2015). Altered localization of p120 catenin in the cytoplasm rather than the membrane correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 10(3): e0118645. doi:10.1371/journal.pone.0118645.eCollection 2015.
- Cox DR (1972). Regression Models and Life-Tables. *J Royal Stat Soc. Series B (Methodological)* 34 (2): 187–220.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 18 (18): 2883–2891.
- Daniel JM, Reynolds AB (1995). The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol*. 15 (9): 4819–4824.
- Daniel JM, Reynolds AB (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol*. 19 (5): 3614–3623.
- Daniel JM (2007): Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta*. 1773 (1): 59–68.
- Devaiah A, Murchison C (2016). Analysis of 473 US head and neck cancer trials (1996-2014): Trends, gaps, and opportunities. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016 Feb;154(2):309-14. Epub 2015 Nov 17.
- Downer CS, Speight PM (1993). E-cadherin expression in normal, hyperplastic and malignant oral epithelium. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 29 (4): 303–305.
- Eklom P, Vestweber D, Kemler R (1986). Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu Rev Cell Biol*. 2 (1): 27–47.
- 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.

- Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, Tornillo L, Wolfensberger M, Terracciano LM (2010). Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer*. 126: 1256–1262.
- Fritz AG, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S (2000). International classification of diseases for oncology. ICD-O. Third Edition. Geneva: World Health Organization.
- Funayama N, Fagotto F, McCreas P, Gumbiner BM (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol*. 128 (5): 959–968.
- Gallin WJ, Edelman GM, Cunningham BA (1983). Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 80 (4): 1038–1042.
- García-Pedrero JM, García-Cabo P, Ángeles Villaronga M, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Allonca E, Rodrigo JP (2017). Prognostic significance of E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression in HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 39 (11): 2293-2300.
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 100 (6): 407–420.
- González MV, Pello MF, López-Larrea C, Suárez C, Menéndez M, Coto E (1995). Loss of heterozygosity and mutation analysis of the *p16* (9p21) and *p53* (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 1: 1043-1049.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2002). AJCC Cancer Staging Manual. Hg. v. Springer. Online verfügbar unter: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC6thEdCancerStagingManualPart1.pdf>, geprüft am 21.11.2018.
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci*. 114 (Pt 4): 695–707.
- Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E (2006). Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 119 (11): 2620–2623.
- Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, José Sánchez M, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJLM, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S, IARC Multicenter Oral Cancer Study Group (2003). Human papillomavirus and oral cancer: The international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*. 95 (23): 1772–1783.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281 (5382): 1509–1512.
- Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010). p16INK4a overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 127 (7): 1595–1602.

- Hu Z, Müller S, Qian G, Xu J, Kim S, Chen Z, Jiang N, Wang D, Zhang H, Saba NF, Shin DM, Chen ZG (2015). Human papillomavirus 16 oncoprotein regulates the translocation of  $\beta$ -catenin via the activation of epidermal growth factor receptor. *Cancer*. 121 (2): 214–225.
- IARC Working Group on Reversal of Risk After Quitting Smoking (2007). Reversal of risk after quitting smoking. Lyon, Geneva: International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press (IARC handbooks of cancer prevention, 11). Handbooks of Cancer Prevention, Vol. 11. 2007: p11.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 57 (1): 43–66.
- Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res*. 52 (10): 2980–2983.
- Jung YS, Kato I, Kim HRC (2013): A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial–mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 435 (3): 339–344.
- Kaplan EL, Meier P (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 53 (282): 457–481.
- Kelly KF, Daniel JM (2006). POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol*. 16 (11): 578–587.
- Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM (2004). NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J Cell Sci*. 117 (Pt 13): 2675–2686.
- Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003;1). Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*. 162 (3): 747–753.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003;2). Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different entity? *Med Microbiol Immunol*. 192: 129 – 132.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 275 (5307): 1784–1787.
- Licitra L, Felip E (2009). Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 20 Suppl 4: 121–122.
- Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S (2006). High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 24 (36): 5630–5636.
- Linder ME, Burr JG (1988). Nonmyristoylated p60v-src fails to phosphorylate proteins of 115–120 kDa in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85: 2608–2612.
- Liu Y, Wang Y, Zhang Y, Miao Y, Zhao Y, Zhang PX, Jiang GY, Zhang JY, Han Y, Lin XY, Yang LH, Li QC, Zhao C, Wang EH (2009). Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer*. 63 (3): 375–382.

- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Serpico R, Fanali S, De Rosa G, Piattelli A, Marigliò MA (2002). p120(cat) delocalization in cell lines of oral cancer. *Oral Oncol.* 38 (1): 64–72.
- Ma LW, Zhou ZT, He QB, Jiang WW (2012). Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression. *J Clin Pathol.* 65 (4): 315–319.
- Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK (2008). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer.* 112 (9): 2088–2100.
- Mayerle J, Friess H, Büchler MW, Schnekenburger J, Weiss FU, Zimmer KP, Domschke W, Lerch MM (2003). Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 124 (4): 949–960.
- McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K (2013). Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 110(40): 16175-16180.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destrée O, Clevers H (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell.* 86 (3): 391–399.
- Nagafuchi A, Takeichi M (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* 1 (1): 37–44.
- Nanan KK, Daniel JM (2012). Zbtb33 zinc finger and BTB domain containing 33. Updated March 7th, 2012, <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=944>, Stand 12.06.2016.
- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ährlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T (2009). Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 125 (2): 362–366.
- Näthke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol.* 134 (1): 165–179.
- NCCN Guidelines Head and Neck Cancers. Version 2.2013 <http://www.nccn.org>, Stand 07.02.2016.
- Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M, Ishizaki K (1994). Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 54 (12): 3107–3110.
- Nygård M, Aagnes B, Bray F, Møller B, Mork J (2012). Population-based evidence of increased survival in human papillomavirus-related head and neck cancer. *Eur J Cancer.* 48 (9): 1341–1346.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 5 (6): 649–655.

- O'Sullivan B, Brierley JD, D'Cruz AK, Fey MF, Pollock R, Vermorken JB, Huang SH (2015). *UICC Manual of Clinical Oncology*. Ninth Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8 (6): 1711–1717.
- Panwar A, Batra R, Lydiatt WM, Ganti AK (2014). Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. *Cancer Treat Rev.* 40 (2): 215–219.
- Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT, McCrea PD (2005). Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell.* 8 (6): 843–854.
- Patel SG, Shah JP (2005). TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.* 55 (4): 242–258.
- Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP (1997). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer.* 79 (3): 595–604.
- Pearson K (1900). X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos Mag.* 5 50 (302): 157–175.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 392 (6672): 190–193.
- Peyri ras N, Louvard D, Jacob F (1985). Characterization of antigens recognized by monoclonal and polyclonal antibodies directed against uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 82 (23): 8067–8071.
- Polakis P (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4 (5): a008052
- Prigge ES, Toth C, Dyckhoff G, Wagner S, M ller F, Wittekindt C, Freier K, Plinkert P, Hoffmann J, Vinokurova S, Klussmann JP, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M (2015). p16 INK4a /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. *Int J Cancer.* 136 (7): 1589–1599.
- Probst R, Grevers G, Iro H (2008). Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Dritte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Rampias T, Boutati E, Pectasides E, Sasaki C, Kountourakis P, Weinberger P, Psyri A (2010). Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 8 (3): 433–443.
- Rampias T, Sasaki C, Psyri A (2014). Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol.* 50 (5): 356–363.
- Reuschenbach M, Roos J, Panayotopoulos D, Baldus SE, Schn rch HG, Berger A, Petry KU, D rst M, Seiz M, von Knebel Doeberitz M, Hampl M; German Study Group for Coloscopy (2013). Characterization of squamous cell cancers of the vulvar anterior fourchette by human papillomavirus, p16INK4a, and p53. *J Low Genit Tract Dis.* 17 (3): 289–297.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol.* 14 (12): 8333–8342.

- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol.* 9 (2): 629–638.
- Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, Witte BI, Snijders PJ, Heideman DA, Boon D, Koljenovic S, Baatenburg-de Jong RJ, Leemans CR (2013). Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol.* 24 (11): 2740–2745.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272 (5264): 1023–1026.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 262 (5140): 1731–1734.
- Sarrió D, Pérez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suárez A, Cano A, Martín-Pérez J, Gamallo C, Palacios J (2004). Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene.* 23 (19): 3272–3283.
- Schackmann RC, Tenhagen M, van de Ven RA, Derksen PW (2013). p120-catenin in cancer – mechanisms, models and opportunities for intervention. *J Cell Sci.* 126 (Pt16): 3515 – 3525.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63(6): 1129-36.
- Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W (1991). E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 51 (23 Pt 1): 6328–6337.
- Seikaly H, Biron VL, Zhang H, O'Connell DA, Côté DW, Ansari K, Williams DC, Puttagunta L, Harris JR (2016). Role of primary surgery in the treatment of advanced oropharyngeal cancer. *Head Neck* 38 (Suppl 1): E571–E579. Epub 2015 Jul 14.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66 (1): 7-30.
- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T (2001). Inactivation of the p14ARF, p15INK4B and p16INK4A genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 37: 498-504.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96 (10): 5522–5527.
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007). A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer.* 121 (11): 2465–2472.
- Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, Daniel JM (2005). The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrixin. *Exp Cell Res.* 305 (2): 253–265.

