

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik – Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Retrospektive Analyse der HPV-Prävalenz bei Kopf-Hals-Tumoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin oder Zahnmedizin oder der physiologischen Wissenschaften
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ivonne Limburg
aus Köln

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 08.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	4
1 Einleitung / Ziel der Arbeit.....	7
2.1 Plattenepithelkarzinome des Oropharynx (OPSCC) Begriffsbestimmung und Epidemiologie.....	10
2.2 Ätiologie von OPSCC.....	11
2.3 Kanzerogenese durch humane Papillomaviren.....	12
2.4 Zellzyklusproteine als Surrogatmarker für den HPV-Nachweis.....	14
2.5 Zellzyklusproteine als Biomarker für das Überleben.....	17
2.6 Zellzyklusproteine als Biomarker für den Krankheitsverlauf.....	20
2.6.1 Zweittumoren (SPT) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen.....	21
2.6.2 Lymphknotenmetastasen (LKM), loko-regionäre Rezidive (LRR) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen.....	23
2.6.3 Fernmetastasen (DM) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen.....	24
3.1 Materialien.....	27
3.2 Ethikvotum.....	30
3.3 Patientenselektion.....	30
3.4 Anfertigung der Tissue-Microarrays (TMAs).....	31
3.5 Immunhistochemie.....	32
3.5.1 Etablierung des RB1-Antikörpers.....	33
3.5.2 Immunhistochemisches Verfahren und Färbeprotokoll.....	37
3.6 Analyse der Antigenexpression und Festlegung der Trennwerte.....	40
3.7 Datenerhebung.....	43
3.8 Statistische Auswertung.....	46
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Expressionskonsistenz der Zellzyklusproteine in den Progressen.....	49
4.2 Patientencharakteristika nach der Zellzyklusprotein-Expression.....	51

4.2.1	Patientencharakteristika nach dem p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus	51
4.2.2	Patientencharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus.....	53
4.2.3	Patientencharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus.....	54
4.2.4	Patientencharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus	56
4.3	Tumorcharakteristika der Zellzyklusprotein-Expression	57
4.3.1	Tumorcharakteristika nach dem p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus	57
4.3.2	Tumorcharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus.....	58
4.3.3	Tumorcharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus.....	60
4.3.4	Tumorcharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus	61
4.4	Krankheitsverlauf nach der Zellzyklusprotein-Expression	62
4.4.1	Krankheitsverlauf nach dem p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus	62
4.4.2	Krankheitsverlauf nach dem RB1-Expressionsstatus	64
4.4.3	Krankheitsverlauf nach dem p53-Expressionsstatus	66
4.4.4	Krankheitsverlauf nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus	67
4.5	Gesamtüberleben (OS)	69
4.5.1	Unterschiede im Gesamtüberleben (OS) nach Kovariablen	69
4.5.2	Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression.....	75
4.6	Zeit bis zum ersten Progress (TTP).....	82
4.6.1	Einfluss von Kovariablen.....	82
4.6.2	Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression.....	88
4.7	Überlebenszeit nach dem ersten Progress	93
4.7.1	Einfluss von Kovariablen.....	93
4.7.2	Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression.....	95
5	Diskussion.....	102
5.1	Assoziationen zwischen Patienteneigenschaften und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern.....	103
5.2	Assoziationen zwischen Tumorcharakteristika und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern.....	104

5.3	Assoziationen zwischen Parametern des Krankheitsverlaufes und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern.....	105
5.4	Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklus-Proteine und dem Gesamtüberleben.....	107
5.5	Assoziationen zwischen Zellzyklusprotein-Expressionsmustern und der Zeit bis zum ersten Progress.....	109
5.6	Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine und der Überlebenszeit nach dem ersten Progress.....	111
5.7	Effekt eines hohen Alkoholkonsums in den Überlebenszeit-Analysen.....	111
5.8	Kritische Wertung.....	112
5.9	Schlussfolgerung.....	117
6	Zusammenfassung.....	119
7	Anhang.....	121
7.1	Abbildungen.....	121
7.2	Datentabellen.....	127
8	Literaturverzeichnis.....	147
9	Danksagung.....	166
10	eigene Publikationen.....	167
11	Lebenslauf.....	168

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
CdK 4/6	Cyclin-abhängige Kinasen 4 und 6
CDKN2A, p16 ^{INK4a}	Cyclin-dependend kinase inhibitor 2A
CT-/MRT	Computertomographie/Magnetresonanztomographie
CUP	Cancer of Unknown Primary
DFS	Disease free survival
DM	Fernmetastase
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure
DSS	disease specific survival
E6	Early Protein 6
E7	Early Protein 7
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region
HR	Hazard Ratio
ISH	In situ Hybridisierung
KI	Konfidenzintervall
LRR	loko-regionäre Rezidive
MPT	multiple Primärtumoren
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, messenger Ribonukleinsäure
OPSCC	Plattenepithelkarzinom des Oropharynx
OS	Gesamtüberleben
PBS	Phosphate-buffered Saline
PFS	Progression free survival
RB1	5, Retinoblastoma Protein 1
RCT	Randomized Controlled Trials
SE	Standardfehler
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry
SPT	Zweitumor
Time To Progression	Zeit bis zum Progress
TMA	Tissue-Microarrays
TTP	Time To Progression
TuBa	Tumordatenbank
V	Cramers V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch.....	70
Abbildung 2: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Lebererkrankung – ja vs. nein	71
Abbildung 3: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit von der T-Stadium – T1–T2 vs. T3–T4	72
Abbildung 4: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom M1-Status – M0 vs. M1 .	74
Abbildung 5: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus	75
Abbildung 6: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus	77
Abbildung 7: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus .	79
Abbildung 8: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus	81
Abbildung 9: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch.....	83
Abbildung 10: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom T-Stadium – T1–T2 vs. T3–T4	84
Abbildung 11: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1 ...	85
Abbildung 12: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – männlich vs. weiblich.....	86
Abbildung 13: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – BMI ≤ 24,88 kg/m ² vs. BMI ≥ 24,90 kg/m ²	87
Abbildung 14: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus	88
Abbildung 15: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus.	90
Abbildung 16: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus..	91
Abbildung 17: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus	92
Abbildung 18: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – hoch vs. mäßig	94
Abbildung 19: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1	95

Abbildung 20: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} - Expressionsstatus	96
Abbildung 21: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom RB1- Expressionsstatus	97
Abbildung 22: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p53- Expressionsstatus	99
Abbildung 23: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Cyclin- D1-Expressionsstatus.....	100
Abbildung A1: Beispiel eines Tissue-Microarray (TMA).....	121
Abbildung A2 A und B: p16 ^{INK4a} -Immunhistochemie – p16 ^{INK4a} -Expression in gesunder Mundschleimhaut in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	121
Abbildung A2 C und D: p16 ^{INK4a} -Immunhistochemie – p16 ^{INK4a} -negatives Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	122
Abbildung A2 E und F: p16 ^{INK4a} -Immunhistochemie – nukleär und zytoplasmatisch stark p16 ^{INK4a} -immunreaktiver Tumor in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	122
Abbildung A3 A und B: RB1-Immunhistochemie – normale Mundschleimhaut in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	123
Abbildung A3 C und D: RB1-Immunhistochemie – Tumor mit RB1-Expressionsverlust in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	123
Abbildung A3 E und F: RB1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit normaler RB1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung	124
Abbildung A4 A und B: p53-Immunhistochemie – Ausschnitte von gesunder Mundschleimhaut in 5-facher und 20-facher Vergrößerung.....	124
Abbildung A4 C und D: p53-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) OPSCC mit normaler p53-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung.....	125
Abbildung A4 E und F: p53-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit p53-Überexpression in 5-facher und 20-facher Vergrößerung.....	125

Abbildung A5 A und B: Cyclin-D1-Immunhistochemie – suprabasale Cyclin-D1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung in gesunder Mundschleimhaut.....126

Abbildung A5 C und D: Cyclin-D1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit normaler Cyclin-D1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung.....126

Abbildung A5 E und F: Cyclin-D1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit Cyclin-D1-Überexpression in 5- und 20-facher Vergrößerung.....127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Trennwerte (Cut-off-Werte) für Überexpression bzw. Expressionsverlust	42
Tabelle 2 Expressionskonsistenz in den Progressen im Vergleich zum Primarius ...	49
Tabelle 3: Expressionskonsistenz der Zellzyklusproteine in den regionalen Lymphknoten-(LK)-Metastasen im Vergleich zum Primarius	50
Tabelle 4: Expressionskonsistenz in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} -Status	51
Tabelle 5: Patientencharakteristika nach dem p16 ^{INK4a} -Status	52
Tabelle 6: Patientencharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus des Primarius	53
Tabelle 7: Patientencharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus des Primarius	55
Tabelle 8: Patientencharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius	56
Tabelle 9: Tumorcharakteristika nach dem p16 ^{INK4a} -Status	57
Tabelle 10: Tumorcharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus des Primarius	59
Tabelle 11: Tumorcharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus des Primarius.	60
Tabelle 12: Tumorcharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius	61
Tabelle 13: Krankheitsverlauf nach dem p16 ^{INK4a} -Status.....	62
Tabelle 14: Fernmetastasen nach dem p16 ^{INK4a} -Status	64
Tabelle 15: Krankheitsverlauf nach RB1-Expressionsstatus	65
Tabelle 16: Krankheitsverlauf nach p53-Expressionstatus des Primarius	66
Tabelle 17: Krankheitsverlauf nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius	68
Tabelle 18: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch	70
Tabelle 19: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Lebererkrankung.....	72
Tabelle 20: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom T-Status – T1–T2 vs. T3–T4	73
Tabelle 21: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1	74
Tabelle 22: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus.....	76

Tabelle 23: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus	78
Tabelle 24: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus	80
Tabelle 25: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus.....	82
Tabelle 26: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch	83
Tabelle 27: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom T-Status – T1–T2 vs. T3–T4	84
Tabelle 28: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1	86
Tabelle 29: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – männlich vs. weiblich	87
Tabelle 30: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Body-Mass-Index – BMI \leq 24,88 kg/m ² vs. BMI \geq 24,90 kg/m ²	88
Tabelle 31: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p16 ^{INK4a} -Expressionsstatus.....	89
Tabelle 32: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus	91
Tabelle 33: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus	92
Tabelle 34: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus.....	93
Tabelle 35: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – hoch vs. mäßig.....	94
Tabelle 36: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1	95
Tabelle 37: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p16INK4a-Expressionsstatus	97
Tabelle 38: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus.....	98
Tabelle 39: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus.....	100

Tabelle 40: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus	101
Tabelle 41: Patienten- und Tumoreigenschaften (Teil 1).....	127
Tabelle 42: Patienten- und Tumoreigenschaften (Teil 2).....	129
Tabelle 43: Färbeergebnisse p16INK4a	130
Tabelle 44: Färbeergebnisse – RB1 (Teil 2).....	132
Tabelle 45: Färbeergebnisse – p53 (Teil 3).....	133
Tabelle 46: Färbeergebnisse Cyclin-D1 (Teil 4)	134
Tabelle 47: Expressionskonsistenz in den Progressen (Teil 5)	136
Tabelle 48: Färbeergebnisse nach Anteilen immunreaktiver Zellen (Teil 6)	137
Tabelle 49: : Krankheitsverlauf (Teil 1)	139
Tabelle 50: Krankheitsverlauf (Teil 2).....	141
Tabelle 51: Krankheitsverlauf (Teil 3).....	142
Tabelle 52: Krankheitsverlauf (Teil 4).....	144
Tabelle 53: Überlebenszeit-Analyse	145

1 Einleitung / Ziel der Arbeit

Oropharynx-Karzinome zeigen unter den Kopf-Hals-Tumoren eine hohe Mortalitätsrate (1). Dabei scheint die Ätiologie der Erkrankung bedeutsam zu sein. In einigen Studien korrelierte eine mit *High Risk* Typen humaner Papillomaviren (HPV) assoziierte Kanzerogenese (2) mit einem besseren Überleben der Patienten im Vergleich zu Patienten mit Oropharynx-Karzinomen anderer Genese. Dieser Befund hat auch zur Berücksichtigung des immunhistochemisch ermittelten p16^{INK4a}-Expressionsstatus (p16^{INK4a}-Status) bei Oropharynx-Karzinomen in der 8. Auflage der TNM-Klassifikation 2017 (3) (4) geführt. Der positive p16^{INK4a}-Status wird darin als Surrogatmarker für eine HPV-Beteiligung beim *Staging* eines Oropharynx-Karzinoms verwendet. Welche speziellen Charakteristika des Krankheitsverlaufes das bessere Überleben ausmachen und ob diese mit in der Diagnostik nachweisbaren Markern assoziiert sind, ist bislang weniger gut untersucht. Da sie jedoch Implikationen für die Therapie sowie auch für die Nachbeobachtung nach einem Oropharynx-Karzinom haben, sind sie von großer Bedeutung.

Das Zellzyklusprotein p16^{INK4a}, das u. a. als *Retinoblastoma protein1* (RB1)-abhängiger (5) Tumorsuppressor bekannt ist und Zellen bei anhaltenden onkogenen Bedingungen oder der dauerhaften Anwesenheit von Zellstressoren in den Zustand des irreversiblen Zellzyklusarrests (Seneszenz) bringt (6, 7), wird in HPV-assoziierten Tumoren charakteristischerweise stark exprimiert (8) und ist mittels Immunhistochemie nachweisbar. Diese Methode ist in der klinischen Routine gängig, wenn auch Kritik insbesondere aufgrund ihrer Spezifität an ihr geübt wird. Die alleinige p16^{INK4a}-Immunhistochemie zur Ermittlung des HPV-Status kann dazu führen, dass Patienten falsch als HPV-positiv klassifiziert werden (s. Kap. 2.4) (9) (10).

Neben der p16^{INK4a}-Expression hat Holzinger (11) auch die Zellzyklusproteine RB1, p53 und Cyclin-D1 mittels Immunhistochemie an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumormaterial als Surrogatmarker für die HPV-Beteiligung geprüft, indem sie die Expressionsmuster dieser Proteine in Bezug auf den molekularpathologisch an frisch gefrorenem Tumormaterial ermittelten HPV-Status auswertete (s. Kap. 2.4). Diese Proteine sind im Zusammenhang mit einer HPV-assoziierten Kanzerogenese interessant, weil RB1 und p53 Ziele der viralen Proteine sind (12) (13) und Cyclin-D1 RB1-abhängig exprimiert wird (s. Kap. 2.3) (14). Holzinger

hat typische Expressionsmuster für p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 in HPV-positiven versus HPV-negativen Oropharynx-Karzinomen beschrieben. In HPV-positiven Tumoren fand sie mehrheitlich p16^{INK4a} stark, RB1 schwach und p53 sowie Cyclin-D1 normal oder schwach exprimiert. In HPV-negativen Tumoren war p16^{INK4a} trotz Signalverstärkung nicht nachweisbar, RB1 normal (d. h. stark) sowie p53 und Cyclin-D1 jeweils stark exprimiert im Sinne einer Überexpression (11).

Fragestellungen

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Analyse von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, die in den Jahren 2008 bis 2013 an der Universitätsmedizin Mainz erstmalig diagnostiziert wurden. Es werden FFPE-Gewebeproben aus Primärtumoren und – sofern vorliegend – aus korrespondierenden Progressen, d. h. im Zusammenhang mit dem Oropharynx-Karzinom aufgetretene loko-regionäre Rezidive, Fernmetastasen und Zweittumore, immunhistochemisch gefärbt und in Bezug auf den Expressionsstatus von p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 ausgewertet. Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen werden anschließend explorativ mit den klinischen Patientendaten aus dem Krankenhausinformationssystem (KIS) und den Patientenakten korreliert.

Assoziation der Expression von p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 mit dem Krankheitsverlauf

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob es Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 und verschiedenen Parametern des Krankheitsverlaufes gibt. Diese sind neben den Tumoreigenschaften insbesondere das Entstehen von loko-regionären Rezidiven, Fernmetastasen und Zweittumoren sowie die Gesamtüberlebenszeit, die Zeit bis zum ersten Progress, definiert als loko-regionäres Rezidiv, Fernmetastasen oder Zweittumor, und die Überlebenszeit nach erfolgtem Progress. In den Überlebenszeitanalysen werden außerdem im Rahmen multivariater Cox-Regressionen Effekte von Expressionsmustern auf die jeweiligen Überlebenszeiten getestet. Dieses ist relevant, weil sich hieraus Implikationen für die Nachsorge ergeben könnten.

Assoziation der Expression von p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 mit dem HPV-Status

Darüber hinaus wird untersucht, ob sich die Assoziationen der von Holzinger (11) beschriebenen Expressionsmuster mit dem HPV-Status in der vorliegenden Stichprobe bestätigen. Als Surrogatmarker für den HPV-Status wird dabei, der klinischen Routine folgend, die p16^{INK4a}-Expression ($\geq 70\%$ nukleär und zytoplasmatisch immunreaktive Zellen) verwendet (15).

Konsistenz der Expressionsmuster zwischen Primärtumoren und Progressen

In Bezug auf die p16^{INK4a}-Überexpression in HPV-assoziierten Tumoren haben Mehrad et al. (16) in ihrer Studie festgestellt, dass sich die p16^{INK4a}-Überexpression in den Fernmetastasen der Patienten gleichermaßen darstellt wie in ihrem Primarius (s. Kap. 2.4). Die vorliegende Studie stellt daher die Frage, ob in den HPV-assoziierten Tumoren die Expressionsmuster der Zellzyklusproteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 in den Progressen der Patienten konsistenter sind als in den Noxen-assoziierten Oropharynx-Karzinomen. Dieses könnte in *Cancer of Unknown Primary (CUP)*-Syndromen und zur Differenzierung zwischen Fernmetastase und Zweittumor diagnostische Bedeutung haben, wenn ihre Expressionsmuster in den Progressen (definiert als loko-regionäre Rezidive, Fernmetastasen, Zweittumoren) denen des Primarius gleichen. Darüber hinaus liegen für die vorliegende Studie in einigen Fällen nur Proben aus Progressen der Patienten anstatt aus ihrem Primarius vor, so dass es sich hierbei auch um einen Vorversuch handelt, mithilfe dessen bestimmt wird, ob die vormals genannten Fragestellungen anhand der Proben aus Progressen überhaupt untersucht werden können.

2 Literaturdiskussion

2.1 Plattenepithelkarzinome des Oropharynx (OPSCC) Begriffsbestimmung und Epidemiologie

Bei OPSCC handelt sich um Karzinome des Mundrachens. Dieser reicht vom Zungengrund (C01) und den Vallecula (C10.0) über die Tonsillen (C09.9), die Fossa tonsillaris (C09.0), den Gaumenbögen (C09.1), die Glossotonsillarfurche (C09.1) und die Rachenhinterwand (C10.3) bis zum weichen Gaumen (C05.1) und zur Uvula (C05.2) (4). In der vorliegenden Studie werden ausschließlich OPSCC untersucht. Karzinome mit Adenodifferenzierung sind ausgeschlossen.

Der Anteil der Oropharynx-Karzinome an der gesamten Karzinominzidenz, d. h. auch an denen außerhalb der Kopf-Hals-Region, betrug 2018 nach GLOBOCAN-Schätzungen der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) weltweit 0,5% (17). Gleichmaßen hoch waren die Sterberaten (17). Ihr Anteil an den Malignomen unabhängig von der Kopf-Hals-Region ist daher vergleichsweise gering. Im GLOBOCAN-Report von 2012 ist das OPSCC nicht explizit genannt (18).

Nach Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Institutes (1) waren für das Jahr 2014 in der Bundesrepublik Deutschland bei Männern von 12.660 Kopf-Hals-Tumoren 3632 Oropharynx-Karzinome. Bei den Frauen betrug der OPSCC-Anteil 1202 von 4560 Kopf-Hals-Tumoren. Damit war das OPSCC bei den Männern das häufigste diagnostizierte Malignom des Kopf-Hals-Bereiches und bei Frauen das zweithäufigste hinter Mundhöhlen- und Lippenkarzinomen. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei beiden Geschlechtern bei 62 Jahren. Die Sterbefälle waren für das OPSCC bei beiden Geschlechtern am höchsten im Vergleich zu den anderen Kopf-Hals-Malignomen (1). Insbesondere bei den Frauen zeigt sich die Inzidenz des OPSCCs seit 1999 steigend (1). In dieser Studie wurden allerdings Karzinome des harten Gaumens zu den OPSCCs gezählt, was der oben genannten Definition widerspricht.

Humane Papillomaviren haben in der Vergangenheit zunehmend Bedeutung in der Entstehung von OPSCC gewonnen, wie in verschiedenen Prävalenzstudien gezeigt werden konnte (19). Eine deutsche Studie von Wuerdemann et al., die 599 Oropharynx-Karzinome während des Zeitraumes 2000-2015 untersuchte, zeigte eine

HPV-Prävalenz von 25% mit insbesondere seit 2008 steigender Tendenz (20). Mehanna et al. zeigten in einer Meta-Analyse einen Anstieg der HPV-Prävalenz in OPSCC für Nordamerika und Europa. Dabei ist die Prävalenz insgesamt von 40,5% vor dem Jahr 2000 auf 72,2% im Zeitraum 2005-2009 gestiegen(21). Da die Ständige Impfkommission (STIKO) seit 2007 die HPV-Vakzinierung für Mädchen und seit 2018 auch für Jungen jeweils im Alter zwischen 9 und 14 Jahren empfiehlt (22), ist zu erwarten, dass der Anteil HPV-induzierter Malignome einschließlich HPV-induzierter OPSCC zurückgehen wird. Bis dahin gilt es jedoch mit den bislang steigenden Zahlen und der im Vergleich höheren Mortalität umzugehen.

2.2 Ätiologie von OPSCC

Bei der Ätiologie von OPSCC werden Noxen- vs. HPV-assoziierte Karzinome unterschieden. Westra et al. (23) haben in einer prospektiven multizentrischen Studie an 89 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) den HPV Typ 16-Status mittels In situ Hybridisierung (ISH) erhoben und anschließend die Tumoren mit positivem HPV-Status auf das Vorhandensein und die Art von Mutationen im p53-Gen untersucht. Der HPV-Status korrelierte dabei invers mit dem Vorliegen disruptiver p53-Mutationen, die als „Stopp-Mutationen, *Frameshift*-Mutationen und nicht-konservative Mutationen“ in der L2/L3-Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Bindedomäne¹ definiert waren (23). Sie verhindern die Bindung von p53 an die DNA und führen zur malignen Transformation von Zellen, ohne weiterer Ereignisse zu bedürfen. Diese Arten von Mutationen wurden ausschließlich in HPV-negativen Tumoren gefunden, die nach Gillison et al. eher Noxen-assoziiert sind (24). Nach Westra et al. zeigten sich auch in den 12 von 89 Tumoren, die in der ISH positiv für HPV Typ 16 waren, p53-Mutationen. Diese waren jedoch alle nicht disruptiv, was dafür spricht, dass weitere inaktivierende Ereignisse in diesen Tumoren eine wichtige Rolle spielen, wie das Vorhandensein von HPV 16 und seiner p53- und Retinoblastom-Protein-(RB)-1-inaktivierenden Early Proteine E6 und E7 (23, 25).

¹ Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14(2): 366-9. S. 369.

In Bezug auf die für das OPSCC wichtigsten Risikofaktoren fanden Gillison et al. (24) in einer Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation zwischen HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) und dem Sexualverhalten, wobei die Assoziation stärker wurde mit zunehmender Zahl an oral-genitalen Partnern. Eine weitere Assoziation bestand zwischen HPV-positiven HNSCC und Marihuana-Konsum. Für HPV-negative HNSCC konnten sie keine Assoziation mit dem Sexualverhalten feststellen, allerdings fanden sie eine Assoziation mit dem Tabak- und Alkoholkonsum, wobei auch hier die Assoziation mit zunehmender Dauer und Intensität des Konsums stärker wurde. Eine weitere Assoziation für HPV-negative HNSCC bestand mit einer schlechten Mundhygiene gemessen am Zahnverlust (24).

Die Genom-Analysen des Projektes „*The Cancer Genome Atlas Network*“ zeigen für Nikotin-assoziierte Kopf-Hals-Tumoren unter anderem *Loss-of-function*-Mutationen im p53-Gen sowie eine Inaktivierung des Cyclin-dependend kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16^{INK4a})-Gens und Amplifikationen von 3q26/28 und 11q13/22. In HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren dominieren Mutationen des Onkogens Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PKI3CA), Amplifikationen des Gens für den Transkriptionsfaktor E2F1 sowie der Verlust des Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 3-(TRAF3)-Gens (26).

2.3 Kanzerogenese durch humane Papillomaviren

Bei Humanen Papillomaviren (HPV) handelt es sich um unbehüllte DNA-Viren. Nach der Papillomavirus-Genom-Datenbank des NIAID/NIH (27) (28) sind 225 Typen bekannt, von denen der Großteil, insbesondere die Typen der Gruppen Beta und Gamma, beim Immunkompetenten keine klinisch apparenten Infektionen verursachen (29-33). Aufgrund ihrer DNA-Sequenz unterscheidet man fünf Gruppen (Alpha-, Beta-, Gamma-, Nu-, Mu-Papillomavirus) (34). Klinisch relevant sind einerseits die *Low Risk*-Typen (unter anderem Typ 6 und Typ 11), die benigne Läsionen verursachen, wie bspw. Hautwarzen (35), genitale Kondylome (36, 37) oder Papillomatosen des Respirationstraktes (38), und andererseits jene HPV-Typen, die aufgrund struktureller Besonderheiten insbesondere ihrer Proteine E6 und E7 direkt kanzerogen wirken (*High Risk* Typen, bspw. Typ 16 und 18) (39-42). Eine Metaanalyse der IARC zeigt

neben den Typen 6 und 11 folgende HPV-Typen prävalent in Cervix-Karzinomen: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 und 82 (43). Neben Cervix- (44) und Oropharynx-Karzinomen (45) sind *High Risk* HPV-Typen außerdem unter anderem mit Anal- (46) und Penis-Karzinomen (47) assoziiert (48).

Humane Papillomaviren infizieren die Stammzellen der Basalschicht von Epithelien nach Mikroläsionen oder an Prädilektionsstellen (z. B. lymphoepitheliales Gewebe der Tonsilla palatina oder des Waldeyerschen Rachenrings) (25). Während *Low Risk* HPV-Typen zur Replikation sich eigenständig differenzierende Zellen (z. B. bei der Wundheilung) benötigen, können *High Risk* HPV-Typen den Zellzyklus selbst antreiben. Dieser wichtige Unterschied kommt zustande, weil sich die Proteine E6 und E7 der *High Risk* Typen unter anderem in ihren Bindungseigenschaften von denen der *Low Risk* Typen unterscheiden.

Den *Early Proteins* E6 und E7 (E6, E7) kommt die entscheidendste Rolle in der Kanzerogenese zu. Das E7 der *High Risk* Typen bindet RB1, p107 und pRB2/p130 (12, 39, 49-51). Physiologischer Weise binden diese an die Transkriptionsfaktoren E2F, die zur Expression zahlreicher u.a. S-Phase Gene führen, und inhibieren diese (49, 52-54). Bindet E7 RB1, p107 und pRB2/p130 werden E2F-Transkriptionsfaktoren frei und die Zelle wird aus der G1-Phase in die S-Phase überführt. P16^{INK4a}, wirkt *upstream* von RB1 als Tumorsuppressor, indem es die Cyclin abhängigen Kinasen 4 und 6 (CdK 4/6) durch ihre Bindung inhibiert. Sind CdK 4 und 6 frei, bilden sie einen Komplex mit Cyclin-D1, das ab der frühen G1-Phase exprimiert wird (55, 56). Dieser Komplex wiederum phosphoryliert RB1 (bzw. p107 und pRB2/p130), das in der Folge von E2F dissoziiert. P16^{INK4a} braucht demzufolge ein funktionales RB1, um als Tumorsuppressor wirken zu können (5). Aufgrund der Bindung von RB1 durch E7 wird auch Cyclin-D1 vermindert exprimiert. In Zellkulturexperimenten zeigte sich eine Abhängigkeit von Cyclin-D1 Expression von einem funktionsfähigen RB1 (14). E6 führt durch Bindung von p53 zu dessen proteasomalen Degradierung (13, 57, 58). P53 hat physiologischerweise die Aufgabe als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus nach Replikation zur Reparation von Replikationsfehlern oder DNA-Schäden zu stoppen (Zellzyklusarrest) bzw. die Transkription von pro-apoptotischen Genen einzuleiten (49, 59). Durch Degradierung von p53 inhibiert E6 daher den Zellzyklusarrest und die Apoptose. Anhand von Zellkulturexperimenten an immortalisierten Keratinozyten konnten Smeets et al. die kanzerogenen Effekte der viralen Proteine E6 und E7 zeigen.

E6 verlängerte dabei die Lebensspanne der Zellen vergleichbar mit p53-*Knockdown*- oder disruptiven p53-Mutationen, während E7 alleine keinen Effekt auf die Lebensspanne der Zellen zeigte, sondern nur in Verbindung mit E6, oder aber anderen p53-inaktivierenden Ereignissen (60).

Darüber hinaus haben E6 und E7 scheinbar weitere kanzerogene Effekte. So kann insbesondere E6 auf vielfältige Weise die Aktivität der Telomerase induzieren (58, 61). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass E6 und E7 mit der Immuninteraktion interferieren (58, 62).

2.4 Zellzyklusproteine als Surrogatmarker für den HPV-Nachweis

In ihrer Dissertation hat Holzinger (11) Marker untersucht, die eine aktive HPV-Beteiligung bei OPSCC am sensitivsten in frisch gefrorenem Material und in Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe nachweisen können. Für den viralen Nachweis an frisch gefrorenem Tumormaterial hat sie die HPV-DNA, E6*I- und E6*II-messenger-Ribonukleinsäure(mRNA), sowie die in Cervix-Karzinomen nachgewiesenen RNA-Muster analysiert. In FFPE-Material hat sie die Expression der Proteine p16^{INK4a}, RB1, Cyclin-D1 und p53 als zelluläre, d. h. indirekte Marker mittels Immunhistochemie untersucht. Als sensitivster Marker von allen stellte sich das virale RNA-Muster zum HPV-Nachweis heraus. Mit diesem hatte die Kombination aus hoher p16^{INK4a} – bei niedriger RB1-Expression im FFPE-Material die stärkste Assoziation und zeigte mit einer Sensitivität von 79% und einer Spezifität von 94% auch die höchsten prädiktiven Werte (11). Sie schlussfolgerte daraus, dass für FFPE-Tumoren die Expression von p16^{INK4a} und RB1 in Verbindung mit dem HPV-DNA Nachweis besser zur Ermittlung des HPV-Status geeignet seien als der alleinige p16^{INK4a}-Expressionsstatus. P16^{INK4a} war in ihrer Studie auch bei 17% der HPV-DNA und HPV-RNA negativen Tumoren überexprimiert. 20% der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung überexprimierten p16^{INK4a} außerdem nicht (11).

Plath et al. (63) griffen die von Holzinger geprüfte Proteinkombination in Verbindung mit dem HPV-DNA-Nachweis auf und untersuchten diese ebenfalls als Surrogatmarker für eine HPV-Beteiligung. Dabei fanden sie allein für p16^{INK4a} die höchste diagnostische *Odds Ratio*, in Bezug auf die HPV-DNA-Positivität. Auch die

Kombination aus p16^{INK4a} hoch/RB1 niedrig, die in Holzingers Studie in Verbindung mit HPV-DNA am sensitivsten für den HPV-Nachweis war, konnte in der Studie von Plath et al. HPV-DNA nicht so gut vorhersagen wie die p16^{INK4a} -Positivität allein.

Castellsague et al. haben die HPV-DNA/E6*I-mRNA-positiven Tumoren zur weiteren Evaluation der Surrogatmarker mit p16^{INK4a}, RB1, p53, Cyclin-D1 gefärbt und dabei die stärkste Assoziation mit dem Goldstandard (Nachweis von HPV-DNA und E6*I-mRNA) für die p16^{INK4a}-Überexpression gefunden. Sie schlossen daraus, dass p16^{INK4a} zusätzlich zu dem HPV-DNA/E6*I-mRNA-Nachweis die beste Aussagekraft hinsichtlich einer HPV-Kanzerogenese hat (64).

Erstmals Empfehlungen zur Verwendung von p16^{INK4a}-Immunhistochemie als Surrogatmarker für eine HPV-Beteiligung haben El Naggar et al. (65) formuliert, wonach die Färbung „einheitlich und stark“ sowie „nukleär UND zytoplasmatisch“ in den „meisten oder allen Tumorzellen von basaloiden oder partiell keratinisierenden OPSCC“² vorliegen musste, um einen direkten HPV-Nachweis ersetzen zu können (65). Einen *Cut-off*-Wert bezüglich des Anteils immunreaktiver Zellen gaben sie dabei nicht an. Hierfür ermittelten Larsen et al. in ihrem systematischen Review, dass ab einem Trennwert (*Cut-off*-Wert) von mindestens 70% nukleär UND zytoplasmatisch gefärbter Zellen die p16^{INK4a}-Immunhistochemie die höchste Sensitivität erreicht, um eine HPV-Positivität vorherzusagen (15).

In einem weiteren systematischen Review von Jouhi et al. betrug die mediane Sensitivität eines positiven p16^{INK4a}-Expressionsstatus als Surrogatmarker 95,4% und die mediane Spezifität 87,3%. Demnach besteht die Gefahr, dass HPV-negative Tumoren fälschlicherweise als HPV-positiv bewertet werden (9). Sollte es in Zukunft zur Therapie-Deeskalation für HPV-positive Tumoren kommen, bestünde für diese Patienten ein Risiko unzureichend therapiert zu werden. Doescher et al. empfehlen daher, Tumoren erst nach einem immunhistochemischen und einem weiteren molekularpathologischen Nachweis als HPV-getrieben einzustufen (66).

Dennoch lauten die aktuellen Empfehlungen der Amerikanischen Gesellschaft für klinische Onkologie (ASCO), bei denen es sich um eine Ergänzung der Leitlinie des College amerikanischer Pathologen aus dem Jahr 2018 handelt, für

² El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 2012; 34(4): 459-61. S. 461.

Plattenepithelkarzinome des Oropharynx – und nur für diese –, den p16^{INK4a} -Status als HPV-Status zu verwenden (10). Handelt es sich jedoch um einen multifokalen, den Oropharynx einbeziehenden Tumor (10) oder um ein CUP-Syndrom mit mindestens 70% p16^{INK4a}-Positivität (10), so sei ein direkter HPV-Nachweis zu erbringen.

Als Indikatoren für eine HPV-Negativität fanden Dreyer et al. eine hohe RB1-Expression allein oder eine hohe kombinierte RB1/Cyclin-D1-Expression, da die beiden Expressionsmuster ausschließlich in HPV-DNA-negativen HNSCC vorkamen (67). Bedeutsam für die Verwendung von p53 und Cyclin-D1 im Rahmen einer möglichen Diagnostik ist, dass von der Immunhistochemie nicht auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Mutationen bzw. Amplifikationen zu schließen ist. Gotte et al. (68) untersuchten anhand von 39 HNSCC die Beziehung zwischen *Loss-of-Heterozygosity* (LOH), p53-Mutationen und p53-Überexpressionen, wobei nur 35% der Tumoren mit Überexpression eine p53-Mutation aufwiesen. Dabei führten *Missense*-Mutationen zu einer Überexpression, während *Nonsense*-Mutationen dieses nur in Ausnahmen taten. Auch Van Houten et al. zeigten in 14 HNSCC p53-Überexpression nur in Fällen von *Missense*-Mutationen (69), wobei dieses nicht ihre Hauptfragestellung, sondern vielmehr ein Nebenbefund war, der jedoch für die vorliegende Arbeit relevant ist. Mineta et al. (70) fanden anhand von 77 Tumoren hingegen keine Korrelation zwischen einer p53-Überexpression und -Mutation. Auch bei Taylor et al. betrug die Korrelationsrate zwischen p53-Überexpression und p53-Genmutation nur 59% (71). Für Cyclin-D1 untersuchten Akervall et al. (72) eine mögliche Korrelation zwischen einer Gen-Amplifikation und Überexpression. Es zeigten jedoch mehrheitlich Tumoren ohne Gen-Amplifikation eine Cyclin-D1-Überexpression, so dass die Autoren weitere Mechanismen neben der Gen-Amplifikation vermuten, die immunhistochemisch zu einer Überexpression von Cyclin-D1 führen. Von einer Cyclin-D1-Überexpression kann daher nicht auf den molekularen Mechanismus rückgeschlossen werden. Es zeigten sowohl Patienten mit Überexpression als auch Patienten mit Gen-Amplifikation jeweils eine schlechtere Prognose.

Einen anderen Beitrag zur Immunhistochemie in der HPV-Diagnostik konnten Mehrad et al. (16) in ihrer Studie zeigen. Sie untersuchten in 20 Patienten Proben aus dem Primarius und einer korrespondierenden Fernmetastase (engl. *distant metastasis*, DM). Zumeist handelte es sich dabei um Lungenmetastasen. An beiden Proben haben

sie je eine Realtime-PCR zum Nachweis der mRNA der Virusproteine E6- und E7 durchgeführt sowie den immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a}. Sowohl die mRNA der Virusproteine als auch die p16^{INK4a}-Überexpression waren konsistent zum Primarius in den Metastasen nachweisbar. Auch der HPV-Typ in den Metastasen entsprach dem des Primarius. Sie schlussfolgerten daraus, dass sich der HPV-Status in der Metastase eignet, um diese von einem Zweitumor (sekundärer Primärtumor, SPT) abzugrenzen. In einer Auswertung von 17 Oropharynx-Karzinomen und korrespondierender zervikaler Lymphknotenmetastasen fanden Laborde et al. zwar eine starke Korrelation in Bezug auf den p16-Status, allerdings war dieser in 2 von 17 Fällen in der Metastase im Vergleich zu dem des Primarius negativ ((73), Suppl. Tabelle 3).

2.5 Zellzyklusproteine als Biomarker für das Überleben

Im Folgenden werden Studien, die Zusammenhänge oder Effekte zwischen den jeweiligen Expressionsmustern der Proteine mit dem Überleben untersucht haben, vorgestellt. Es werden zahlreiche unterschiedliche Definitionen der Überlebenszeit verwendet, was den Vergleich erschwert und eine kompaktere Darstellung unmöglich macht (Gesamtüberleben (engl. *overall survival*, OS), krankheitsspezifisches Überleben (engl. *disease specific survival*, DSS), krankheitsfreies Überleben (engl. *disease free survival* DFS), progressionsfreies Überleben (engl. *progression free survival*, PFS), Überleben bis zum ersten Progress (engl. *time to progression*, TTP), Überleben nach dem ersten Progress).

In Bezug auf das OS und DSS waren bei Plath et al. (63) sowohl die Kombination aus p16^{INK4a} hoch und HPV-DNA als auch die Kombination aus p16^{INK4a} hoch und RB1 niedrig sowie die durch Holzinger 2012 (11) für eine HPV-Beteiligung als typisch ermittelte Markerkombination (p16^{INK4a} hoch, RB1, Cyclin D1, p53 niedrig) mit einem besseren Outcome assoziiert. In ihrer multivariaten Analyse zeigte eine hohe p16^{INK4a} Expression das niedrigste Risiko für den Endpunkt Tod (Hazard-Ratio (HR) 0,23, p<0,001) bezüglich des 5-Jahres-Überlebens. Außerdem zeigten eine hohe RB1-Expression (HR 2,54, p=0,001) und hohe p53-Expression (HR 1,79, p=0,015) erhöhte Mortalitätsraten im Vergleich zu dem jeweils anderen Expressionsmuster. Eine Cyclin-

D1-Überexpression war tendenziell signifikant mit einer 1,59-fach erhöhten Mortalitätsrate assoziiert ($p=0,053$) (63).

Lu et al. (74) haben zum HPV-DNA-Status den RNA-Nachweis und den Nachweis der Proteine p16^{INK4a}, p53, Cyclin D1 und RB1 im Hinblick auf ihr Potential als Prognosemarker analysiert. HPV-positive Tumoren mit p53-Überexpression wiesen ein schlechteres DSS auf. In der HPV-negativen Gruppe war eine Cyclin-D1 Überexpression mit einem schlechteren OS assoziiert. Als *Cut-off*-Wert für die Überexpression haben sie pauschal für alle Proteine 50% festgelegt.

Speziell für HPV-assoziierte OPSCC konnten Masterson et al. in einer Meta-Analyse von *Randomized Controlled Trials* (RCTs) an fortgeschrittenen OPSCC einen Überlebensvorteil in der HPV-assoziierten Gruppe in Bezug auf das OS (HR 0,49, 95%- Konfidenzintervall (KI) 0,35–0,69) und das DSS (HR 0,41, 95%-KI 0,30–0,56) zeigen. Die dort einbezogenen Studien verwendeten verschiedene molekularpathologische Methoden zum HPV-Test und nur u. a. p16^{INK4a}-Immunhistochemie (2). Ebenfalls für das OS sowie auch für das PFS fanden Ang et al. für die HPV-assoziierte Gruppe bei OPSCC einen Überlebensvorteil, sowohl für den direkten HPV-Nachweis als auch für die p16^{INK4a}-Immunhistochemie (75). Für das Überleben nach einem Progress zeigten Fakhry et al. einen Überlebensvorteil für einen positiven p16^{INK4a}-Status (76). Die Studie von Guo et al. (77) hat nicht nur nach dem HPV-Status, sondern auch nach dem Überleben stratifiziert, wobei sie zwischen weniger als 24 Monate und mehr als 24 Monate unterschieden. Die Gruppe der länger als 2 Jahre Überlebenden hatte überwiegend HPV-positive Tumore, und diese zeigten eine längere Zeit bis zum Progress als die HPV-negativen Tumore in derselben Gruppe. In der Gruppe der weniger als 2 Jahre Überlebenden zeigte sich keine längere Zeit bis zum Progress für die HPV-positive Gruppe.

Khan et al (78) haben eine signifikante Assoziation einer starken Cyclin-D1 und p53 Expression und auch ihrer Koexpression mit einem schlechteren Therapieansprechen und kürzeren Überlebenszeiten gefunden, dieses allerdings bei oralen Karzinomen. Außerdem waren sowohl die p53- als auch die Cyclin-D1-Expression jeweils im Chi-Quadrat-(χ^2)-Test signifikant mit einem weiter fortgeschrittenen Lymphknotenstatus assoziiert. In den multivariaten Cox Regressionsanalysen zeigte sich die Koexpression als signifikanter Vorhersagewert für das OS (78).

In der oben bereits genannten Studie von Mineta et al. (70) an HNSCC zeigten Patienten mit Mutationen im p53-Gen ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben. Der p53-Expressionsstatus korrelierte nicht mit dem Überleben. Shin et al. (79) konnten für eine p53-Überexpression (mind. 10% immunreaktive Kerne) hingegen eine signifikant kürzere Überlebenszeit und auch eine kürzere Zeit bis zum Auftreten von Rezidiven oder Zweittumoren an Patienten mit HNSCC zeigen. Eine p53-Positivität zeigte sich dabei in der Cox-Regression ein unabhängiger Faktor für eine kürzere Überlebenszeit ($p=0.007$) sowie das Auftreten von Rezidiven ($p=0.053$) oder Zweittumoren ($p=0.035$). Die Studien liefen allerdings an Kopf-Hals-Tumoren allgemein und nicht speziell an OPSCC.

Diese Heterogenität bezüglich der Korrelation von p53-Überexpression und Überlebenszeit bemerkten auch Tandon et al. (80) in ihrem systematischen Review, das in seiner Meta-Analyse im Widerspruch zu den oben genannten Studien einen Vorteil für das krankheitsfreie Überleben bei p53-Überexpression zeigt (HR 0,45, 95% KI 0,27-0,73) (80). Diese Daten stammen jedoch lediglich aus univariaten Analysen.

In der Studie von Ang et al. (81) zeigte sich eine Cyclin-D1-Positivität ($> 10\%$ der Kerne) in OPSCC mit einer *Hazard Ratio* von 3,55 ($p=0,007$) als unabhängiger Risikofaktor in Bezug auf das Gesamtüberleben. Lin et al. (82) fanden zudem für eine Cyclin-D1-Überexpression ein schlechteres krankheitsfreies Überleben in der Kaplan-Meier Analyse. In einer Meta-Analyse von univariaten Effektstärken für Cyclin-D1 als Prognosemarker in Kopf-Hals Tumoren haben Gioacchini et al. (83) für eine Cyclin-D1-Positivität ein höheres Risiko für eine Lymphknotenmetastasierung in Larynxkarzinomen sowie ein schlechteres krankheitsfreies Überleben in Nasopharynx-Karzinomen gefunden. Oropharynx-Karzinome wurden in der Subgruppenanalyse nicht betrachtet.