- Stenner M, Yosef B, Huebbers CU, Preuss SF, Dienes HP, Speel EJ, Odenthal M, Klussmann JP (2011). Nuclear translocation of  $\beta$ -catenin and decreased expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: an early event in human papillomavirus-related tumour progression? *Histopathology*. 58 (7): 1117–1126.
- 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, Cortés ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareño 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.
- Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 12 (6): 418–424.
- Tetsu O, McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398 (6726): 422–426.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2 (6): 442–454.
- Trosman SJ, Koyfman SA, Ward MC, Al-Khudari S, Nwizu T, Greskovich JF, Lamarre ED, Scharpf J, Khan MJ, Lorenz RR, Adelstein DJ, Burkey BB (2015). Effect of human papillomavirus on patterns of distant metastatic failure in oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 141 (5): 457–462.
- van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F (1999). Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96 (14): 7980–7985.
- Vestweber D, Kemler R (1984). Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ*. 15 (2-4): 269–273.
- Vleminckx K, Wong E, Guger K, Rubinfeld B, Polakis P, Gumbiner BM (1997). Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein has signaling activity in *Xenopus laevis* embryos resulting in the induction of an ectopic dorsoanterior axis. *J Cell Biol*. 136 (2): 411–420.
- Volk T, Cohen O, Geiger B (1987). Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells. *Cell*. 50 (6): 987–994.
- Wagner S, Wittekindt C, Sharma SJ, Wuerdemann N, Jüttner T, Reuschenbach M, Prigge ES, Von Knebel Doeberitz M, Gattenlöhner S, Burkhardt E, Pons-Kühnemann J, Klussmann JP (2017). Human papillomavirus (HPV) association is the most important predictor in prognostic risk models for surgically treated patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Br J Cancer*. 116: 1604–1611.
- Watkinson JC, Gilbert RW (2012). Stell and Maran's textbook of head and neck surgery and oncology. Fifth edition. London: Hodder Arnold.
- Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP (2005). Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol*. 62: 72–80.

Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol.* 141 (3): 779–789.

Zur Hausen H (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 78: 1–30.

Zur Hausen, Ha (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2 (5): 342–350.

## 10.0 Publikationsverzeichnis

An der Datenerhebung und den Vorarbeiten für folgende Publikationen war ich beteiligt:

Wagner S, Wittekindt C, Sharma SJ, Wuerdemann N, Jüttner T, Reuschenbach M, Prigge ES, Von Knebel Doeberitz M, Gattenlöhner S, Burkhardt E, Pons-Kühnemann J, Klusmann JP (2017). Human papillomavirus (HPV) association is the most important predictor in prognostic risk models for surgically treated patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Br J Cancer*. 116: 1604–1611.

Wagner S, Wittekindt C, Sharma SJ, Wuerdemann N, Jüttner T, Reuschenbach M, Prigge ES, Von Knebel Doeberitz M, Gattenlöhner S, Burkhardt E, Pons-Kühnemann J, Klusmann JP (2018). Reply to 'Comment on 'Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer''. *Br J Cancer*. 118(3): e6.

Wittekindt C, Wagner S, Jüttner T, Klusmann JP: Staging und HPV assoziiertes Oropharynxkarzinom (2015). Meeting Abstract zum zur 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Berlin, 13.-16.05.2015. *Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House*; 2015. Doc15hnod281. Doi: 10.3205/15hnod281.

## Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Professor Dr. med. Claus Wittekindt für die Vergabe des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie das Korrekturlesen bedanken. Einen weiteren Dank möchte ich an Dr. rer. nat. Steffen Wagner richten für das zeitaufwändige Korrekturlesen und die schnellen, detaillierten und zuverlässigen Antworten bei Rückfragen, sowie die Betreuung während meiner Forschungszeit im Labor der HNO-Tumorforschung.

Ein großer Dank geht auch an Frau Maike Roth, die mir stets bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie war stets geduldig und hat sich immer Zeit für Fragen genommen und hat mit ihrem breiten Wissen über verschiedene Laborverfahren zum Gelingen der immunhistochemischen Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen beigetragen.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Ernst-Alfred Burkhardt für seinen Rat und die Hilfestellungen zur Berechnung der Statistik.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Stefan sowie meinen Freunden für die Unterstützung und die aufmunternden Worte während der Durchführung dieser Arbeit.