Holzinger (11) hat in ihrer Studie auch Assoziationen zwischen dem jeweiligen Expressionsmuster der Zellzyklusproteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 mit dem OS und dem PFS untersucht. In den multivariaten Analysen stellte sich allein für den RB1-Expressionsverlust ein protektiver Effekt sowohl in Bezug auf das OS und auf das PFS heraus. Für eine p16^{INK4a}-Überexpression zeigte die multivariate Analyse hier keinerlei Effekte, sondern lediglich die Kaplan-Meier Analyse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die prognostisch günstigen Effekte und Korrelationen einer p16^{INK4a}-Überexpression recht konsistent in den hier vorgestellten Studien gezeigt werden, während sich für eine p53-Überexpression und eine Cyclin-D1-Überexpression weniger konsistente Effekte und Unterschiede im Hinblick auf das Überleben darstellen. Die Studien zeigen sich uneinheitlich in Trennwerten, Überlebenszeitdefinitionen und auch in den untersuchten Lokalisationen. Eine RB1-Expression wurde im Zusammenhang mit dem Überleben seltener untersucht. Ein RB1-Expressionsverlust zeigt in den beiden hier dargestellten Studien jedoch ebenfalls günstige Effekte auf die Überlebenszeit (11, 63).

2.6 Zellzyklusproteine als Biomarker für den Krankheitsverlauf

Hinsichtlich des Krankheitsverlaufes interessiert in dieser Arbeit insbesondere das Auftreten von loko-regionären Rezidiven (LRR), Zweittumoren (SPT) und Fernmetastasen (DM).

Es bestanden einige Schwierigkeiten darin, die einzelnen Progress-Entitäten voneinander abzugrenzen. Die meisten der Autoren, deren Studien im Verlauf zitiert werden, haben zur Definition eines Zweittumors die 1932 von Warren und Gates³ (84) publizierten Kriterien modifiziert, indem sie festlegten, dass wenn ein Malignom des gleichen histologischen Typs an der gleichen Stelle wie der Primarius in weniger als 3 Jahren nach diesem auftritt, mindestens 2 cm Abstand durch gesunde Schleimhaut zum Primarius bestehen muss, damit der Tumor als Zweittumor und nicht als Rezidiv klassifiziert wird. Tritt der Tumor später als 3 Jahre nach dem Primärtumor auf, wird er als Zweittumor ungeachtet des Abstandes klassifiziert (85-87). Eine Ausnahme bilden Jones et al., die zwar auch einen 2 cm Abstand fordern, allerdings bereits wenn der Tumor des gleichen histologischen Typs binnen 5 Jahren nach dem Primarius an der gleichen Stelle entsteht (88). Meist werden Zweittumoren, die weniger als 6 Monate nach dem Primarius auftreten als synchrone Zweittumoren und solche, die nach mehr als 6 Monaten nach dem Primarius auftreten als metachrone Zweittumoren gewertet (86, 87, 89).

³ Die entsprechende Publikation konnte angesichts des Erscheinungsjahres hier nicht vorgelegt werden.

2.6.1 Zweitumoren (SPT) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen

Zu der Inzidenz und Lokalisation von SPTs nach Kopf-Hals-Tumoren im Allgemeinen gibt es einige Studien, die in diesem Abschnitt kurz dargestellt werden. Hingegen gibt es weniger Studien, die sich mit ihrem Auftreten nach OPSCC im Speziellen befassen.

Zur Häufigkeit von SPT bei HNSCC-Patienten fanden Haremza et al. (90) in einer retrospektiven Studie, dass 26,6% von 541 Patienten einen metachronen SPT entwickeln und dass diese im Vergleich zu den Patienten ohne SPT eine schlechtere Prognose haben. Eine Stratifizierung nach p16^{INK4a}-Status nahmen sie nicht vor. Jones et al. (88) untersuchten die Prävalenz von SPT nach 372 Monaten, d.h. in einem 31-jährigen Nachbeobachtungszeitraum. Diese betrug 9,1%. Die mittlere Zeit bis zum Auftreten betrug 36 Monate (3 Jahre). In 50% der Fälle handelte es sich bei dem SPT um einen des Kopf-Hals-Bereiches und in 34% der Fälle um Lungentumoren. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit SPT betrug ab dem Zeitpunkt der Diagnose 26%. Bugter et al. (87) haben ihre Studie zu multiplen Primärtumoren (MPT), zu denen auch SPT gehören, auf jene des Kopf-Hals-Bereiches, der Lunge und des Ösophagus beschränkt und fanden eine Inzidenz von 11%. Ihr wichtigster Befund war, dass die Patienten mit Zweit- oder multiplen Primärtumoren in der Kopf-Hals-Region ein signifikant besseres Überleben hatten als diejenigen mit Lungen- oder Ösophagus-MPT. Ein gehäuftes Auftreten von Zweitumoren in der Mundhöhle fanden Leon et al. (91) und Adeel et al. (86). Die einzige Studie, die dem widerspricht, ist jene von Birkeland et al. (92), die auf Grundlage der *Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry* (SEER)-Datenbank mehr als 50.000 Patienten mit HNSCC auswerten ohne Stratifizierung nach p16^{INK4a}-Status und dabei eine höhere Prävalenz von Nicht-Kopf-Hals-SPT als von Kopf-Hals-SPT fanden (8,8% vs. 3%). Wie später auch Bugter et al. (87), fanden auch sie ein besseres Gesamtüberleben für die Patienten mit SPT im Kopf-Hals-Bereich.

In Bezug auf SPT speziell nach Oropharynx-Karzinomen gibt es kaum Studien. Eine Stratifizierung nach p16^{INK4a}-Status haben Xu et al. (89) vorgenommen und das Auftreten von SPT (definiert als SPT im oberen Aerodigestivtrakt einschließlich Ösophagus und Lunge) nach Oropharynx-Karzinomen ausgewertet. Interessant ist

dabei, dass die Inzidenz von SPT in der HPV-positiven Gruppe signifikant geringer war als in der HPV-negativen Gruppe ($p < 0,0001$). Hinsichtlich der Lokalisationsverteilung stellten sie fest, dass in p16^{INK4a}-negativen Indextumoren Oropharynx, Larynx und Mundhöhle die häufigsten Lokalisationen für SPT waren, und für p16^{INK4a}-positive Primärtumoren vor allem die Lunge gefolgt von Oropharynx und Mundhöhle.

Wang et al. fanden in einer epidemiologischen Studie zur Inzidenz von SPT nach einem invasiven potenziell HPV-assoziierten Karzinom, d.h. Karzinomen des Oropharynx und des Anogenitaltrakts, mit einem 15-jährigen Beobachtungszeitraum auf Grundlage der Daten des *SEER* für das Oropharynx-Karzinom das höchste Risiko für die Entwicklung von SPT im Vergleich zu den anderen klassischerweise HPV-assoziierten Tumoren. Männer entwickelten nach Oropharynx-Karzinom vor allem im Aerodigestivtrakt SPTs und Frauen im Aerodigestivtrakt oder in der Genitalregion (93). Als Maße hatten sie *Standardized Incidence Ratios* verwendet, die für Männer 1,83 (95%-KI 1,70–1,82) und für Frauen 2,29 (95%-KI 2,12–2,47) betragen. Diese Studie beinhaltete jedoch nur potenziell HPV-assoziierte Karzinome ohne erfolgten HPV-Nachweis. Eine Studie von Canavan et al. (94) über nachgewiesenen HPV-assoziierte Oropharynx-Karzinome mit initialem M0-Status zeigte nur fünf SPT in 225 Patienten in einem Zeitraum von 4,5 Monaten bis 13 Jahren. Dieser Befund unterstützt die Daten von Xu et al. (89), die in der HPV-assoziierten Gruppe ebenfalls weniger SPT fanden. In der Stichprobe von Canavan et al. waren die Progressen in HPV-assoziierten Oropharynx-Karzinomen hauptsächlich Fernmetastasen (15/225), gefolgt von lokoregionären Rezidiven (7/225). Die Inzidenz von Progressen war in ihrer Stichprobe mit nachgewiesener HPV-Assoziation insgesamt gering (9,3%) (94). Setzt man die zuletzt beschriebenen Studien, die zumindest Oropharynx-Karzinome beinhalten, miteinander in Beziehung, so kann man daraus schließen, dass die Inzidenz von SPT insbesondere HPV-negative Oropharynx-Karzinome betrifft.

Die individuellen Literaturrecherchen für RB1-, p53- und Cyclin-D1-Expression in Oropharynx-Karzinomen im Zusammenhang mit SPT blieben ergebnislos. Für p53 zeigten Homann et al. (95), dass eine Überexpression in tumorfreier, aber dem Tumor benachbarter Schleimhaut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren mit einer signifikant häufigeren SPT-Inzidenz assoziiert war, und zwar unabhängig von dem p53-Expressionsmuster des Primarius. Damit könnte eine p53-Überexpression im

angrenzenden Gewebe ein Marker für das Zweitmalignomrisiko im Kopf-Hals-Bereich sein.

2.6.2 Lymphknotenmetastasen (LKM), loko-regionäre Rezidive (LRR) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen

Als loko-regionäre Rezidive werden der klinischen Routine folgend Lokalrezidive oder Rezidive in regionären Lymphknoten im Sinne von regionären Lymphknotenmetastasen definiert.

In der Studie von Barber et al. (96) zeigte sich eine Assoziation zwischen einem positiven p16^{INK4a}-Status und dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen bei Erstvorstellung. Für das rezidivfreie Überleben fanden sie in der Cox-Regression p16^{INK4a} als einen unabhängigen Marker. Interessant ist auch, dass p16^{INK4a} und p53 invers mit einander korrelieren, was die oben beschriebenen Signatur von Holzinger (11) unterstützt (s. Kap. 2.4). Fakhry et al. (76) zeigen, dass das Progressionsmuster und die Zeit bis zur Progression sich in den beiden p16^{INK4a}-Gruppen nicht unterscheiden. Die p16^{INK4a}-positive Gruppe hatte jedoch nach dem Progress bessere Überlebensraten. In der Meta-Analyse von Masterson et al. (2) zeigte sich ein geringeres Risiko für LRR in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe, allerdings war dieses nicht signifikant. In der Studie von Canavan et al. war die führende Form des Progresses für HPV-assoziierte Tumoren Fernmetastasen. LRR hingegen traten seltener auf (7/225) (94).

Assoziationen zwischen dem p53-Expressionsmuster und dem Auftreten von LRR ergaben sich während der Literaturrecherche nicht. In der Studie von Skinner et al. (97) an HNSCC waren disruptive Mutationen im p53-Gen ein Prädiktor für LRR nach adjuvanter Radiotherapie (p=0.03), wobei die Einnahme des oralen Antidiabetikums Metformin einen protektiven Effekt aufwies. Ihre Experimente an Zell-Linien zeigten eine signifikant höhere Radioresistenz bei Zell-Linien mit disruptiven p53-Mutationen. Tinhofer et al. zeigten in ihrer Studie mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) eine Korrelation zwischen *Missense*-Mutationen im p53-Gen und LRR (HR=4,3, 95%-KI 1,5–12,1) (98). Da von dem Expressionsstatus nicht auf Mutationen geschlossen werden kann (68), fehlen zur Rezidiv-Inzidenz im Zusammenhang mit dem p53-

Expressionsstatus in Oropharynx-Karzinomen Referenzdaten. Auch bezüglich eines potenziellen Zusammenhanges zwischen einer RB1- oder Cyclin-D1-Expression und der Rezidiv-Inzidenz in Oropharynx-Karzinomen gibt es bislang keine Untersuchungen.

2.6.3 Fernmetastasen (DM) und ihre Assoziation mit Zellzyklusproteinen

Wiegand et al. (99) fanden in ihrer Studie an 46 HNSCC-Patienten, die nach initialer M0 Situation DM entwickelten, eine mittlere Überlebenszeit von 7,5 Monaten nach Auftreten der DM. In 59% der Fälle handelte es sich um Lungen- und in 24% um Knochenmetastasen. Die mittlere Zeit bis zur Diagnose betrug 16 Monate. Das Gesamtüberleben betrug 40,4% nach einem Jahr und 26,2% nach zwei Jahren. Prädiktoren für ein längeres Überleben zeigten sich in der Cox Regression nicht. Drei Patienten überlebten den Untersuchungszeitraum nach Resektion solitärer Metastasen. Eine Stratifizierung nach p16^{INK4a}-Status erfolgte nicht.

Für OPSCC haben Tiedemann et al. (100) in ihrer Metaanalyse sieben Studien mit insgesamt 1564 Patienten mit DM nach OPSCC eingeschlossen. Die Frage bestand in der Verteilung der DM nach Lokalisation sowie in der Zeit bis zu ihrem Auftreten. Beides wurde jeweils nach dem HPV-Status stratifiziert. 70% der insgesamt 313 Patienten, die DM entwickelten, waren HPV-positiv. Am häufigsten waren in beiden Gruppen Lungenmetastasen gefolgt von Knochenmetastasen, Lymphknotenmetastasen in nicht regionalen Lymphknotenstationen und Lebermetastasen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lokalisation bestand allein bei den Metastasen in nicht-regionalen Lymphknotenstationen, die signifikant häufiger bei HPV-positiven Tumoren vorkamen. HPV-positive Patienten hatten außerdem ein höheres Risiko eine disseminierte Metastasierung aufzuweisen, d. h. eine Metastasierung in mehr als zwei Lokalisationen. Hinsichtlich der Zeit bis zum Auftreten konnten nur drei Studien ausgewertet werden. Ein signifikanter Unterschied bestand hierbei nicht. Insgesamt traten DM im Zeitraum von zwei Jahren auf.

Jaber et al. (101) stratifizierten in einer Multicenterstudie mit 1058 OPSCC-Patienten im Zeitraum von 1979 bis 2013 die Patienten, die DM entwickelten (8,4%), nach dem p16^{INK4a}-Status. Insbesondere p16^{INK4a}-positive Patienten entwickelten DM. Diese

waren auch häufiger disseminiert als die der p16^{INK4a}-negativen Gruppe. Bei den p16^{INK4a}-positiven Tumoren waren das Gehirn, das Abdomen und die Lunge die Hauptmetastasierungsorte.

Auch Huang et al. haben in ihrer Studie an OPSCC-Patienten nach dem HPV-Status stratifiziert (102). Nach ihren Daten gab es keinen signifikanten Unterschied in der Metastasierungsrate. Deskriptiv zeigte sich jedoch, dass in der HPV-negativen Gruppe Lokalrezidive die häufigste Form des Progresses sind, während bei den HPV-positiven Tumoren DM als Progression überwogen (67%). Bei den p16^{INK4a}-negativen Patienten traten die Metastasen um ein Jahr früher auf als bei den p16^{INK4a}-positiven Patienten. Die HPV-negativen Patienten zeigen keine disseminierten Metastasen, bei den HPV-positiven waren es hingegen 33%. Auch in ihrer Studie war die 2-Jahres Überlebensrate bei den HPV-positiven signifikant besser als bei den HPV-negativen Patienten, einschließlich des Überlebens nach Auftreten von DM ($p=0,02$). Außerdem fanden sie einen Unterschied im Metastasierungsmuster. Während HPV-negative Patienten insbesondere Lungen-, Leber- und Knochenmetastasen zeigten, war die Metastasierung in der HPV-positiven Gruppe vielfältiger (bspw. Weichteilmetastasen, Hirnmetastasen und Metastasen in diversen Bauchorganen, (102)), obwohl auch bei diesen Patienten vornehmlich Lungenmetastasen vorkamen.

Ein in den hier vorgestellten Studien einheitlicher Befund ist das Auftreten eines disseminierten Metastasierungsmusters, d. h. HPV-positive Patienten zeigen DM in mehr als 2 Lokalisationen. Hinsichtlich der Inzidenz von DM zeigen die Studien überwiegend eine höhere Häufigkeit in HPV-positiven Fällen. Auch innerhalb der Gruppe der HPV-positiven Oropharynx-Karzinome zeigten Canavan et al., dass DM die häufigste Art von Progressen darstellen (94).

Von besonderem Interesse ist daher die Arbeit von Rasmussen et al. (103), weil sie eine gewisse Einschränkung zu den in diesem Kapitel zusammengefassten Studien darstellt. Sie haben auf der Grundlage des p16^{INK4a}-Status allein und einer Kombination aus HPV-DNA und p16^{INK4a}-Status prognostische Modelle vorgeschlagen und validiert, die in Zukunft Therapieentscheidungen unterstützen könnten. Dabei haben sie festgestellt, dass Patienten mit positivem p16^{INK4a}-Status bei jedoch negativem HPV-DNA-Status ein signifikant höheres Risiko haben, DM zu entwickeln als Patienten, die sowohl p16^{INK4a}- als auch HPV-DNA positiv waren. Mit diesem

Ergebnis geben sie ein starkes Argument für die zusätzliche Durchführung eines direkten Virusnachweises in p16^{INK4a}-positiven OPSCC.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wie 6-Wellplatten, Zellschaber, Eppendorf™-Mikroreaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Objektträger, Abdeckgläser, Mehrzweckgefäße, Küvetten wurden von von den Firmen Fisher Scientific GmbH (Schwerte), der Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen), VWR international GmbH (Darmstadt) sowie Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) und OMNI Life Sciences GmbH & Co. KG (Bremen) bezogen.

Chemikalien und Reagenzien

Fluoreszenz-konservierendes Reagenz (FluorSave™, Calbiochem)

Jet Prime® Transfektionskits, Polyplus Transfection® (France, USA)

jetPRIME® Puffer, Polyplus Transfection® (France, USA)

jetPRIME® Transfection Reagent, Polyplus Transfection® (France, USA)

Paraffin

PBS, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Formalin Solution, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt

Xylol, AppliChem GmbH, Darmstadt

Ethanol, Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Isopropanol, Honeywell Research Chemicals

Eukitt®, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt

Tris/EDTA-Puffer, pH 9 von Dako (Glostrup)

Dako EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent SM801, LOT 200336479, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX/HRP SM 802, LOT 200363375, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX+Mouse SM804, LOT 20036333, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX+Rabbit DM825, LOT 20035799, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX Wash Buffer DM831, LOT 00071678, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX Substrate Buffer DM823, LOT 00070884, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX DAB + Chromogen DM827, LOT 00065671, Glostrup, Dänemark

Dako EnVision™ FLEX Antibody Diluent DM830, LOT 00070873, Glostrup, Dänemark

Dako Real™ Hämatoxylin REF 2020, Glostrup, Dänemark

Dako-Pen (REF S2002), Glostrup, Dänemark

Dako Real™ Peroxidase Blocking Solution S2023, Glostrup, Dänemark

Dako Ready-to-use Protein Block Serum-free (Code X0909), Glostrup, Dänemark

Dako REAL™ Antibody Diluent (S2022), Glostrup, Dänemark

Dako REAL™ EnVision™ HRP, Rabbit/Mouse Reagenz, Glostrup, Dänemark

Dako Waschpuffer, Glostrup, Dänemark

Dako REAL™ Substratpuffer (5007, LOT 20024970, Glostrup, Dänemark

Dako REAL™ DAB+ Chromogen, X50, K5007, Glostrup, Dänemark

Dako REAL™ Hämatoxylin (S2020, LOT 20024137), Glostrup, Dänemark

Geräte

Fluoreszenzmikroskop, Nikon Eclipse TE2000-U, Nixon GmbH, Düsseldorf

Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200M (Zeiss), Jena

Casy® ton von Innovatis, Bielefeld

TMArrayer™ (PIN 02-17-0001 Rev 01), Pathology Devices, Westminster, USA

Dako Autostainer Plus (S 38-7420-01), Glostrup, Dänemark

Thermo Scientific NanoDrop 2000, Spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland

Sterilbank, Hera Safe, Nikon GmbH, Düsseldorf

Dampfgerar, Braun GmbH, Deutschland

Objektträger-Färbekammer, Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Thermomixer, Eppendorf AG, Wesseling

Paraffinbank Leica EG 1140H, Leica Microsystems, France

Mikrotom Leica RM 2165, Leica Microsystems, France

Vortexer, VWR W3, VWR Int. GmbH, Darmstadt

Zentrifuge, Avanti JE-30-I, Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Gefrierschrank -80°C, Hera freeze, Heraeus Holding GmbH, Hanau

Antikörper

Sigma Anti-RB1 AB 780 SAB4300387 LOT 8715, Quelle: Kaninchen, polyklonal

CINtec® Anti-p16^{INK4a}, REF:9511 LOT 5.153601, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Quelle: Maus, monoklonal

Dako Anti-p53 CloneDo-7, REF IR616 LOT 20031624, Glostrup, Dänemark Quelle: Maus, monoklonal

Dako Anti-Cyclin-D1 Clone EP12, REF IR083 LOT10112686, Glostrup, Dänemark, Quelle: Kaninchen, monoklonal

Software

HALO® (IndicaLab, Version v2.0.1145.14), USA

SPSS® IBM® Statistics Version 23, IBM Deutschland GmbH, Ehningen

NDP.view2 U12388-01 (Nano Zoomer Digital Pathology, Hamamatsu Photonics K.K., Japan)

3.2 Ethikvotum

Der Studie liegt ein Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zugrunde. Die Bearbeitungsnummer lautet: 837.360.16 (10679).

3.3 Patientenselektion

Zunächst erfolgte eine Selektion der in der Kliniksoftware „SAP“ der Klinik und Poliklinik Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz dokumentierten Behandlungsfälle des Zeitraumes 2008 bis 2011 auf Grundlage der ICD-10 Codes C09, C09.0, C09.1, C09.8, C09.9, C10, C10.0, C10.1, C10.2, C10.3, C10.4, C10.8 und C10.9. Nach Elimination der Mehrfachnennungen, die insbesondere bei fortgeschrittenen T-Stadien auftraten, ergaben sich 678 Patienten, deren Akten zur Überprüfung der Einschlusskriterien gesichtet wurden. Diese bestanden in der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Oropharynx als Primarius innerhalb des oben genannten Zeitraumes. Handelte es sich bei der Diagnose tatsächlich um einen Zweittumor oder ein Rezidiv oder hatten die Patienten bereits ein Malignom außerhalb des Kopf-Hals Bereiches in der Vorgeschichte oder lag das Datum der Erstdiagnose vor dem o.g. Zeitraum, so wurden diese Patienten von der Untersuchung ausgeschlossen. Daraus ergaben sich 151 Patienten, für die die Einschlusskriterien erfüllt waren⁴ (104).

Bei der Biobank des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz wurden Proben sowohl aus den jeweiligen Primärtumoren und ihren zugehörigen Lymphknotenmetastasen (bei N-Stadium > N0) als auch aus den Progressen (definiert als loko-regionäre Rezidive, Fernmetastasen, Zweittumore), sofern diese vorlagen, bestellt. Abzüglich der Patienten, für die keine Proben zu bekommen waren, weil der

⁴ Bis hierhin stimmte die Selektion der Stichprobe mit der in C. S. E. Dissertation überein (104).

Biobank nicht ausreichend Gewebe für die Herausgabe zur Verfügung stand, sowie der Patienten, deren Proben beim Fertigungs- oder Färbeprozess verloren gegangen waren, deren Tumoren in der vorliegenden Probe nicht angetroffen oder deren Proben aufgrund von massiven Defekten nicht auswertbar waren, ergibt sich für die vorliegende Studie eine Stichprobe von 77 Patienten für p16^{INK4a}. Nicht von allen Patienten lag Gewebe aus dem Primarius vor. In einigen Fällen konnte die Biobank lediglich Gewebe aus den initialen Lymphknotenmetastasen (bei N-Stadium > N0) oder Progressen (loko-regionäre Rezidive, Fernmetastasen, Zweittumore) herausgeben. Aus diesem Grunde musste zunächst anhand der Patienten, bei denen sowohl Gewebe aus dem Primarius als auch aus initialen Lymphknotenmetastasen (bei N-Stadium > N0) oder Progressen vorlag, geprüft werden, wie konsistent die Expressionsmuster in den Progressen im Vergleich zum Primarius waren. Dieser Befund entschied dann die Stichprobengrößen für die Proteine RB1, p53 und Cyclin-D1. Waren die Expressionsmuster nicht konsistent, konnten für das betreffende Protein nur die Patienten ausgewertet werden, für die Gewebe aus dem Primarius vorlag. Bei vorliegender Expressionskonsistenz konnten hingegen die Biopsien aus den Progressen stellvertretend für den Primarius verwendet werden.

3.4 Anfertigung der Tissue-Microarrays (TMAs)

Die Tumorproben wurden in Form von Tissue-Microarrays (TMAs) zur Verfügung gestellt (Abb. 1 Anhang), wobei jede Probe 5 µm Dicke und ca. 1 mm im Durchmesser betrug. Die Proben waren in Reihen und Spalten auf zwei Objektträgern gemäß ihrer Histologienummer angeordnet. Jede Tumorprobe bildete demnach eine Position auf dem Objektträger. Der Tissue-Microarray wurde gewonnen, indem je eine Gewebestanze aus jedem Tumor mit Hilfe des TMArrayer™ (PIN 02-17-0001 Rev 01) entnommen wurde. Diese Gewebestanzen wurden anschließend in einen Paraffinblock eingesetzt, aus dem zuvor gleichgroße Stanzen in Reihen und Spalten entnommen worden waren, so dass die Tumorgewebestanzen genau hineinpassten. So entstanden Blöcke (2+2a und 4+4a), von denen Schnitte mittels eines Mikrotoms angefertigt wurden. Die Blöcke 2 und 2a enthielten die Proben aus 2008 und 2009, 4 und 4a enthielten die Proben ab 2010. So ist es möglich, sowohl Tumorgewebe als

auch Reagenzien zu sparen sowie in sehr kurzer Zeit eine große Zahl an Patienten zu bearbeiten und in Form eines Scans mittels einer Software auszuwerten.⁵

3.5 Immunhistochemie

Die Antigene p53, p16^{INK4a} und Cyclin-D1 wurden mittels Dako Autostainer Plus (S 38-7420-01) gefärbt. Die unter 2.4 genannten Antikörper für diese drei Antigene waren hierfür bereits etabliert und wurden routinemäßig verwendet.⁶ Die automatisierte Färbung hat den Vorteil, dass alle Arbeitsschritte standardisiert ablaufen, d. h. dass jede Tumorprobe und auch jeder TMA genau gleich behandelt wird und die Inkubationszeiten ebenfalls genau gleich sind. Zum Ausschluss der unspezifischen Färbung enthielt jeder TMA zwei Proben Muskelgewebe als Kontrolle. Darüber hinaus wurde dieselbe Färbung an gesunder Mund- und Nasenschleimhaut durchgeführt, um den Vergleich zu physiologischem Plattenepithel bzw. im Falle der Nasenschleimhaut Flimmerepithel herstellen zu können. Im Anschluss an die Färbungen wurden die TMAs eingescannt und wie unten beschrieben mittels der *Software* HALO[®] (IndicaLab, USA) ausgewertet. In den Abbildungen A2 C-F bis A5 C-F im Anhang sind jeweils Beispiele von immunnegativen und immunreaktiven Tumoren gezeigt.

Der für das Antigen RB1 verwendete Antikörper hingegen wurde durch die Doktorandin der vorliegenden Arbeit erstmals verwendet und musste zunächst etabliert werden, d.h. es musste überprüft werden, ob und in welcher Konzentration er immunreaktiv ist, ohne dabei zu einer unspezifischen Färbung zu führen. Hierzu wurde der verwendete Antikörper zunächst an Zellpellets getestet, in denen das Antigen überexprimiert war. Außerdem wurde der Antikörper an Referenzgewebe getestet, in welchem nach Proteinatlas (105) (106) die normale RB1-Expression bekannt war. In dieser Studie wurden dazu Schnitte aus Lymphknoten verwendet.

⁵ Die Anfertigung der TMAs erfolgte freundlicher Weise durch die Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Unimedizin Mainz, welches über das notwendige Gerät und Material verfügt.

⁶ Nur p53, p16INK4a und CyclinD1 wurden freundlicher Weise durch die Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Unimedizin Mainz immunhistochemisch gefärbt, weil die Doktorandin der vorliegenden Arbeit aus logistischen Gründen keinen Zugang zum Färbeautomaten erhalten konnte.

3.5.1 Etablierung des RB1-Antikörpers

Um zu beweisen, dass der Anti-RB1 Antikörper AB 780 spezifisch bindet, sollte das Antigen in den Zelllinien HeLa und 293T überexprimiert und unter Verwendung des Antikörpers immunhistochemisch gefärbt werden. Hierzu wurden über www.addgene.org⁷ durch das Labor Olimpia Meucci Plasmide in transformierten Bakterien zur Verfügung gestellt, die das RB1-Gen mit einem N-terminalen *enhanced green fluorescent protein-(EGFP)-Tag* enthielten. Mithilfe dieser Markierung konnte das überexprimierte Antigen innerhalb der transfizierten Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (107) (108). Zur Selektion der Bakterien, die das EGFP-RB1-Plasmid enthielten, war dieses zudem mit einem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin versehen. Die Anzucht der transformierten Bakterien und die Isolierung des Plasmids waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurden freundlicherweise von den Mitarbeitern des Labors übernommen. Aus diesem Grunde wird das genaue Protokoll hier nicht dargestellt. Die mittels Spektrometer gemessene Plasmid-DNA-Ausbeute betrug 40,5 µg.

Transfektion

Nachdem die Plasmide isoliert waren, wurde die Transfektion der Zellen vorgenommen. Transfektion bedeutet die Aufnahme von Nukleinsäuren und ihre Expression durch eukaryotische Zellen (109). Im Wesentlichen werden chemische, physikalische und rezeptorvermittelte Transfektionsverfahren unterschieden (110). Hier zur Anwendung kam ein chemisches Verfahren mithilfe eines polykationischen Polymers (Jet Prime® Transfektionskits der Firma Polyplus Transfection®, France, USA). Das Prinzip beruht darauf, dass die aufgrund der Phosphatgruppen polyanionische DNA mit dem Polykation komplexiert wird. Der Komplex adhärert an der Zelloberfläche aufgrund der negativen Ladungen ihrer Glykokalyx und wird mittels Endozytose aufgenommen.

Die Zelllinien HeLa und 293T wurden in je zwei 6-Wellplatten in Medium zur Verfügung gestellt, so dass schließlich 12 Wells mit HeLa und 12 Wells mit 293T-Zellen zur Transfektion vorlagen. Die Zelldichte in den Wellplatten betrug 70%. Die Menge der isolierten Plasmid-DNA betrug 40,5 µg, so dass pro Well 1,7 µg DNA transfiziert

⁷ <https://www.addgene.org/16004/>. Zuletzt aufgesucht am 10.05.2017

werden konnten. Der DNA wurde zunächst 4,8 ml jetPRIME® Puffer (LOT B160817, Cat. 712-60) zugegeben. Das Gemisch wurde anschließend 10 Sekunden gevortext und kurz zentrifugiert, bevor 96 µg jetPRIME® Transfection Reagent (LOT 08y1710G, Cat. 114-15) hinzugegeben und abermals 10 Sekunden gevortext wurde. Bei Letzterem handelt es sich um das polykationische Polymer. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Gemisch 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die Komplexbildung vonstattengehen konnte. Anschließend wurden jeweils 210 µl des Gemisches dem Medium in jedem Well hinzugegeben. Die Transfektion erfolgte an der Sterilbank. Alle Materialien wurden vor Verwendung an der Sterilbank desinfiziert, um Kontamination zu vermeiden. Anschließend wurden die Wellplatten zurück in den Brutschrank zur Inkubation über 24 Stunden gegeben. Am folgenden Tag erfolgten die Begutachtung und die Aufnahmen der Zellen an der Fluoreszenzkamera. Die nukleäre Expression des *EGFP*-markierten RB1 war deutlich erkennbar, so dass die Zellen nun für die immunhistochemische Färbung präpariert werden konnten.

Anfertigung der Zellpellets

Die Präparation der Zellen bestand in den Schritten der Fixation, um autolytische Vorgänge auszuschalten und die Zellstrukturen zu stabilisieren, der Entwässerung, der Einbettung in Paraffin sowie schließlich der Herstellung von Schnitten zur Färbung (111).

Die Anfertigung der Zellpellets erfolgte, indem die Zellen, die an der Wellplatte adhärten, zunächst mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Anschließend wurde das Medium mitsamt den Zellen in je ein Falcon-Röhrchen pro Zellreihe überführt. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm über 7 Min. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 5 ml sterilfiltrierter *Phosphate-buffered Saline* (PBS) zur Waschung resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation wie oben und ein erneuter Zusatz von 5 ml PBS mit Resuspension und Zentrifugation. Die Zellpellets waren sehr klein bei nur geringer Zellausbeute und mutmaßlichen Zellverlust während der Herstellung, so dass die Pellets in Eppendorfgefäße überführt wurden.

Für die Fixation und Einbettung wurden Formalin, Alkohol, Xylol und Paraffin verwendet. Bevor das Protokoll dargestellt wird, soll in diesem Abschnitt kurz das

Prinzip erläutert werden. Beim Formalin handelt es sich um ein nicht-koagulierendes Fixans, das zu einer Stabilisierung führt, indem es Quervernetzungen zwischen den Proteinen herstellt. Der Alkohol ist ein koagulierendes Fixans, das den Zellen Wasser entzieht, dadurch zu einer Denaturierung und so zur weiteren Fixierung (111) führt⁸. Weil Alkohol die Schneidbarkeit des Gewebes herabsetzt und einen für die Lichtmikroskopie ungünstigen Brechungsindex hat, muss der Alkohol entfernt werden, bevor die Einbettung in Paraffin stattfindet. Als Medium wird hier Xylol verwendet, das sich gut mit dem Alkohol mischt und diesen schrittweise in den Zellen verdünnt. Gleichermaßen gut mischt es sich mit dem Paraffin, so dass es durch dieses schließlich selbst ausgewaschen wird. Dabei dringt das Paraffin bis in die Zellen hinein und füllt sie aus⁹ (111). Die Einbettung in Paraffin dient neben der Möglichkeit zur längerfristigen Aufbewahrung auch der Schneidbarkeit des Gewebes oder wie an dieser Stelle der Zellpellets.

Einbettung in Paraffin

Protokoll 1: Die Fixation erfolgte nach Absaugen des *PBS* für 1 Stunde in 4%igem Formalin und anschließend 12 Stunden über Nacht in 1%igem Formalin. Die Zellen wurden anschließend bei 3000 rpm für 10 Min abzentrifugiert und das überstehende Formalin verworfen. Es erfolgte dann die Resuspension in 1 ml Leitungswasser und die erneute Zentrifugation bei 3000 rpm über 10 Min. Dieser Waschvorgang mit Leitungswasser wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurden die Pellets in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe in je einem Milliliter 70%-, 80%-, 90%- und in 100%igem Ethanol resuspendiert und auf einem Schüttelinkubator 1 Stunde inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 3000 rpm über 10 Min. Als Nächstes fand das Auswaschen des Alkohols mittels Xylol statt, wobei die Pellets zunächst eine Stunde in 1 ml Xylol inkubierten und anschließend über Nacht in einem frischen Xylolbad. Dieses Vorgehen führte zu einer weiteren Schrumpfung der Pellets, so dass diese fast kaum mehr sichtbar waren. Die Einbettung in Paraffin fand in 3 je 2-stündigen Einbettungsschritten bei 60°C statt, wobei das erwärmte Paraffin, mit dem sich das Xylol mischt, jeweils abpipettiert und erneuert wurde. Anschließend wurde

⁸ Lang G. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2. überarbeitete Auflage. Wien: Springer; 2013. S 47.

⁹ ebenda, S.106 ff.

das Pellet in einer Einbettkammer ausgerichtet, die verschlossen und mit Paraffin ausgegossen wurde und dann für 30 Min auf der Eisplatte aushärtete. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte von den Blöcken erzeugt und in einem warmen Wasserbad auf Objektträger gezogen, die im Brutschrank trockneten.

Protokoll 2: Aufgrund des oben beschriebenen Problems, dass die Zellpellets nach Ernten und Waschen sehr klein waren und im Einbettungsprozess erwartungsgemäß weiter geschrumpft waren, war die Ausbeute an brauchbaren Schnitten sehr klein, so dass neue Zellkulturen hergestellt wurden, die abermals nach oben dem aufgeführten Protokoll mit dem RB1-EGFP Plasmid transfiziert wurden. Die Herstellung der Zellpellets erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben, es wurde lediglich ein Einbettprotokoll verwendet, das auf Xylol verzichtet. Das für die automatische Einbettung geltende Protokoll wurde Riedelsheimer et al. (112) entnommen und in dieser Arbeit für die manuelle Einbettung verwendet. Für die Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe mit Isopropanol verwendet. Die Inkubationszeiten lauteten: 70% Isopropanol für 1,5 Stunden, 90% für 1,5 Stunden sowie dreimal 100% für je eine Stunde. Die Inkubationsbedingungen waren dieselben wie in Protokoll 1 mittels Schüttelinkubator, wobei die letzte Inkubation bei 50° stattfand. Nach Riedelsheimer et al. (112) härtet Isopropanol die Zellen weniger aus im Vergleich zu Ethanol und Xylol und kann im Gegensatz zu Ethanol direkt mit Paraffin ausgewaschen werden, weil es sich damit mischt. Nach der Alkoholreihe erfolgte eine Inkubation mit einer zunächst 50°C warmen Isopropanol-Paraffin-Mischung im Verhältnis 1:1 für eine Stunde, dann zwei weitere Inkubationen mit je frischem Paraffin für eine und anschließend für 2 Stunden bei jeweils 60°C. Die restlichen Schritte glichen denen in Protokoll 1. Im Ergebnis wurden so geeignete Schnitte für die Immunhistochemie generiert.

Färbung von Testgewebe zur Ermittlung der minimalen Antikörper-Konzentration

Bevor die immunhistochemische Färbung an den Zellpellets und später den TMAs stattfinden konnte, musste zunächst die Konzentration des Primärantikörpers gegen RB1 für die manuelle Färbung mithilfe einer Verdünnungsreihe anhand von Probeschnitten ermittelt werden. Um Ressourcen zu sparen, ist es von großer

Bedeutung, nur so viel von dem Antikörper zu verwenden wie nötig, um eine deutliche, aber spezifische Färbung zu erzielen.

Der Primärantikörper wurde daher an Referenzgewebe getestet, in welchem nach Proteinatlas die RB1-Expression bekannt war (105, 106, 118). In dieser Studie wurden dazu Schnitte aus der Tonsilla palatina verwendet. Die Verdünnungsempfehlung für den Primärantikörper gemäß Herstellerangabe lautete für die Immunhistochemie an FFPE-Material 1:50–1:100. In dieser Arbeit wurde eine Verdünnungsreihe in den Stufen 1:100, 1:200 und 1:400 an Schnitten aus Tonsillengewebe getestet.

Pro Verdünnung aus der Verdünnungsreihe wurde jeweils ein Schnitt gefärbt. Die minimale Konzentration, die eine deutliche, aber spezifische Färbung erzielte (hier 1:400) wurde anschließend ausgewählt. Die Auswahl erfolgte nach dem Vier-Augen-Prinzip durch die Doktorandin unter der Supervision einer Pathologin.

Immunhistochemische Färbung der Schnitte aus den Zellpellets

Um die Antikörperetablierung abzuschließen, wurden nun die Schnitte der Zellpellets, in denen RB1 nukleär überexprimiert war, mit der Verdünnung 1:400 gefärbt. Die Zellen zeigten in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern eine starke nukleäre Braunfärbung, im Gegensatz zu den Zellen, in denen RB1 nicht überexprimiert war.

3.5.2 Immunhistochemisches Verfahren und Färbeprotokoll

Mittels Immunhistochemie lässt sich die Expressionsdichte und -lokalisierung von Proteinen an Geweben nachweisen. Das Prinzip besteht darin, dass man einen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Antigen, in diesem Falle RB1, dem Gewebe zugibt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Sekundärantikörpers gegen ein Epitop des Primärantikörpers. An dem Sekundärantikörper ist ein Reagenz gekoppelt, an welches ein in einem weiteren Schritt zugegebenes Chromogen binden kann, das im Rahmen einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu einem gefärbten Produkt führt (111)¹⁰. Abhängig von der Art des Chromogens entsteht dann wie in diesem Fall eine starke Braunfärbung des Antigen-Antikörper-Komplexes, so dass die

¹⁰ Lang G. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2. überarbeitete Auflage. Wien: Springer; 2013. S. 270.

Expressionsdichte entweder direkt unter dem Lichtmikroskop oder anhand von *Scans* am Computerbildschirm bzw. wie in dieser Arbeit mittels der *Software* HALO® (IndicaLab, USA) beurteilt werden kann. Um die Zellen sichtbar zu machen, die immunnegativ sind, die also das Antigen nicht exprimieren oder zumindest nicht in nachweisbaren *Levels*, verwendet man eine sogenannte Gegenfärbung. In dieser Studie wurde dazu Hämatoxylin verwendet. Es gibt verschiedene Systeme zur Sichtbarmachung des Immunkomplexes. Hier wurde das Dako REAL™ Envision™ System (K5007) verwendet.

Protokoll der manuellen Färbung

Für die Färbung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten bzw. mit den geschnittenen Zellpellets und später den TMAs zunächst zweimal für jeweils 10 Min zur Entparaffinisierung in ein Xylolbad gestellt und anschließend kurz in frisches Xylol getaucht. Dann erfolgte eine absteigende Isopropanol-Reihe (100%, 100%, 96%, 96%, 70%, 50%) für jeweils fünf Min, um eine Rehydrierung des Gewebes zu erreichen. Nach dem Rehydrieren erfolgte das Antigen-Retrieval. Hierzu wurden die Objektträger für 20 Min in Küvetten mit dem bereits vorgeheizten TRIS-Puffer (pH 9) in den Dampfgerar gestellt. Nach dem Hitze-Retrieval wurden die noch heißen entdeckelten Küvetten mit den Objektträgern für 15 Min in ein Wasserbad zur Abkühlung überführt, sodass das Gewebe bzw. später die Schnitte aus den Zellpellets und TMAs für diesen Zeitraum im TRIS-Puffer verblieben. Um die Rückstände des TRIS-Puffers zu entfernen, wurden die Objektträger für 5 Min in Dako-Waschpuffer gestellt. Anschließend erfolgte das Umranden des Gewebes bzw. der Zellpellets und TMAs mittels eines Dako-Stiftes (REF S2002, LOT 2003 9423), damit die bei der Färbung verwendeten Reagenzien nicht auf dem Objektträger verliefen.

Um sicherzustellen, dass die entstehende Färbereaktion nicht unspezifisch ist, musste das Gewebe vorbehandelt werden, bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen konnte. Die spätere Färbereaktion ist katalysiert durch eine Peroxidase, die in dem Envision™-Reagenz enthalten ist. Die gewebeeigene Peroxidase muss folglich zuvor inaktiviert werden, damit es nicht zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung kommt. Hierzu wurde das Gewebe zunächst für 5 Min mit einer Peroxidase *Blocking Solution* (Dako Real™ Code S2023, LOT 2002 4138) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Waschung mittels Waschpuffer. Damit der Primärantikörper nicht unspezifisch an Epitope der übrigen Proteine bindet, was ebenfalls zu einer unspezifischen Färbung

führen würde, müssen diese durch ein Reagenz blockiert werden, welches mittels dem serumfreien *ready-to-use Protein Block* von Dako (Code X0909, LOT 10120848) für die Dauer von 15 Min erfolgte. Auch dieser wurde mittels Waschpuffer entfernt.

Nun war das Gewebe ausreichend vorbereitet für die Inkubation mit der Primärantikörperlösung. Da der Anti-RB1-Antikörper in hochkonzentrierter Form vorlag, wurde er zunächst zu einer Antikörperlösung (Konzentration 1:400) mithilfe des Dako REAL™ *Antibody Diluent* (S2022, LOT 20030606) verdünnt und auf das zu färbende Gewebe bzw. auf die Zellpellets pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation über 60 Min. Nur die Negativkontrollen wurden ausgespart, um einen Vergleich zum allein mit Hämatoxylin gefärbten Gewebe herstellen zu können. Nach Abspülen des Primärantikörpers wurde das Dako REAL™ *EnVisionT™ HRP, Rabbit/Mouse* Reagenz (K5007, LOT 00061951) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Dextran, das mit einer Peroxidase und einem in Ziegen hergestellten Sekundärantikörper gekoppelt ist. Dieses Reagenz lässt sich sowohl bei in Mäusen als auch in Kaninchen hergestellten Primärantikörpern anwenden. Die Inkubation erfolgte über 20 Min. Nach Abspülen mittels Dako-Waschpuffer inkubierte die mit Wasserstoffperoxid-haltigen Dako REAL™ *Substratpuffer* (5007, LOT 20024970) verdünnte *Diaminobenzidin-Lösung* (Dako REAL™ *DAB + Chromogen*, X50, K5007, LOT20024970), die das Chromogen zur Farbreaktion enthält, für 5 Min. Nach 5-minütigem Abspülen mittels Waschpuffer erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne in Dako REAL™ *Hämatoxylin* (S2020, LOT 20039974). Daraufhin wurden die Objektträger 10 Min in Leitungswasser gewässert und es erfolgte die aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung für jeweils 5 Min und ein zweimaliges 10-minütiges Xylolbad. Mit Hilfe von Eukitt® wurden die Objektträger schließlich eingedeckelt und unter dem Abzug getrocknet. Dieses Protokoll mit seinen Reagenzien wurde eigentlich für die Färbung mittels Färbeautomaten (*Autostainer*) entwickelt. In dieser Arbeit wurde es jedoch zur manuellen Färbung an einer Färbebank verwendet.

Protokoll der automatischen Färbung

Das für die automatische Färbung verwendete Programm erfordert ebenfalls eine Vorbereitung der TMAs bis einschließlich des Antigen-*Retrievals*; allerdings weicht das Protokoll etwas von dem der manuellen Färbung ab. Auch hier fand zunächst das

Entparaffinieren in einem 20-minütigen Xylolbad und ein anschließendes Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol statt (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 70%, 1 x 50% für jeweils 3 Min). Das Antigen-*Retrieval* erfolgte in TRIS Puffer pH 9 (p16^{INK4a} und Cyclin-D1 jeweils für 30 Min, p53 für 20 Min) im Dampfgerar. Nach dem Abkühlen konnten die Objektträger in den *Autostainer* geladen werden. Die Primärantikörper gegen die Proteine p53, p16^{INK4a} und Cyclin-D1 waren *Ready-To-Use*-Produkte und enthielten den Proteinblock bereits, so dass dieser Schritt entfiel. Es erfolgte zunächst für 5 Min die Blockierung der endogenen Peroxidase (EnVision™ Peroxidase Blocking Reagent, SM 801, LOT 20036479). Nach dem Spülvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (p16^{INK4a} für 30 Min, p53 für 20 Min, Cyclin-D1 für 30 Min). Es war dabei nicht erforderlich, eine bestimmte Verdünnungsstufe herzustellen, weil es sich nicht um ein Konzentrat wie bei dem Anti-RB1-Antikörper handelt, sondern um *Ready-To-Use*-Reagenzien. Abweichend vom Protokoll zur manuellen Färbung wurde im nächsten Schritt ein Reagenz verwendet, das zur Amplifikation der Färbung führt und optional mit dem hier verwendeten *Kit* eingesetzt werden kann (EnVision™FLEX + *Mouse Linker* SM 804 LOT 20036333 bzw. für Cyclin-D1 EnVision™ FLEX + *Rabbit Linker* DM 825 LOT 20035799). Dieses inkubierte für 15 Min nach Abspülen des Primärantikörpers. Nach weiterem Spülen erfolgte die Inkubation mit dem den Sekundärantikörper enthaltenden EnVision™ FLEX/HRP (SM 802 LOT 20036375) für 20 Min. Auch dieses wurde ab gespült und es erfolgte ebenfalls abweichend von dem oben beschriebenen Protokoll zweimalig eine fünfminütige Inkubation mit der das Chromogen enthaltenden Lösung (EnVision™ FLEX DAB + Chromogen DM 827 LOT 20037580 in EnVision™ FLEX *Substrate Buffer* SM 803). Die Gegenfärbung mittels Hämatoxylin (S2020, LOT 20024137) erfolgte nach einem weiteren Spülvorgang für 3 Min. Nach ausgiebigem Spülvorgang mit Wasser wurden die Objektträger aus dem *Autostainer* entnommen und wie oben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach dem Xylolbad für die Lichtmikroskopie eingedeckelt.

3.6 Analyse der Antigenexpression und Festlegung der Trennwerte

In der Tumordatenbank war der *H-Score* vorgesehen, der die Anteile der gefärbten Zellen nach Färbeintensität gewichtet. Dieser ist insbesondere im Bereich des EGF-Rezeptors (113) und bei Hormonrezeptoren (114) als zu untersuchendes Antigen

beschrieben. Da aber für die hier untersuchten Proteine in der Literatur keine Gewichtung nach Färbeintensität vorgenommen wurde, wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht nach Färbeintensität gewichtet, sondern lediglich der Anteil immunreaktiver Zellen am angetroffenen Tumoranteil betrachtet. Der Nachteil des *H-Scores* ist, dass ein Score von 1 viele immunreaktive Zellkerne beinhalten kann, wenn diese vergleichsweise schwach gefärbt sind und der Anteil an moderat und stark gefärbten Zellen gering ist. Bei Antigenen wie p53, das normalerweise nicht detektierbar exprimiert wird (11), würde eine Überexpression daher möglicherweise falsch klassifiziert werden. Daher wurde auf die Verwendung des *H-Scores* verzichtet.

Es galt im Folgenden festzulegen, ab welchem *Cut-off*-Wert eine Überexpression bzw. ein Expressionsverlust besteht. Hierzu wurden für jedes Antigen gesunde Mundschleimhaut als Referenz gefärbt und ausgewertet. Gesunde Oropharynx-Schleimhaut war nicht erhältlich. Außerdem wurden zum Vergleich die Trennwerte aus anderen Studien herangezogen:

Plath et al. (63) haben in ihrer Untersuchung der vier Zellzyklusproteine p16^{INK4a}, RB1, Cyclin-D1 und p53 als Surrogatmarker für eine HPV-Beteiligung den *Cut-off*-Wert für eine starke p16^{INK4a}-Expression bei >70% und für die anderen drei Proteine bei >25% definiert. Das *Outcome* ihrer Studie wurde in der Literatordiskussion bereits dargestellt. Lu et al. (74) haben für alle 4 Proteine hingegen einen *Cut-off* von 50% der Kerne festgelegt.

Für p16^{INK4a} besteht Einigkeit darüber, dass eine starke nukleäre und zytoplasmatische Expression von 70% der Zellen als positiv angenommen wird (63, 81, 115). Jordan et al. (116) haben für die Bewertung von p16^{INK4a} den *H-Score* verwendet, wobei ein Score von 3 intensiv gefärbten p16^{INK4a}-positiven Tumoren entsprach. Zugleich verwendeten sie den Standard von mindestens 70% stark nukleär und zytoplasmatisch gefärbter Tumorzellen.

Shin et al. (79) haben in ihrer oben bereits zitierten Studie den *Cut-off*-Wert für eine p53-Positivität bei > 10% der Kerne gesetzt, da sie feststellten, dass ein *Cut-off*-Wert mit höheren Werten die Signifikanz senkte. Sie unterschieden demnach zwei Gruppen in ihrer Studie, wobei die p53-positive Gruppe mindestens 10% oder mehr positive Kerne zeigte und die p53-negative Gruppe weniger als 10% gefärbte Zellen zeigte.

Vergleicht man den *Cut-off*-Wert mit dem von Plath (63) und Lu (74), ist die Literatur also nicht eindeutig.

In einer Meta-Analyse für Cyclin-D1 als Prognosemarker in Kopf-Hals-Tumoren haben Gioacchini et al. (83) unterschiedliche *Cut-off*-Werte für die Cyclin-D1-Positivität gefunden. Sie variierten in den untersuchten Studien zwischen > 1% und > 50% immunreaktive Zellkerne. Die Vergleichbarkeit der Studien gestaltet sich bei dem hohen Maß an Heterogenität der verwendeten Antikörper, Färbeprotokolle und *Cut-off*-Werte schwierig. Akervall et al. (72) definieren eine Cyclin-D1-Überexpression als >50% der Tumorzellen.

Für RB1 besteht ebenfalls keine Einigkeit über den *Cut-off*-Wert. Kunz et al. definieren die Expression als pathologisch, wenn weniger als 95% der Tumorzellkerne immunreaktiv sind (117). Wie oben bereits beschrieben, definieren Lu et al. (74) die RB1-Positivität bei immunreaktiver Färbung von mindestens 50% der Kerne und Plath et al. (63) nehmen auch hier eine Positivität bereits ab 25% der Kerne an. Der Proteinatlas findet im Plattenepithel der Tonsilla palatina eine starke immunreaktive Färbung und definiert diese bei >75% (105, 118). Holzinger definiert in ihrer Dissertation wie Kunz et al. (117) einen Expressionsverlust als die pathologische Form und definiert eine physiologische RB1-Expression mit einem *Score* von 2, wobei dieser nur qualitativ ist, d.h. nicht wie die anderen Autoren den Anteil gefärbter Zellen definiert (11).

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Referenzschnitte aus gesunder Mundschleimhaut (siehe Anhang, Abb. A2 A und B -A5 A und B) beinhalten folgende Anteile gefärbter Zellen: p16^{INK4a} 26%, RB1 80%, p53 14%, Cyclin-D1 63%. In Zusammenschau mit den oben aufgeführten Literaturwerten werden folgende Trennwerte für eine Überexpression bzw. einen Expressionsverlust festgelegt (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Trennwerte (Cut-off-Werte) für Überexpression bzw. Expressionsverlust

Protein	Trennwerte (%)
RB1	75% nukleär
p53	14 % nukleär
p16 ^{INK4a}	70% nukleär + zytoplasmatisch
Cyclin-D1	60% nukleär

Nachfolgend werden für p16^{INK4a} Tumoren mit mindestens 70% nukleär und zytoplasmatisch deutlich immunreaktiver Zellen auch als p16^{INK4a}-positiv im Sinne der 8. Auflage der TNM-Klassifikation (kurz: p16^{INK4a}-positiv) bezeichnet.

3.7 Datenerhebung

Anschließend erfolgte die Erfassung der klinischen Patientendaten und der Tumordaten. Diese wurden auf der Grundlage der Patientenakten, insbesondere der Anästhesieprotokolle, Pathologieberichte und Arztbriefe, erhoben. Letztere schlossen auch die vorliegenden CT-/MRT-Berichte ein. Die Todesdaten wurden der elektronischen Patientenakte entnommen bzw. beim Krebsregister Rheinland-Pfalz erfragt, sofern diese fehlten bzw. über den Beobachtungszeitraum hinaus kein in der Kliniks-*Software* dokumentierter Kontakt mit dem Patienten mehr stattgefunden hatte. Die Daten wurden anonymisiert in die Tumordatenbank (TuBa) der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde sowie der Institute für Pathologie und Bioinformatik der Universitätsmedizin Mainz bzw. der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (104, 119-121) eingegeben und anschließend exportiert. Diese Daten umfassten den Stand Dezember 2016. Im Juli 2019 wurde eine Revision der aus der TuBa exportierten Daten durchgeführt, um den Nachbeobachtungszeitraum auszudehnen. Die Revision umfasste auch eine Spezifikation der Tumorlokalisierung anhand der Operationsberichte, da die Angaben in der oben genannten Tumordatenbank hierzu oft ungenau waren, d.h. bspw. lediglich die Angabe „Oropharynx“ enthielten. Darüber hinaus erfolgte die Dateneingabe in die Tumordatenbank durch mehrere Doktoranden, die ihre Studien an den gleichen bzw. überlappenden Patientenkollektiven durchführten. Zwischen den Doktoranden bestand keinerlei Konsens hinsichtlich der Begriffsdefinitionen. Die Beurteilung des Krankheitsverlaufs war für die anderen Doktoranden nicht relevant. Außerdem fehlten teils Angaben zu Progressen (loko-regionären Rezidiven, Fernmetastasen, Zweitumoren), die im Rahmen der Revision ergänzt wurden. Damit entsprechen die dieser Studie zugrundeliegenden Daten nur zum Teil denen der Tumordatenbank „TuBa“.

Die für diese Studie relevanten erhobenen Daten aus den Patientenakten sind: Geburtsdatum, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, Todesdatum, Datum des letzten

Kontaktes, Körpergröße, Gewicht, Leber-, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus, Alkoholkonsum, Raucher (ja/nein), Tumordaten (Tumorart, -lokalisierung, -sublokalisierung, Datum der Diagnose jeweils für den Primärtumor und jeden einzelnen Progress im Sinne von loko-regionären Rezidiven, Zweittumoren, Fernmetastasen), T-, N-, M-Stadium, Anzahl der Progresse, verstorben (ja/nein), *lost to follow-up* (ja/nein). Die TuBa enthält darüber hinaus noch weitere Angaben (bspw. zur Histologie und Therapie). Aus diesen Daten wurden der *Body-Mass-Index* (BMI) und die Beobachtungsmonate für das Gesamtüberleben, die Zeit bis zum ersten Progress und das Überleben nach dem ersten Progress ermittelt und die entsprechenden Zensuren angelegt. Außerdem hinzugefügt wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.

Da es sich in der vorliegenden Studie um eine retrospektive Analyse handelt und die Lokalisation der Tumoren anhand von OP-Berichten und Histologieberichten ermittelt wurde, war die Bedingung, dass der Tumor durch 2 cm gesunde Mukosa von dem Primarius entfernt auftreten musste, um als Zweittumor klassifiziert werden zu können, selten sicher ermittelbar. Aus diesem Grund wird das etwas strengere zeitliche Kriterium für Tumoren, die an derselben Stelle wie der Primarius entstehen, wie bei Jones et al. auf 5 Jahre festgelegt (88). Hinsichtlich des Abstandes bestand teilweise Unsicherheit, so dass Falschklassifikationen in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden können. Ein besonderes Problem für diese Studie stellten Neoplasien der Lunge dar, die nach OPSCC auftraten, da hier lediglich die Röntgen-/CT-Befunde im Rahmen des Stagings und der Nachsorge vorlagen. Die radiologische Bewertung als entweder Sekundärtumor oder pulmonale Filiae wurde daher in die Auswertung übernommen. In einigen Fällen konnte radiologisch nicht sicher zwischen den beiden Entitäten unterschieden werden, so dass diese als Zweittumor DD: Fernmetastase in die Auswertung eingehen mussten.

Wie im experimentellen Teil beschrieben, erfolgte die immunhistochemische Färbung der Tumoren anhand von Biopsien, die in Form von TMA angeordnet waren. Die gefärbten TMAs wurden gescannt und mittels der *Software* HALO® (IndicaLab, Version v2.0.1145.14) ausgewertet. Das Auswertungsprinzip beruht auf dem *Machine Learning*. Die *Software* wird anhand weniger Cores (Tumorproben) mittels „*Classifier*“ trainiert, Tumorzellen, Stromazellen und Hintergrund, sowie mithilfe der „*Settings*“ immunreaktive Färbung in den Abstufungen stark, moderat, leicht vs. Hämatoxylin-

Gegenfärbung (immunnegative Färbung) zu erkennen. Innerhalb kurzer Zeit wertet HALO® auf diese Weise standardisiert den gesamten TMA aus und liefert die Anzahl der in jeder Intensität (von immunnegativ bis stark gefärbt) vorliegenden Zellen des interessierenden „*Classifiers*“, in diesem Falle „Tumor“. Die Voraussetzung allerdings ist eine gewisse Homogenität der Proben, die hier nicht vorlag. Es gab bspw. Schwierigkeiten dabei, Lymphozyten und immunnegative Tumorzellen über die verschiedenen *Cores* hinweg zu unterscheiden bzw. auch immunpositive Immunzellen und Tumorzellen. Letztlich wurde also jeder Tumorprobe jedes der insgesamt 16 TMAs einzeln klassifiziert. Die *Settings* wurden nach Möglichkeit nicht verändert, mussten jedoch bei Vorliegen vieler Erythrozyten oder bei keratinisierenden Tumoren angepasst werden, weil Erythrozyten und Keratin sonst aufgrund ihres Brechungsindex als schwach gefärbte Tumorzellen erkannt wurden. Die Auswertung erfolgte also nicht standardisiert. Die Ergebnisse wurden für jeden gefärbten Tumor (Primarius und Prognose) zu den Tumordaten der angelegten Datentabelle hinzugefügt. Da die Patienten dieser Stichprobe Bestandteil der Stichproben anderer Doktoranden waren, wurde der durch die Doktorandin der vorliegenden Studie erhobene p16^{INK4a}-Expressionsstatus an andere Doktoranden weitergegeben und durch diese in der Auswertung ihrer Fragestellungen verwendet. Darüber hinaus ist er in einer Publikation verwendet worden (120-122). Die Herkunft der Daten zum p16^{INK4a}-Status wurde darin jeweils kenntlich gemacht. Der Expressionsstatus der übrigen hier untersuchten Proteine war ausschließlich Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit.

Die Unterscheidung zwischen schwacher, moderater und starker Färbung erlaubt, wie oben beschrieben, die Ermittlung bspw. des *H-Scores*, der eine Gewichtung nach Färbeintensität und nicht nur nach Anzahl gefärbter Tumorzellen vornimmt (113) (114). Da jedoch in der Referenzliteratur nicht nach *H-Score* ausgewertet wurde, fand der nach Intensität gewichtete *Score* aus Gründen der Vergleichbarkeit hier ebenfalls keine Anwendung, sondern es wurden die eindeutig immunreaktiven Tumorzellen ausschließlich nach ihrem Anteil an den gesamten Tumorzellen ausgewertet. Das Ergebnis war also jeweils der Anteil immunreaktiver Tumorzellen an dem in der Tumorprobe vorliegenden Gesamttumoranteil. Dabei wurde jeweils der Mittelwert verwendet, da je Protein zwei TMAs ausgewertet wurden. Anhand von Referenzfärbungen und Literaturwerten wurden für jedes Protein *Cut-off*-Werte festgelegt (s. Kap. 3.6), nach denen die Tumoren in die Kategorien Überexpression

(ja/nein) für p16^{INK4a}, p53 und Cyclin-D1 bzw. Expressionsverlust (ja/nein) für RB1 in binäre Variablen übersetzt wurden. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit als die aberranten Expressionsmuster definiert. Für jedes Protein konnte die Gesamtstichprobe in zwei Gruppen, d. h. eine mit und eine ohne aberrantes Expressionsmuster aufgeteilt werden. Außerdem wurde auf dieser Grundlage die Expressionskonsistenz für jeden einzelnen Patienten zwischen Primarius und Progressen ermittelt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels der *Software SPSS® IBM® Statistics Version 23* durchgeführt. Die gesamte statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte ausschließlich explorativ. Es ging bei der Fragestellung also keineswegs um das Testen von vor Untersuchungsbeginn formulierten Hypothesen. Daher wurde auf die multiple Testkorrektur verzichtet. Die generierten p-Werte sind aus diesem Grunde bei Werten von kleiner 0,05 nicht als statistisch signifikant, sondern als statistisch auffällig zu verstehen bzw. bei Werten von bspw. 0,07 als tendenziell statistisch auffällig. Der Zusammenhang zwischen den kategorialen Variablen zur Untersuchung der Expressionskonsistenz, der Patienten- und Tumorcharakteristika sowie des Krankheitsverlaufes wurden mittels Kreuztabellen ausgewertet. Da je Protein zwei Expressionsmuster unterschieden wurden, d. h. je Protein zwei Gruppen bestanden, wurden Tests zur Prüfung von Unterschieden durchgeführt. Für die binären Variablen wurde der exakte Test nach Fisher verwendet und bei den übrigen kategorialen Variablen der Chi²-Test. Die Stichprobe ist insbesondere für die Proteine RB1, p53 und Cyclin-D1 klein, so dass oftmals die einzelnen Ausprägungen, d. h. die einzelnen Felder der Kreuztabelle, für den Chi²-Test nicht mit ausreichender Fallzahl besetzt waren. Die Variablen wurden daher wenn möglich in binäre Variablen transformiert, um den exakten Test nach Fisher durchführen zu können. Für die beiden metrischen Variablen „Alter bei Erstdiagnose“ und „*Body-Mass-Index (BMI)*“ wurde zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilk Test und des QQ-Diagramms die Normalverteilung überprüft und mit Hilfe des Levene Tests die Varianzhomogenität. Wo eine Normalverteilung und eine Varianzhomogenität vorlagen, wurde der T-Test durchgeführt. Lag eine Normalverteilung, aber keine Varianzhomogenität vor, wurde die Welch-Anpassung

verwendet. Lag eine Varianzhomogenität bei nicht normalverteilten Daten vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Effektstärkemaße zur Prüfung von Assoziationen (im Weiteren zum Teil auch als Korrelationen bezeichnet) waren Cohen's d (d) für den T-Test bzw. die Welch-Anpassung und „r“ für den Mann-Whitney-U-Test. Für die nominalen Variablen wurde Cramers V (V) als Effektstärkemaß verwendet. Die Berechnung von Cohen's d und auch die Bewertung der Effektstärkemaße erfolgte mit Hilfe der Webseite www.psychometrica.de (123). Cramers V wurde dabei wie „r“ nach Cohen interpretiert (kleiner Effekt: $V = 0,1-0,3$, mittlerer Effekt: $V = 0,3-0,5$, starker Effekt $V \geq 0,5$) (124).

Für die Überlebenszeitanalyse wurden für jeden Patienten und für jede der drei Überlebenszeitanalysen (Gesamtüberleben, Zeit bis zum ersten Progress, Überleben nach dem ersten Progress) die Monate unter Beobachtung ermittelt. Für das Gesamtüberleben und die Zeit bis zum ersten Progress wurden die Beobachtungsmonate ab Zeitpunkt der Erstdiagnose berechnet. Für das Überleben nach dem ersten Progress war das Datum des ersten Progresses der Start der Berechnungen. Danach wurden für die verschiedenen Analysen jeweils die Ereignisse (Tod für das Gesamtüberleben und für das Überleben nach dem ersten Progress, sowie Progress für die Zeit bis zum ersten Progress) definiert. Die Analyse der Zeit bis zum ersten Progress (*Time To Progression*) umfasst alle Patienten, die einen Progress, definiert als loko-regionären Progress, Fernmetastasen oder Zweittumoren erleiden, unabhängig davon, ob sie nach der Therapie des Primarius krankheitsfrei waren oder lediglich krankheitsstabil. Der Grund für diese Definition besteht darin, die Stichprobe nicht noch weiter zu verkleinern. Das ist auch der Grund dafür, dass Zweittumoren als Krankheitsprogress definiert werden, auch wenn hiermit nicht ausschließlich Zweittumoren des Kopf-Hals-Bereiches gemeint sind. Zensiert in dieser Analyse wurden ausgeschiedene sowie verstorbene Patienten. Es ist daher nicht das progressionsfreie Überleben, das in dieser Arbeit analysiert wird, da bei diesem Patienten, die versterben, nicht zensiert werden. Beide, sowohl das progressionsfreie Überleben als auch die Zeit bis zum Progress, werden in klinischen Studien teils als Surrogat für das Gesamtüberleben verwendet (125, 126), wobei nach *der U.S. Food and Drug Administration (FDA)* das progressionsfreie Überleben besser mit dem Gesamtüberleben korreliert (127). Da das Gesamtüberleben in der vorliegenden Studie ebenfalls untersucht wird, bedarf es hierfür keines Surrogat-Parameters, sondern es interessiert im Speziellen die Progressrate. Wenn man den Endpunkt Tod

als Krankheitsprogress versteht, dann ist dieser in dieser Analyse nicht enthalten. Diese Entscheidung beruhte auf dem Umstand, dass die Todesursache in vielen Fällen nicht ermittelbar war.

Es wurden zunächst sowohl für die Proteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 als auch für alle als *Confounder* infrage kommenden Kovariablen (Geschlecht, Altersgruppe, BMI, Raucheranamnese, Alkoholanamnese, Lebererkrankung, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus, T-, N-, M-Stadium) Kaplan-Meier Kurven und ein Log Rank Test zur Ermittlung von Unterschieden in der jeweiligen Überlebenszeit durchgeführt. Um den Einfluss der einzelnen Proteine auf das jeweilige Überleben zu ermitteln, wurden außerdem univariable Cox-Regressionen berechnet, um die *Hazard Ratio* als Effektstärkemaß zu erhalten. Um festzustellen, ob sich der Effekt nach Bereinigung durch die Effekte der Kovariablen noch nachweisen ließ oder Effekte aufgedeckt werden, die sich in den univariablen Regressionsmodellen nicht zeigten, wurden nach Ausschluss der Multikollinearität multivariate Cox-Regressionen durchgeführt. Die Schwierigkeit bestand darin, dass die Fallzahl sehr gering ist, so dass nicht jeweils ein großes Modell berechnet werden konnte, sondern pro Protein und pro Überlebenszeitanalyse mehrere kleine Modelle gerechnet werden mussten. Gaus und Muche geben zehn unzensierte Fälle als Mindestanzahl pro Variable, nach der kontrolliert wird, an, so dass die hier berechneten Modelle überwiegend bifaktoriell waren¹¹ (128). Jedes Protein wurde also pro Modell nach einer Kontrollvariable adjustiert. Die Modelle selbst, sowie auch die *Hazard Ratios* mussten zumindest tendenziell statistisch auffällig sein, damit der betreffenden Variable ein Effekt zugeschrieben werden konnte.

¹¹ Gaus W, Muche, R. . Medizinische Statistik. Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2017. S.385.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionskonsistenz der Zellzyklusproteine in den Progressen

In einer Vielzahl der Fälle konnte nicht Gewebe aus dem Primarius selbst, sondern ausschließlich Material aus initialen Lymphknotenmetastasen im Rahmen *der Neck Dissection* oder Progressen für die Studie zur Verfügung gestellt werden. Weil ein maligner Tumor eine klonal heterogene Erkrankung ist (129, 130), kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Proteinexpression in den Progressen, denen des Primarius entspricht. In einem ersten Schritt wurden daher die Expressionsmuster im Primarius mit denen in den Progressen verglichen. Hierfür wurde die binäre Variable „Expressionskonsistenz ja/nein“ erstellt. Für diese Frage wurden nur Fälle ausgewertet, in denen neben dem Primarius noch Material aus Rezidiven oder Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen vorlag. Die Anzahl der Fälle unterschied sich für jedes Protein, weil die TMAs nicht alle gleichermaßen vollständig waren. Es zeigte sich für p16^{INK4a} eine 100%ige Konsistenz des p16^{INK4a}-Status (27 von 27) in den Progressen. In nur einem Fall (Fall 8) zeigte die Lymphknotenmetastase keine p16^{INK4a}-Expression bei 80% allein nukleärer p16^{INK4a}-Immunreaktivität im Primarius. Da jedoch ein positiver p16^{INK4a} -Status hier definiert ist als nukleäre UND zytoplasmatische Expression, wird auch dieser Fall in Bezug auf den p16^{INK4a}-Status als konsistent bewertet, d. h. konsistent im Sinne von p16^{INK4a}-negativ. Am schwächsten war die Expressionskonsistenz für p53, bei dem nur in 68% der Fälle (17 von 25) das Expressionsmuster in den Progressen dem des Primarius entsprach. RB1 wurde in 76,9 % (20 von 26) und Cyclin-D1 in 75,9% (22 von 29) in den Folgetumoren gleichsinnig exprimiert (s. Tab. 2).

Tabelle 2 Expressionskonsistenz in den Progressen im Vergleich zum Primarius

Als Progress wurden loko-regionäre Rezidive (LRR), Lymphknoten-(LK)-Metastasen und Fernmetastasen (DM) erfasst.

Protein	Konsistenz	Anzahl Fälle (%)
p16 ^{INK4a}	ja	27/27 (100,0 %)
	nein	0 (0,0 %)
RB1	ja	20/26 (76,9 %)
	nein	6/26 (23,1 %)

p53	ja	17/25 (68,0 %)
	nein	8/25 (32,0 %)
Cyclin-D1	ja	22/29 (75,9 %)
	nein	7/29 (24,1 %)

Die Inkonsistenz der Expression von RB1, p53 und Cyclin-D1 bestand auch beim alleinigen Vergleich von Primarius und den regionalen Lymphknotenmetastasen (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Expressionskonsistenz der Zellzyklusproteine in den regionalen Lymphknoten-(LK)-Metastasen im Vergleich zum Primarius

Protein	Konsistenz	Anzahl der Fälle	%
RB1	ja	14/17	82,35 %
	nein	3/17	17,65 %
p53	ja	9/16	56,25 %
	nein	7/16	43,75 %
Cyclin-D1	ja	15/20	75,0 %
	nein	5/20	25,0 %

Aufgrund dieser Daten wurden für die weitere Studie nur im Fall von p16^{INK4a} die immunhistochemischen Daten aus den Progressen stellvertretend für den Primarius verwendet, so dass für dieses Protein aufgrund des fehlenden Tumormaterials keine wesentlichen Einbußen in der Fallzahl für die Studie entstanden und die Ermittlung des HPV-Status für die gesamte Stichprobe sichergestellt war. Hinsichtlich der anderen Proteine konnten die Analysen nur für die Fälle durchgeführt werden, in denen der Primarius vorlag. Ihre Fallzahl wurde dadurch deutlich reduziert.

Expressionskonsistenz nach p16^{INK4a}-Status

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Expressionskonsistenz von RB1, p53 und Cyclin-D1 mit dem p16^{INK4a}-Status korreliert. Es lässt sich die Frage stellen, ob die HPV-induzierte Kanzerogenese konsistentere Expressionsmuster zeigt, weil hier weniger Mutationen, sondern die Inaktivierung von Proteinen der Pathogenese zugrunde liegt. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Expressionskonsistenzen in einer Kreuztabelle auf den p16^{INK4a} -Status bezogen (Tabelle 4). Sie geben bis auf

eine Ausnahme keinen Hinweis auf eine Tendenz, dass sich konsistente Expressionsmuster in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe häuften. Bei äußerst geringer Fallzahl ist ein statistisch auffälliger Unterschied ($p=0,008$) nur bei Cyclin-D1 angesiedelt, welches in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe ausschließlich ein konsistentes Expressionsmuster in den Progressen bezogen auf das des Primarius zeigt. Die Effektstärke ($V=0,508$) ist hier auch am höchsten. Die Durchführung eines statistischen Tests zur Ermittlung eines Unterschiedes steht bei derart geringen Fallzahlen grundsätzlich infrage. Vielmehr ging es um die Ermittlung des Effektstärkemaßes Cramers V zur Prüfung von Korrelationen. Zusammenfassend könnte also ein positiver p16^{INK4a} -Status mit einer konsistenten Cyclin-D1-Expression korrelieren. Hierbei wurde noch nicht die Art des Expressionsmusters im Sinne von normaler Expression vs. Überexpression unterschieden, sondern es wurde lediglich betrachtet, ob das im Primarius vorliegende Expressionsmuster sich in den Progressen wiederfindet.

Tabelle 4: Expressionskonsistenz in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Status

Protein	Konsistenz		p16 ^{INK4a} -Status		Test (Effektstärke)
			positiv	negativ	
RB1-Konsistenz	ja	Anzahl (Zeilen %)	9 (45,0 %)	11 (55,0 %)	FEX $p=0,170$ ($V=0,324$)
	nein	Anzahl (Zeilen %)	5 (83,3 %)	1 (16,7 %)	
p53-Konsistenz	ja	Anzahl (Zeilen %)	7 (41,2 %)	10 (58,8 %)	FEX $p=1,000$ ($V=0,083$)
	nein	Anzahl (Zeilen %)	4 (50,0 %)	4 (50,0 %)	
Cyclin-D1-Konsistenz	ja	Anzahl (Zeilen %)	13 (59,1 %)	9 (40,9 %)	FEX $p=0,008$ ($V=0,508$)
	nein	Anzahl (Zeilen %)	0 (0,0 %)	7 (100,0 %)	

FEX = Fisher's exakter Test. V= Cramers V.

4.2 Patientencharakteristika nach der Zellzyklusprotein-Expression

4.2.1 Patientencharakteristika nach dem p16^{INK4a}-Expressionsstatus

Tabelle 5 zeigt die Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus.

Tabelle 5: Patientencharakteristika nach dem p16^{INK4a}-Status

Parameter			p16 ^{INK4a} -Status		Test (p-Wert)	Effektstärke
			positiv (n=26)	negativ(n=51)		
Geschlecht	weiblich	Anzahl (Zeilen %)	9 (36,0 %)	16 (64,0 %)	FEX (0,801)	V=0,033
	männlich	Anzahl (Zeilen %)	17 (32,7 %)	35 (67,3 %)		
Alter bei Erstdiagnose	Median		58	61	T-Test (0,447) df=75	Cohen's d=0,184
	Minimum		48	47		
	Maximum		70	78		
verstorben	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (22,2 %)	21 (77,8 %)	FEX (0,005)	V=0,399
	nein	Anzahl (Zeilen %)	16 (61,5 %)	10 (38,5 %)		
Nikotin-Anamnese	ja	Anzahl (Zeilen %)	16 (24,6 %)	49 (75,4 %)	FEX (0,000)	V=0,538
	nein	Anzahl (Zeilen %)	10 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
Alkohol-Anamnese	mäßig	Anzahl (Zeilen %)	15 (62,5 %)	9 (37,5 %)	FEX (0,001)	V=0,472
	hoch	Anzahl (Zeilen %)	5 (16,7 %)	25 (83,3 %)		
Lebererkrankung	ja	Anzahl (Zeilen %)	0 (0,0 %)	8 (100,0 %)	FEX (0,044)	V=0,261
	nein	Anzahl (Zeilen %)	26 (40,0 %)	39 (60,0 %)		
Diabetes mellitus	ja	Anzahl (Zeilen %)	3 (30,0 %)	7 (70,0 %)	FEX (1,000)	V=0,032
	nein	Anzahl (Zeilen %)	22 (34,4 %)	42 (65,6 %)		
Nierenerkrankung	ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)	FEX (1,000)	V=0,036
	nein	Anzahl (Zeilen %)	23 (34,3 %)	44 (65,7 %)		
Initialer BMI	Median		25,83	24,21	Welch (0,153) df=73,78	Cohen's' d=-0,295
	Minimum		22,84	14,86		
	Maximum		32,49	41,04		

BMI = Body-Mass-Index, FEX= Fisher's exakter Test, V= Cramers V, df= Freiheitsgrade. Welch=Welchanpassung

Gemessen an den Effektstärkemaßen zeigt sich eine starke Korrelation mit dem p16^{INK4a}-Status nur in Bezug auf das Raucherverhalten. Die Stichprobe hat insgesamt sehr wenig Patienten, die im Anästhesieprotokoll angegeben haben, Nicht-Raucher zu sein, und diese kommen ausschließlich in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe vor, während in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe ausschließlich Raucher vertreten sind (V=0,538). Dieser Unterschied zeigt sich auch im Signifikanztest ($p < 0,001$).

Tendenziell stark mit einem negativen p16^{INK4a}-Status korreliert ein hoher Alkoholkonsum (V=0,472). Auch hier zeigt sich der exakte Test nach Fischer statistisch auffällig ($p = 0,001$). Der relative Anteil der Patienten, die verstorben sind, ist in der p16^{INK4a}-negativen höher als in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe (21/31, 67,74% vs. 6/22, 27,27%, V = 0,399). Hierbei zeigt sich auch ein statistisch auffälliger p-Wert ($p = 0,005$). Dieser Vergleich wurde nur zur groben Betrachtung dessen, wie die Todesfälle

zwischen den beiden Gruppen verteilt sind, angestellt. Es wird dabei nicht berücksichtigt, wie lange die Patienten jeweils unter Risiko standen. Maßgeblich ist daher die Analyse des Gesamtüberlebens (s. Kap. 4.5.2). Ein weiterer, jedoch knapp statistisch auffälliger Unterschied ergibt sich in Bezug auf Lebererkrankungen ($p=0,044$). Diese kommen nur in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe vor. Die Korrelation mit dem p16^{INK4a}-Status ist lediglich schwach ($V=0,261$). Der initiale BMI korreliert mittelgradig mit dem p16^{INK4a}-Status, wobei der mediane BMI in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe höher ist. Ein statistisch auffälliger Unterschied besteht diesbezüglich nicht. Die Variablen Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Diabetes mellitus und Nierenerkrankung korrelieren nicht mit dem p16^{INK4a}-Status.

4.2.2 Patientencharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus

Tabelle 6 zeigt die Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus (\pm RB1-Expressionsverlust des Primarius).

Tabelle 6: Patientencharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus des Primarius

Parameter			Expressionsverlust Primarius RB1		Test (p-Wert)	Effektstärke
			Ja (n=38)	Nein (n=11)		
Geschlecht	Weiblich	Anzahl (Zeilen %)	10 (83,3 %)	2 (16,7 %)	FEX (0,708)	V=0,079
	Männlich	Anzahl (Zeilen %)	28 (75,7 %)	9 (24,3 %)		
Alter bei Erstdiagnose	Median		62	54	T (0,010) df=47	Cohens d -0,917
	Minimum		52	47		
	Maximum		77	78		
verstorben	Ja	Anzahl (Zeilen %)	12 (80,0 %)	3 (20,0 %)	FEX (0,265)	V=0,228
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	10 (58,8 %)	7 (41,2 %)		
Nikotin-Anamnese	Ja	Anzahl (Zeilen %)	34 (79,1 %)	9 (20,9 %)	FEX (0,321)	V=0,139
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)		
Alkohol-Anamnese	Mäßig	Anzahl (Zeilen %)	11 (73,3 %)	4 (26,7 %)	FEX (0,370)	V=0,210
	Hoch	Anzahl (Zeilen %)	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)		
Lebererkrankung	Ja	Anzahl (Zeilen %)	7 (100,0 %)	0 (0,0 %)		V=0,209
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	30 (76,9 %)	9 (23,1 %)		
Diabetes mellitus	Ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (75,0 %)	2 (25,0 %)	FEX (1,000)	V=0,027
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (78,0 %)	9 (22,0 %)		
Nierenerkrankung	Ja	Anzahl (Zeilen %)	4 (100,0 %)	0 (0,0 %)	FEX (0,562)	V=0,163
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (76,2 %)	10 (23,8 %)		

Initialer BMI	Median	25,68	24,21	T (0,752)	Cohens d
	Minimum	14,86	19,62	df= 47	-0,109
	Maximum	41,04	31,83		

BMI = Body-Mass-Index, FEX= Fisher's exakter Test, V= Cramers V, df= Freiheitsgrade., T=T-Test

Stratifiziert nach dem RB1-Status zeigt sich ein statistisch auffälliger Unterschied nur im Hinblick auf das Alter bei Erstdiagnose, wobei das mediane Alter in der Gruppe mit RB1-Expressionsverlust etwas höher ist als in der Gruppe ohne RB1-Verlust ($p=0,010$, $df=47$, $d=0,917$). Wie das Effektstärkemaß zeigt, besteht eine starke Korrelation zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und dem Expressionsmuster von RB1 ($d=0,917$). Weitere statistisch auffällige Unterschiede zeigen sich nicht. Ein hoher Alkoholkonsum und Lebererkrankungen korrelieren schwach mit dem RB1-Expressionsverlust und so auch Nierenerkrankungen. Der relative Anteil der Patienten, die verstorben sind, ist in der Gruppe mit RB1-Expressionsverlust höher als in der Gruppe ohne RB1-Verlust (12/22, 54,55% vs. 3/10, 30,00%). Hierbei interessierte nur die grundsätzliche Verteilung von Todesfällen zwischen den Gruppen. Es wird dabei jedoch außer Acht gelassen, dass die Personen jeweils unterschiedlich lange unter Risiko standen. Die Mortalitätsrate wird daher in der Analyse des Gesamtüberlebens (s. Kap. 4.5.2) ermittelt. Statistisch auffällig ist dieser Unterschied nicht und auch die Korrelation ist schwach ($V=0,228$). Weitere Korrelationen bestehen nicht. Bei der Auswertung des RB1-Expressionsmusters im Zusammenhang mit den Patienteneigenschaften ist zu beachten, dass möglicherweise ein systematischer Fehler zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust geführt haben könnte (s. Kap. 5.8).

4.2.3 Patientencharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus

Tabelle 7 zeigt die Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus (\pm p53-Überexpression des Primarius).

Tabelle 7: Patientencharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus des Primarius

			Primarius Überexpression p53			
			Ja (n=34)	Nein (n=18)	Test (p-Wert)	Effektstärke
Geschlecht	weiblich	Anzahl (Zeilen %)	11 (68,8 %)	5 (31,3 %)	FEX (1,000)	V=0,047
	männlich	Anzahl (Zeilen %)	23 (63,9 %)	13 (36,1 %)		
Alter bei Erstdiagnose	Median		60	60	Welch (0,812) df=49,17	Cohen's d=-0,06
	Minimum		47	53		
	Maximum		78	68		
verstorben	ja	Anzahl (Zeilen %)	10 (66,7 %)	5 (33,3 %)	FEX (1,000)	V=0,060
	nein	Anzahl (Zeilen %)	13 (72,2 %)	5 (27,8 %)		
Nikotin-Anamnese	ja	Anzahl (Zeilen %)	32 (69,6 %)	14 (30,4 %)	FEX (0,047)	V=0,308
	nein	Anzahl (Zeilen %)	1 (20,0 %)	4 (80,0 %)		
Alkohol-Anamnese	mäßig	Anzahl (Zeilen %)	9 (60,0 %)	6 (40,0 %)	FEX (1,000)	V=0,032
	hoch	Anzahl (Zeilen %)	12 (63,2 %)	7 (36,8 %)		
Lebererkrankung	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (85,7 %)	1 (14,3 %)	FEX (0,397)	V=0,175
	nein	Anzahl (Zeilen %)	26 (61,9 %)	16 (38,1 %)		
Diabetes mellitus	ja	Anzahl (Zeilen %)	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)	FEX (1,000)	V=0,026
	nein	Anzahl (Zeilen %)	29 (65,9 %)	15 (34,1 %)		
Nierenerkrankung	ja	Anzahl (Zeilen %)	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)	FEX (1,000)	V=0,038
	nein	Anzahl (Zeilen %)	29 (65,9 %)	15 (34,1 %)		
Initialer BMI	Median		25,27	25,7	MWU (0,766)	r=0,041
	Minimum		17,03	14,86		
	Maximum		41,04	34,94		

FEX= Fisher's exakter Test, V= Cramers V, MWU= Mann-Whitney-U Test, df= Freiheitsgrade.

Ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne p53-Überexpression besteht allein in Bezug auf den Nikotinkonsum, wobei die Stichprobe nur sehr wenige Nichtraucher umfasst. In der Gruppe mit p53-Überexpression sind im Vergleich zu der anderen Gruppe doppelt so viele Raucher, während in der Gruppe ohne p53-Überexpression 4 der insgesamt 5 Patienten Nichtraucher ($p=0,047$) sind. Weil die Fallzahl sehr gering ist, könnte es sich hierbei auch um Zufall handeln. Die Korrelation ist mittelgradig ($V=0,308$). Eine schwache Korrelation besteht zwischen der p53-Überexpression und Lebererkrankungen ($p=0,175$). Allerdings ist die Fallzahl sehr gering. Mit den anderen Variablen sind keine Assoziationen nachweisbar. Der Anteil Verstorbener ist in beiden Gruppen hoch.

4.2.4 Patientencharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus

Tabelle 8 zeigt die Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus (\pm Cyclin-D1-Überexpression des Primarius).

Tabelle 8: Patientencharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius

			Primarius Cyclin-D1 Überexpression		Test (p-Wert)	Effektstärke
			Ja (n=26)	Nein (n=32)		
Geschlecht	weiblich	Anzahl (Zeilen%)	9 (52,9 %)	8 (47,1 %)	FEX (0,563)	V=0,105
	männlich	Anzahl (Zeilen%)	17 (41,5 %)	24 (58,5 %)		
Alter Erstdiagnose	bei Median		61,5	58	T-Test (0,010) df=47	Cohen d=0,231
	Minimum		50	47		
	Maximum		77	78		
verstorben	Ja	Anzahl (Zeilen%)	11 (55,0 %)	9 (45,0 %)	FEX (0,020)	V=0,397
	Nein	Anzahl (Zeilen%)	3 (16,7 %)	15 (83,3 %)		
Nikotin-Anamnese	Ja	Anzahl (Zeilen%)	25 (49,0 %)	26 (51,0 %)	FEX (0,030)	V=0,303
	Nein	Anzahl (Zeilen%)	0 (0,0 %)	6 (100,0 %)		
Alkohol-Anamnese	mäßig	Anzahl (Zeilen%)	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)	FEX (0,104)	V=0,289
	hoch	Anzahl (Zeilen%)	12 (52,2 %)	11 (47,8 %)		
Lebererkrankung	Ja	Anzahl (Zeilen%)	6 (75,0 %)	2 (25,0 %)	FEX (0,120)	V=0,256
	Nein	Anzahl (Zeilen%)	18 (39,1 %)	28 (60,9 %)		
Diabetes mellitus	Ja	Anzahl (Zeilen%)	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)	FEX (0,717)	V=0,092
	Nein	Anzahl (Zeilen%)	21 (42,9 %)	28 (57,1 %)		
Nierenerkrankung	Ja	Anzahl (Zeilen%)	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)	FEX (0,640)	V=0,112
	Nein	Anzahl (Zeilen%)	20 (40,8 %)	29 (59,2 %)		
Initialer BMI	Median		23,8	25,76	T-Test (0,752) df=47	Cohen d=0,213
	Minimum		16,87	14,86		
	Maximum		35,16	41,04		

BMI = Body-Mass-Index, FEX= Fisher's exakter Test, V= Cramers V, df= Freiheitsgrade.

Statistisch auffällige Unterschiede zeigen sich im Patientenalter bei Erstdiagnose, wobei die Patienten in der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression im Median älter sind (61,5 vs. 58 Jahre, $p=0,010$, $df=47$, Cohen's $d=0,231$). Cohen's d zeigt eine geringe Effektstärke. Darüber hinaus bestehen statistisch auffällige Unterschiede zum einen in der Anzahl verstorbener Patienten ($p=0,020$, $V=0,397$), wobei die relative Anzahl Verstorbener in der Cyclin-D1 überexprimierenden Gruppe höher ist (11/14, 78,57% vs. 9/24, 37,5%), und zum anderen in dem Anteil an Nichtrauchern, die es nur in der

Gruppe ohne Cyclin-D1-Überexpression gibt ($p=0,030$, $V=0,303$). Die Assoziation für beide letztgenannten Variablen ist mittelgradig. Die übrigen Korrelationen sind schwach. In Bezug auf die Prävalenz von Diabetes mellitus ist keine Korrelation nachweisbar. In Bezug auf den Anteil Verstorbener ist zu bedenken, dass dieser Unterschied nur deskriptiv zu verstehen ist und die Verteilung der Daten beschreibt. Die Personen stehen unterschiedlich lange unter Risiko, weil teilweise auch Patienten vorzeitig aus der Beobachtung ausscheiden. Einen statistischen Test für diese Variable aus anderen als deskriptiven Gründen durchzuführen, ist daher fragwürdig. Die Betrachtung der Mortalitätsrate und des Einflusses der hier beschriebenen Zellzyklusproteine auf diese erfolgt in der Analyse des Gesamtüberlebens (s. Kap. 4.5.2).

4.3 Tumorcharakteristika der Zellzyklusprotein-Expression

4.3.1 Tumorcharakteristika nach dem p16^{INK4a}-Expressionsstatus

Tabelle 9 zeigt die Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus.

Tabelle 9: Tumorcharakteristika nach dem p16^{INK4a}-Status

			p16 ^{INK4a} -Status			
			positiv	negativ	Test (p-Wert)	Effektstärke
T-Stadium	1-2	Anzahl (Zeilen %)	19 (37,3 %)	32 (62,7 %)	FEX (0,455)	V=0,092
	3-4	Anzahl (Zeilen %)	7 (28,0 %)	18 (72,0 %)		
N-Stadium	N0	Anzahl (Zeilen %)	6 (25,0 %)	18 (75,0 %)	Chi ² (0,422) df=2	V=0,155
	N1-N2a	Anzahl (Zeilen %)	6 (46,2 %)	7 (53,8 %)		
	N2b-2c	Anzahl (Zeilen %)	12 (34,3 %)	23 (65,7 %)		
M-Stadium	M0	Anzahl (Zeilen %)	16 (38,1 %)	26 (61,9 %)		
	M1	Anzahl (Zeilen %)	2 (33,3 %)	4 (66,7 %)		
Lokalisation repräsentativ	zumeist Weichgaumen/Uvula	Anzahl (Zeilen %)	2 (10,5 %)	17 (89,5 %)	Chi ² (0,002) df=3	V=0,444
	Zungengrund/Vallecula/ling. Epiglottisfl.	Anzahl (Zeilen %)	5 (22,7 %)	17 (77,3 %)		
	Tonsilla palatina	Anzahl (Zeilen %)	17 (60,7 %)	11 (39,3 %)		
	Andere (GTF, RHW, CUP)	Anzahl (Zeilen %)	2 (25,0 %)	6 (75,0 %)		
Expressionsverlust RB1 (Primarius)	1 (ja)	Anzahl (Zeilen %)	12 (33,3 %)	24 (66,7 %)	FEX (0,493)	V=0,107
	2 (nein)	Anzahl (Zeilen %)	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)		
	1 (ja)	Anzahl (Zeilen %)	8 (25,0 %)	24 (75,0 %)		

Überexpression p53 (Primarius)	2 (nein)	Anzahl (Zeilen %)	10 (55,6 %)	8 (44,4 %)		
Überexpression Cyclin-D1 (Primarius)	1 (ja)	Anzahl (Zeilen %)	1 (4,8 %)	20 (95,2 %)	FEX (<0,001)	V=0,525
	2 (nein)	Anzahl (Zeilen %)	18 (56,3 %)	14 (43,8 %)		

GTF = Glossotonsillarfurche, RHW = Rachenhinterwand, CUP = Cancer of unknown Primarius, FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.= erwartete Häufigkeit, ling. Epiglottisfl.=linguale Epiglottisfläche

Statistisch auffällige Unterschiede zwischen der p16^{INK4a}-positiven und p16^{INK4a}-negativen Gruppe zeigen sich in der Tumorlokalisation und in dem p53- sowie Cyclin-D1-Expressionsmuster. In der p16^{INK4a}-positiven Gruppe zeigen sich die häufigsten Primärtumoren hauptsächlich in der Tonsilla palatina (17/26, 65,39%). In der p16^{INK4a}-negativen Gruppe sind die Tumoren hauptsächlich am Weichgaumen / an der Uvula- oder in der Zungengrundregion (34/51, 66,67%) lokalisiert (Chi² (3)=0,002, V=0,444). Cramers V zeigt eine mittelstarke Korrelation. In der p16^{INK4a}-negativen Gruppe ist die Überexpression von p53 statistisch auffällig, wobei die Assoziation mittelstark ist (p=0,038, V=0,306). Eine starke Assoziation besteht zwischen einer Cyclin-D1 Überexpression und einem negativen p16^{INK4a}-Status (V=0,525). Eine Cyclin-D1-Überexpression zeigt sich statistisch auffällig häufiger in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe (p<0,001). Die übrigen Variablen zeigen nur schwache Effekte. Für das T-Stadium und insbesondere auch für das N-Stadium, das sich in anderen Studien bei den p16^{INK4a}-positiven Tumoren fortgeschrittener gezeigt hat, lassen sich keine Assoziation mit dem p16^{INK4a}-Status nachweisen.

4.3.2 Tumorcharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus

Tabelle 10 zeigt die Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus (± RB1-Expressionsverlust des Primarius).

Tabelle 10: Tumorcharakteristika nach dem RB1-Expressionsstatus des Primarius

		Primarius Expressionsverlust RB1				
			ja	nein	Test (p-Wert)	Effektstärke
T-Stadium	1-2	Anzahl	28 (75,7 %)	9 (24,3 %)	FEX (0,708)	V=0,079
	3-4	Anzahl	10 (83,3 %)	2 (16,7 %)		
N-Stadium	N0	Anzahl	18 (85,7 %)	3 (14,3 %)	Chi ² (0,485) df=2	V=0,175
	N1-N2a	Anzahl	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)		
	N2b-2c	Anzahl	13 (76,5 %)	4 (23,5 %)		
M-Stadium	M0	Anzahl	23 (79,3 %)	6 (20,7 %)		
	M1	Anzahl	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
Lokalisation zumeist repräsentativ	Weichgaumen/Uvula	Anzahl	16 (94,1 %)	1 (5,9 %)	Chi ² (0,144)	V=0,332
	Zungengrund/Vallecula/ ling. Epiglottisfl.	Anzahl	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)		
	Tonsilla palatina	Anzahl	13 (76,5 %)	4 (23,5 %)		
	andere(GTF, RHW, CUP)	Anzahl	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)		
p16 ^{INK4a} Überexpression	ja	Anzahl	12 (70,6 %)	5 (29,4 %)	FEX (0,493)	V=0,107
	nein	Anzahl	24 (80,0 %)	6 (20,0 %)		
p53 Überexpression	1 (ja)	Anzahl	23 (76,7 %)	7 (23,3 %)	FEX (0,463)	V=0,130
	2 (nein)	Anzahl	14 (87,5 %)	2 (12,5 %)		
Cyclin-D1 Überexpression	1 (ja)	Anzahl	17 (94,4 %)	1 (5,6 %)	FEX (0,067)	V=0,291
	2 (nein)	Anzahl	21 (70,0 %)	9 (30,0 %)		

GTF = Glossotonsillarfurche, RHW = Rachenhinterwand, CUP = Cancer of unknown Primarius, FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.=erwartete Häufigkeit, ling. Epiglottisfl.=linguale Epiglottisfläche.

Hinsichtlich der Tumorcharakteristika lassen sich keine statistisch auffälligen Unterschiede zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne RB1-Expressionsverlust nachweisen. Tendenziell statistisch auffällig ($p=0,067$) ist allein der Cyclin-D1-Expressionsstatus, wobei in der Gruppe ohne RB1-Expressionsverlust eine normale Cyclin-D1-Expression am häufigsten vorkommt (9/10 Patienten). Die Korrelation ist schwach ($V=0,291$). Innerhalb der Gruppe mit RB1-Verlust, die sehr viel größer ist, ist die Cyclin-D1-Expression beinahe gleich verteilt. In Bezug auf die Effekte gibt es nur eine mittelstarke Assoziation zwischen den Tumorlokalisationen Weichgaumen/Uvula bzw. Tonsilla palatina und RB1-Expressionsverlust ($V=0,332$). Innerhalb der Gruppe mit normaler RB1-Expression sind die Lokalisationen überwiegend gleich verteilt. Hinsichtlich der übrigen Variablen sind nur schwache Effekte bzw. für das T-Stadium kein Effekt sichtbar. Das könnte daran liegen, dass, um den Signifikanztest durchführen zu können, eine binäre Variable daraus gemacht wurde. In beiden Gruppen sind die meisten Patienten in den beiden geringeren T-Stadien (T1, T2) angesiedelt. Bei der Auswertung des RB1-Expressionsmusters im Zusammenhang mit den Tumoreigenschaften ist zu beachten, dass möglicherweise ein systematischer

Fehler zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust geführt haben könnte (siehe Kap. 5.8).

4.3.3 Tumorcharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus

Tabelle 11 zeigt die Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus (\pm p53-Überexpression des Primarius).

Tabelle 11: Tumorcharakteristika nach dem p53-Expressionsstatus des Primarius

			Primarius Überexpression p53					
			ja	nein	Test (p-Wert)	Effektstärke		
T-Stadium	1-2	Anzahl (Zeilen %)	26 (66,7 %)	13 (33,3 %)	FEX (0,747)	V=0,047		
	3-4	Anzahl (Zeilen %)	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)				
N-Stadium	N0	Anzahl (Zeilen %)	16 (72,7 %)	6 (27,3 %)	Chi ² (0,412) df=2	V=0,190		
	N1-N2a	Anzahl (Zeilen %)	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)				
	N2b-2c	Anzahl (Zeilen %)	10 (52,6 %)	9 (47,4 %)			37,5 % e. H<5	
M-Stadium	M0	Anzahl (Zeilen %)	22 (68,8 %)	10 (31,3 %)				
	M1	Anzahl (Zeilen %)	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)				
Lokalisation repräsentativ	zumeist	Weichgaumen/Uvula	Anzahl (Zeilen %)	17 (81,0 %)	4 (19,0 %)	Chi ² (0,127) df=3	V=0,331	
		Zungengrund/Vallecula/ling. Epiglottisfl.	Anzahl (Zeilen %)	5 (71,4 %)	2 (28,6 %)			
		Tonsilla palatina	Anzahl (Zeilen %)	7 (43,8 %)	9 (56,3 %)			37,5 % e. H<5
		andere(GTF, RHW, CUP)	Anzahl (Zeilen %)	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)			
Expressionsverlust RB1	ja	Anzahl (Zeilen %)	23 (62,2 %)	14 (37,8 %)	FEX (0,463)	V=0,130		
	nein	Anzahl (Zeilen %)	7 (77,8 %)	2 (22,2 %)				
Überexpression p16 ^{INK4a}	ja	Anzahl (Zeilen %)	8 (44,4 %)	10 (55,6 %)	FEX (0,038)	V=0,306		
	nein	Anzahl (Zeilen %)	24 (75,0 %)	8 (25,0 %)				
Überexpression Cyclin-D1	ja	Anzahl (Zeilen %)	17 (77,3 %)	5 (22,7 %)	FEX (0,142)	V=0,229		
	nein	Anzahl (Zeilen %)	16 (55,2 %)	13 (44,8 %)				

GTF = Glossotonsillarfurche, RHW = Rachenhinterwand, CUP = Cancer of unknown Primarius, FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.= erwartete Häufigkeit, ling. Epiglottisfl. = linguale Epiglottisfläche

Ein statistisch auffälliger Gruppenunterschied hinsichtlich der p53-Expression besteht allein in Bezug auf den p16^{INK4a}-Status (p=0,038). Hierbei korreliert ein negativer p16^{INK4a}-Status mit der p53-Überexpression mittelstark, wie oben bereits berichtet wurde. Eine weitere mittelstarke Assoziation, die jedoch nicht statistisch auffällig ist, besteht zwischen der Tumorlokalisierung und dem p53-Status, wobei Primärtumoren der Weichgaumen/Uvula-Region häufiger mit einer Überexpression von p53

einhergehen, während die Tumoren der Tonsilla palatina überwiegend mit einer normalen p53-Expression oder mit einem Expressionsverlust von p53 einhergehen. Die übrigen Variablen sind schwach mit dem p53-Status assoziiert. Das T-Stadium zeigt auch hier keinerlei Assoziation.

4.3.4 Tumorcharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus

Tabelle 12 zeigt die Tumorcharakteristika in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus (\pm Cyclin-D1-Überexpression des Primarius).

Tabelle 12: Tumorcharakteristika nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius

		Primarius Cyclin-D1 Überexpression		T-Test (p-Wert)	Effektstärken		
		Ja	nein				
T-Stadium	1-2	Anzahl	19 (45,2 %)	23 (54,8 %)	FEX (1,000)	V=0,013	
	3-4	Anzahl	7 (43,8 %)	9 (56,3 %)			
N-Stadium	N0	Anzahl	10 (47,6 %)	11 (52,4 %)	Chi ² (0,769) df=2 (16,7 % e. H<5)	V=0,098	
	N1-N2a	Anzahl	3 (33,3 %)	6 (66,7 %)			
	N2b-2c	Anzahl	11 (44,0 %)	14 (56,0 %)			
M-Stadium	M0	Anzahl	13 (39,4 %)	20 (60,6 %)	Kein Test bei zu geringer N		
	M1	Anzahl	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)			
Lokalisation repräsentativ	zumeist	Weichgaumen/Uvula	Anzahl	12 (60,0 %)	8 (40,0 %)	Chi ² (0,057) df=3 (50,0 % e. H<5)	V=0,360
		Zungengrund/Vallecula/ling. Epiglottisfl.	Anzahl	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)		
		Tonsilla palatina	Anzahl	5 (23,8 %)	16 (76,2 %)		
		Andere (GTF, RHW, CUP)	Anzahl	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)		
Expressionsverlust (Primarius)	RB1	ja	Anzahl	17 (44,7 %)	21 (55,3 %)	FEX (0,067)	V=0,291
		nein	Anzahl	1 (10,0 %)	9 (90,0 %)		
Überexpression p16 ^{INK4a}	ja	ja	Anzahl	1 (5,3 %)	18 (94,7 %)	FEX (0,000)	V=0,525
		nein	Anzahl	20 (58,8 %)	14 (41,2 %)		
Überexpression (Primarius)	p53	ja	Anzahl	17 (51,5 %)	16 (48,5 %)	FEX (0,142)	V=0,229
		nein	Anzahl	5 (27,8 %)	13 (72,2 %)		

GTF = Glosotonsillarfurche, RHW = Rachenhinterwand, CUP = Cancer of unknown Primarius, FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e. H. = erwartete Häufigkeit, ling. Epiglottisfl. = linguale Epiglottisfläche.

Ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht allein im p16^{INK4a}-Status (p<0,001), wobei in der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression die Tumoren fast ausschließlich p16^{INK4a}-negativ sind. Die Assoziation zwischen einer Cyclin-D1-Überexpression und einem negativen p16^{INK4a}-Status ist gemäß Cramers V stark (V=0,525). Tendenziell statistisch auffällig zeigt sich ein Unterschied in der RB1-

Expression ($p=0,067$). In der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression zeigen sich mit einer einzigen Ausnahme ausschließlich Tumoren mit RB1-Expressionsverlust. Die Assoziation ist jedoch schwach ($V=0,291$), und es ist zu bedenken, dass die Gruppe der Patienten mit normaler RB1-Expression vergleichsweise schwach besetzt ist, was mutmaßlich ein systematischer Fehler ist (siehe Kap. 5.8). Für die Tumorklassifikation ist der tendenziell statistisch auffällige Chi²-Test nicht zu verwenden, weil die Fallzahl für die einzelnen Ausprägungen zu gering ist (50% erwartete Häufigkeit < 5), die Effektstärke zeigt sich jedoch mittelgradig ($V=0,360$). Während in der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression die Tumoren insbesondere am Weichgaumen / an der Uvula lokalisiert sind, finden sich die Tumoren in der Gruppe ohne Cyclin-D1-Überexpression in den Gaumenmandeln. Das T-Stadium zeigt auch hier keine Unterschiede in der Verteilung zwischen den beiden Gruppen.

4.4 Krankheitsverlauf nach der Zellzyklusprotein-Expression

4.4.1 Krankheitsverlauf nach dem p16^{INK4a}-Expressionsstatus

Tabelle 13 zeigt den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus.

Tabelle 13: Krankheitsverlauf nach dem p16^{INK4a}-Status

			p16 ^{INK4a} -Status		Test (p-Wert)	Effektstärke
			positiv	negativ		
Progress	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (16,7 %)	30 (83,3 %)	FEX (0,004)	V=0,339
	nein	Anzahl (Zeilen %)	20 (48,8 %)	21 (51,2 %)		
>1 Progress	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (30,0 %)	14 (70,0 %)	FEX (0,787)	V=0,047
	nein	Anzahl (Zeilen %)	20 (35,1 %)	37 (64,9 %)		
Art des ersten Progresses	LRR (Zeilen %)		2 (11,1 %)	16 (88,9 %)	Chi ² (0,021)	V=0,565
	SPT (Zeilen %)		1 (12,5 %)	7 (87,5 %)		
	DM (Zeilen %)		1 (25,0 %)	3 (75,0 %)		
	SPT DD: DM (Zeilen %)		0 (0,0 %)	4 (100,0 %)	80,0 % e. H. < 5	
	Primärtumor (Zeilen %)		2 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
Loko-regionäres Rezidiv (LRR)	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (26,1 %)	17 (73,9 %)	FEX (0,435)	V=0,106
	nein	Anzahl (Zeilen %)	20 (37,0 %)	34 (63,0 %)		
Zweitumor (SPT)	ja	Anzahl (Zeilen %)	1 (10,0 %)	9 (90,0 %)	FEX (0,151)	V=0,194
	nein	Anzahl (Zeilen %)	25 (37,3 %)	42 (62,7 %)		

Zweitumor DD: Fern-	ja	Anzahl (Zeilen %)	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	FEX (0,657)	V=0,105
Metastase (SPT DD: nein DM)		Anzahl (Zeilen %)	25 (35,2 %)	46 (64,8 %)		
Fernmetastase (DM)	ja	Anzahl (Zeilen %)	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	FEX (1,000)	V=0,027
	nein	Anzahl (Zeilen %)	23 (33,3 %)	46 (66,7 %)		

FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade.

Hinsichtlich des Unterschiedes im Krankheitsverlauf zeigt sich ein statistisch auffälliger Unterschied nur in der Anzahl von Patienten, die einen Progress (definiert als loko-regionäres Rezidiv, Fernmetastase, Zweitumor) erlitten haben. In der p16^{INK4a}-negativen Gruppe erlitten statistisch auffällig mehr Patienten Progressen als in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe (p=0,004). Die Assoziation ist knapp mittelgradig (V=0,339). Selbstverständlich gilt bezüglich dieses Punktes die Einschränkung, dass die Patienten aufgrund von Versterben oder Ausscheiden aus der Beobachtung unterschiedlich lange unter Risiko standen, sodass man die Verteilung von Progressen zwischen den Gruppen mithilfe von Überlebenszeitanalyse (s. Kap. 4.6.2) ermittelt, wie es in dieser Studie auch geschehen ist. Die hier beschriebenen Daten wurden rein deskriptiv erhoben, um die grundsätzliche Verteilung der Daten zu betrachten.

Hinsichtlich der Art des ersten Progresses ist auffällig, dass loko-regionäre Rezidive in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe den häufigsten ersten Progress darstellen, während in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe die unterschiedlichen Arten des ersten Progresses recht gleich über die Ausprägungen verteilt sind. Der statistisch auffällige Chi²-Test ist nicht zu verwerten, weil die Ausprägungen zu wenig Fälle enthalten. Bemerkenswert in Bezug auf den ersten Progress ist die starke Assoziation zwischen loko-regionären Rezidiven und p16^{INK4a}-negativem Status (V=0,565).

Betrachtet man die Häufigkeit der einzelnen Arten von Progressen über den gesamten Krankheitsverlauf, d. h. unabhängig davon, ob es sich um den ersten Progress handelt oder um einen der weiteren Progressen eines Patienten, lassen sich nur schwache Assoziationen zwischen der Art des Progresses und dem p16^{INK4a}-Status nachweisen (LRR V=0,106, SPT V=0,194) bzw. für Fernmetastasen gar keine Assoziation (V=0,027). Loko-regionäre Rezidive sind in beiden Gruppen deskriptiv die häufigste Progressform. Alle Patienten mit positivem p16^{INK4a}-Status hatten im Verlauf ein loko-regionäres Rezidiv. Die Fallzahl ist sehr gering, so dass es sich hierbei um Zufall handeln kann.

Tabelle 14: Fernmetastasen nach dem p16^{INK4a}-Status

Lokalisation Fernmetastasen			p16 ^{INK4a} -Status	
			positiv	negativ
pulmonal	ja	Anzahl (%)	2 (22,2 %)	7 (77,8 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Weichteile	ja	Anzahl (%)	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
ossär	ja	Anzahl (%)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
thorakal	ja	Anzahl (%)	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
hepatisch	ja	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Gl. parotis/ Gl. thyreoidea	ja	Anzahl (%)	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)
	nein	Anzahl (%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

Tabelle 14 zeigt die Metastasierungsorte stratifiziert nach p16^{INK4a}-Status, wobei hierin auch Fernmetastasen von Zweittumoren enthalten sind. Für die p16^{INK4a}-positive Gruppe lässt sich kein spezielles Metastasierungsmuster ausmachen, was der geringen Fallzahl in der Gruppe geschuldet ist. In der p16^{INK4a}-negativen Gruppe sind pulmonale Metastasen die häufigste Art von Fernmetastasen. Ein Zusammenhang zwischen einem disseminierten Metastasierungsmuster mit einem positiven p16^{INK4a}-Status ließ sich nicht nachweisen.

4.4.2 Krankheitsverlauf nach dem RB1-Expressionsstatus

Tabelle 15 zeigt den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus (± RB1-Expressionsverlust im Primarius).

Tabelle 15: Krankheitsverlauf nach RB1-Expressionsstatus

			Primarius Expressionsverlust RB1		Test (p-Wert)	Effektstärke
			ja	nein		
Progress	Ja	Anzahl (Zeilen %)	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)	FEX (0,298)	V=0,174
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	25 (83,3 %)	5 (16,7 %)		
>1 Progress	Ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (75,0 %)	2 (25,0 %)	FEX (1,000)	V=0,027
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (78,0 %)	9 (22,0 %)		
Art des Progresses	1. LRR (Zeilen %)		2 (33,3 %)	4 (66,7 %)	Chi ² (0,162)	V= 0,587
	SPT (Zeilen %)		6 (85,7)	1 (14,3 %)		
	DM (Zeilen %)		1 (50,0 %)	1 (50,0 %)		
	SPT DD: DM (Zeilen %)		2 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
	Primärtumor (Zeilen %)		2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	100 % e. H.<5	
Loko-regionäres Rezidiv (LRR)	ja	Anzahl (Zeilen %)	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)	FEX (0,179)	V=0,250
	nein	Anzahl (Zeilen %)	33 (82,5 %)	7 (17,5 %)		
Zweittumor (SPT)	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (85,7 %)	1 (14,3 %)	FEX (1,000)	V=0,080
	nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (76,2 %)	10 (23,8 %)		
SPT DD: DM	Ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	FEX (1,000)	V=0,111
	nein	Anzahl (Zeilen %)	36 (76,6 %)	11 (23,4 %)		
Fernmetastase (DM)	ja	Anzahl (Zeilen %)	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	FEX (1,000)	V=0, 018
	nein	Anzahl (Zeilen %)	35 (77,8 %)	10 (22,2 %)		

FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.=erwartete Häufigkeit. DD: differentialdiagnostisch

Statistisch auffällige Unterschiede zeigen sich stratifiziert nach RB1-Status nicht. Ein starker Effekt des RB1-Status zeigt sich in der Art des ersten Progresses, wobei in der Gruppe mit RB1-Expressionsverlust am häufigsten Zweittumoren und in der Gruppe ohne RB1-Verlust am häufigsten loko-regionäre Rezidive den ersten Progress darstellen (V=0,587).

Betrachtet man die Krankheitsprogression insgesamt, gibt es keine Assoziation zwischen Sekundärtumoren und RB1-Status (V= 0,080) und genau so wenig zwischen Fernmetastasen und RB1-Status (V=0,018). In der Gruppe ohne RB1-Expressionsverlust sind loko-regionäre Rezidive die häufigsten Progresse. Die Fallzahl ist jedoch im Vergleich zu der Gruppe mit Expressionsverlust äußerst gering. Die Korrelation ist schwach (V=0,250). In der Gruppe mit RB1-Verlust sind deskriptiv die häufigsten Progresse Zweittumoren (15,79%, 6/38) gefolgt von loko-regionären Rezidiven (13,16%, 5/38). Die Inzidenz der einzelnen Progress-Entität wird deswegen

auf die Fallzahl in der gesamten Gruppe bezogen, weil manche Patienten mehrere Progresses hatten.

Bei der Auswertung des RB1-Expressionsmusters im Zusammenhang mit den Parametern des Krankheitsverlaufs ist zu beachten, dass möglicherweise ein systematischer Fehler zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust führt (siehe Kap. 5.8).

4.4.3 Krankheitsverlauf nach dem p53-Expressionsstatus

Tabelle 16 zeigt den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus (\pm p53-Überexpression im Primarius).

Tabelle 16: Krankheitsverlauf nach p53-Expressionstatus des Primarius

			Primarius Überexpression p53		Test (p-Wert)	Effektstärke
			ja	nein		
Progress	Ja	Anzahl (Zeilen %)	15 (75,0 %)	5 (25,0 %)	FEX (0,370)	V=0,160
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	19 (59,4 %)	13 (40,6 %)		
>1 Progress	Ja	Anzahl (Zeilen %)	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)	FEX (1,000)	V=0,026
	Nein	Anzahl (Zeilen %)	29 (65,9 %)	15 (34,1 %)		
Art des ersten Progresses	LRR(Zeilen %)		4 (66,7 %)	2 (33,3 %)	Chi ² (0,084) df=4	V=0,641
	SPT (Zeilen %)		7 (87,5 %)	1 (12,5 %)		
	DM (Zeilen %)		2 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
	SPT DD: DM (Z%)		2 (100,0 %)	0 (0,0 %)		
	Primärtumor (Zeilen %)		0 (0,0 %)	2 (100,0 %)		
Loko-regionäres Rezidiv (LRR)	ja	Anzahl (Zeilen %)	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)	FEX (0,702)	V=0,095
	nein	Anzahl (Zeilen %)	29 (67,4 %)	14 (32,6 %)		
Zweitumor (SPT)	ja	Anzahl (Zeilen %)	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	FEX (0,236)	V=0,198
	nein	Anzahl (Zeilen %)	27 (61,4 %)	17 (38,6 %)		
SPT DD: DM	ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	FEX (0,538)	V=0,146
	nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (64,0 %)	18 (36,0 %)		
Fernmetastase (DM)	ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)	FEX (0,602)	V=0,093
	nein	Anzahl (Zeilen %)	32 (66,7 %)	16 (33,3 %)		

FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.=erwartete Häufigkeit, DD=differentialdiagnostisch

Stratifiziert nach dem p53-Status zeigen sich keine statistisch auffälligen Unterschiede im Krankheitsverlauf. Eine starke Assoziation besteht auch hier zwischen dem p53-Status und der Art des ersten Progresses (V=0,641). In der Gruppe mit p53-

Überexpression sind Zweittumoren gefolgt von loko-regionären Rezidiven die häufigsten ersten Progresse.

Deskriptiv sind Progresse im Allgemeinen häufiger in der Gruppe mit p53-Überexpression, was jedoch nicht statistisch auffällig ist (15/34, 44,12% vs. 5/18, 27,78%). Die relative Anzahl der Patienten mit mehr als einem Progress ist in beiden Gruppen ähnlich (5/34, 14,71% vs. 3/18, 16,67%). Die Betrachtung der Progress-Inzidenz zwischen den Gruppen im Rahmen einer Kreuztabelle ist nicht sinnvoll, weil die Patienten unterschiedlich lange unter Risiko stehen. So könnte bspw. eine Gruppe aus dem Grund mehr Progresse aufweisen, weil die Patienten länger leben. Aus diesem Grund ist die Progress-Inzidenz mithilfe von Überlebenszeitanalysen zu ermitteln (s. Kap. 4.6.2). In diesem Abschnitt war lediglich die Verteilung der Daten interessant.

Betrachtet man die Arten von Progressen im Krankheitsverlauf deskriptiv, so zeigen sich Zweittumoren gefolgt von loko-regionären Rezidiven in der Gruppe mit p53-Überexpression als die häufigsten Progressformen, während in der Gruppe mit normaler oder verminderter p53-Expression loko-regionäre Rezidive am häufigsten sind. Statistisch auffällige Unterschiede in der Prävalenz der einzelnen Arten von Progressen gibt es nicht. Bis auf eine schwache Assoziation zwischen Zweittumoren und p53-Überexpression ($V=0,198$) sind keine Assoziationen zu berichten.

4.4.4 Krankheitsverlauf nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus

Tabelle 17 zeigt den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus (\pm Cyclin-D1-Überexpression im Primarius).

Tabelle 17: Krankheitsverlauf nach dem Cyclin-D1-Expressionsstatus des Primarius

			Primarius Cyclin-D1 Überexpression			
			ja	nein	Test (p-Wert)	Effektstärke
Progress	ja	Anzahl (Zeilen %)	11 (47,8 %)	12 (52,2 %)	FEX (0,790)	V=0,049
	nein	Anzahl (Zeilen %)	15 (42,9 %)	20 (57,1 %)		
>1 Progress	ja	Anzahl (Zeilen %)	5 (50,0 %)	5 (50,0 %)	FEX (0,740)	V=0,047
	nein	Anzahl (Zeilen %)	21 (43,8 %)	27 (56,3 %)		
Art des ersten Progresses	LRR (Zeilen %)		2 (33,3 %)	4 (66,7 %)	Chi ² (0,484) df=4	V=0,388
	SPT (Zeilen %)		5 (62,5 %)	3 (37,5 %)		
	DM (Zeilen %)		2 (50,0 %)	2 (50,0 %)		
	SPT DD: DM (Zeilen %)		2 (66,7 %)	1 (33,3 %)		
	Primärtumor (Zeilen %)		0 (0,0 %)	2 (100,0 %)	100 % e.H.<5	
Loko-regionäres Rezidiv (LRR)	ja	Anzahl (Zeilen %)	3 (30,0 %)	7 (70,0 %)	FEX (0,487)	V=0,136
	nein	Anzahl (Zeilen %)	23 (47,9 %)	25 (52,1 %)		
Zweittumor (SPT)	ja	Anzahl (Zeilen %)	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)	FEX (0,274)	V=0,188
	nein	Anzahl (Zeilen %)	20 (40,8 %)	29 (59,2 %)		
SPT DD: DM	ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)	FEX (1,000)	V=0,028
	nein	Anzahl (Zeilen %)	24 (44,4 %)	30 (55,6 %)		
Fernmetastase (DM)	ja	Anzahl (Zeilen %)	2 (33,3 %)	4 (66,7 %)	FEX (0,681)	V=0,079
	nein	Anzahl (Zeilen %)	24 (46,2 %)	28 (53,8 %)		

FEX= Fisher's exakter Test. V= Cramers V, df= Freiheitsgrade, e.H.= erwartete Häufigkeit, DD: differentialdiagnostisch

Stratifiziert nach dem Cyclin-D1-Status zeigen sich keine statistisch auffälligen Unterschiede und auch keine starken Assoziationen. Deskriptiv ist die Art des ersten Progresses recht gleich verteilt, außer dass in der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression tendenziell mehr Zweittumoren den ersten Progress darstellen, während in der Gruppe mit normaler oder verminderter Cyclin-D1-Expression die Patienten tendenziell eher ein loko-regionäres Rezidiv als ersten Progress erleiden. Diese Assoziation ist jedoch nur mittelgradig (V=0,388). Fernmetastasen sind recht gleich verteilt als erster Progress.

Patienten, die einen Progress erleiden, und auch Patienten, die mehr als einen Progress erleiden, sind tendenziell häufiger in der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression (11/26, 42,31% vs. 12/32, 37,5%, 5/26, 19,23% vs. 5/32, 15,63%), wobei der Unterschied nicht statistisch auffällig ist. Diese Betrachtung ist ohnehin nur dazu da, um die Verteilung der Daten darzustellen. Für die tatsächliche Auswertung der Progress-Inzidenz zwischen den Gruppen wird in dieser Arbeit die Überlebenszeitanalyse, d. h. im Speziellen die Zeit bis zum ersten Progress (*time to progression*), durchgeführt (s. Kap. 4.6.2).

Im Krankheitsverlauf zeigen die meisten Patienten mit Cyclin-D1-Überexpression Zweitumoren als häufigsten Progress (6/26, 23,08%), dies auch im Unterschied zur Gruppe ohne Cyclin-D1-Überexpression (3/32, 9,38%), in der loko-regionäre Rezidive gefolgt von Fernmetastasen die häufigsten Progresse sind (7/32, 21,88 % und 4/32, 12,5%). Die Assoziationen sind jedoch nur schwach und bestehen für Fernmetastasen gar nicht.

4.5 Gesamtüberleben (OS)

4.5.1 Unterschiede im Gesamtüberleben (OS) nach Kovariablen

Im Folgenden wurde nach Unterschieden im OS in Bezug auf Kovariablen gesucht. In diesem Kapitel werden lediglich die Kaplan Meier Kurven für Variablen gezeigt, in denen statistisch auffällige Unterschiede, tendenziell statistisch auffällige Unterschiede und, in einem Fall, auch nur ein deskriptiv deutlicher Unterschied ohne statistische Auffälligkeit bestehen. Variablen, für die kein Unterschied in Bezug auf das OS festgestellt werden konnte, sind nicht aufgeführt. Als Kovariablen insgesamt betrachtet wurden das Geschlecht, der BMI, das Alter bei Erstdiagnose, der Alkoholkonsum, der Nikotinkonsum, Begleiterkrankungen (Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen) sowie das T-, N- und M-Stadium.

Alkohol-Anamnese

Abbildung 1 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **Alkoholkonsum** der Patienten.

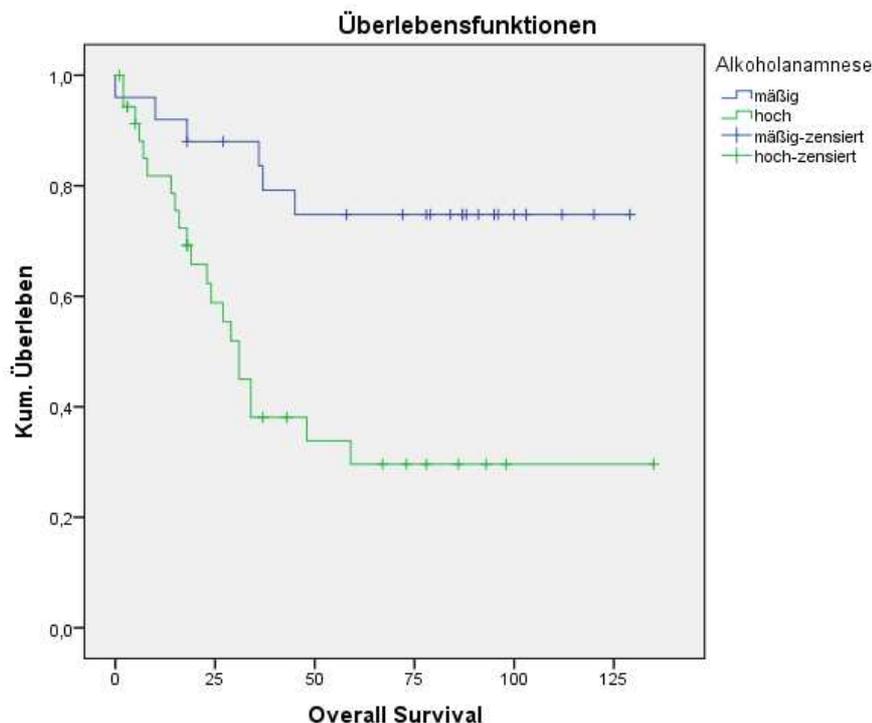


Abbildung 1: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch

Der erste statistisch auffällige Unterschied zeigt sich in Bezug auf die Alkohol-Anamnese, wobei Patienten, die im Anästhesieprotokoll angegeben haben, lediglich mäßig Alkohol zu konsumieren, eine statistisch auffällig längere mediane Überlebenszeit haben, die über den Beobachtungszeitraum hinausgeht und deswegen nicht ermittelbar ist ($\chi^2(1) = 10,504$, Log Rank $p=0,001$). Das bedeutet, dass für diese Gruppe innerhalb des Beobachtungszeitraumes weniger als 50% der Patienten ein Ereignis hatten. Die mediane Überlebenszeit für Patienten mit hohem Alkoholkonsum betrug 31 Monate (Tabelle 18).

Tabelle 18: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch

Alkohol-Anamnese (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
mäßig (6/25)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
hoch (21/36)	31,000	3,497	24,146	37,854

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall. für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Alkoholkonsum hoch (21/36)	,467	1	,003	4,055	1,622	10,135

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging. Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht einem mäßigen Alkoholkonsum. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

Auch die univariate Cox-Regression zeigt einen starken und statistisch auffälligen Effekt auf die Überlebenszeit. Patienten mit hohem Alkoholkonsum haben dabei eine 4-fach höhere Mortalitätsrate (HR 4,055, $p=0,003$, 95%-KI 1,622–10,135).

Lebererkrankung

Abbildung 2 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **Vorkommen einer Lebererkrankung**.

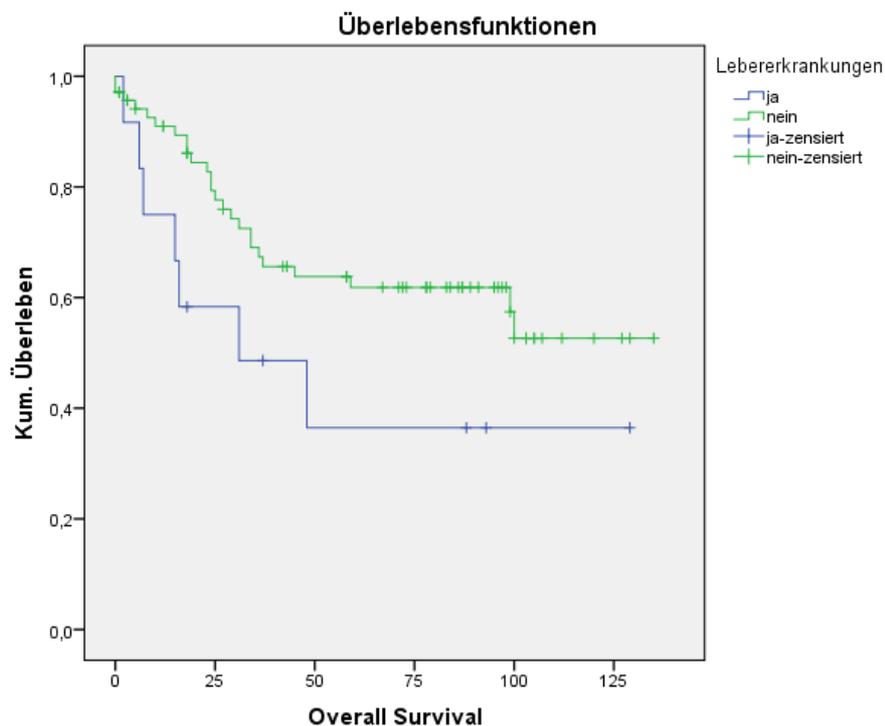


Abbildung 2: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Lebererkrankung – ja vs. nein

Stratifiziert nach Lebererkrankungen zeigt sich der Log Rank Test zwar nicht statistisch auffällig, in den Kaplan Meier Kurven zeigt sich aber dennoch ein deutlich sichtbarer Unterschied ($\chi^2(1)=3,001$, $p=0,083$). Die Fallzahl in der Gruppe mit Lebererkrankungen, die nicht weiter definiert sind, also auch bspw. Steatosen enthalten, ist äußerst gering, so dass das Konfidenzintervall sehr groß ist. Die *Hazard Ratio* der univariaten Cox-Regression zeigt eine zweifach höhere Mortalitätsrate für Patienten mit Lebererkrankung, allerdings ist auch diese nicht statistisch auffällig ($p=0,091$, 95%-KI 0,890–4,789) (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Lebererkrankung

Lebererkrankungen (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (7/12)	31,000	21,669	,000	73,472
Nein (25/70)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Lebererkrankungen (7/12)	,429	1	,091	2,065	,890	4,789

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.
Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz ist „keine Lebererkrankungen“. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade.

T-Stadium

Abbildung 3 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **T-Stadium**.

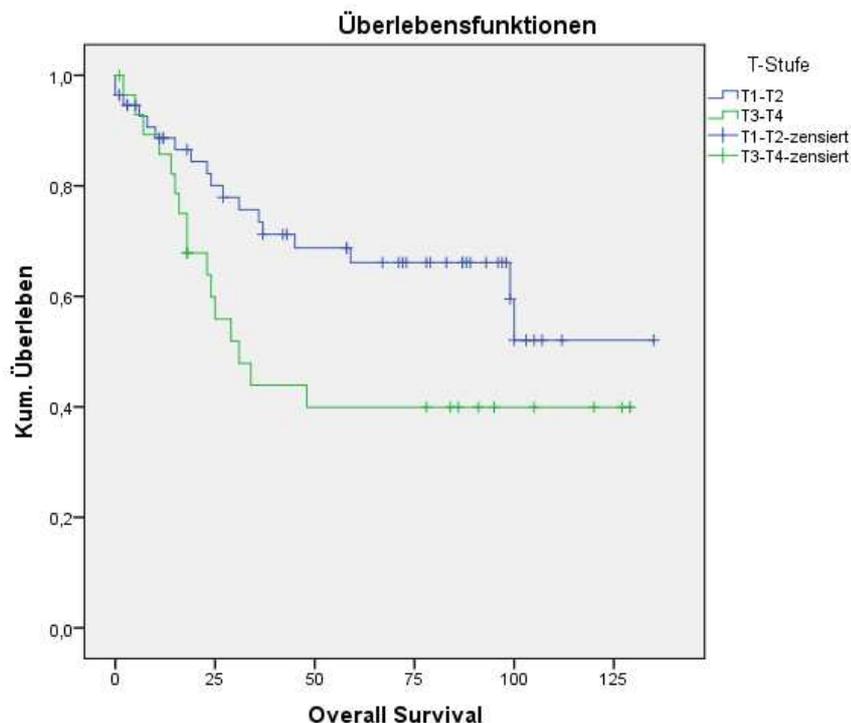


Abbildung 3: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit von der T-Stadium – T1–T2 vs. T3–T4

Stratifiziert nach gruppierten T-Stadien zeigt sich für die Gruppe der geringeren T-Stadien eine längere Überlebenszeit als für die höheren T-Stadien. Auch hier konnte die mediane Überlebenszeit nicht verglichen werden, weil in der Gruppe der geringen T-Stadien weniger als 50% der Patienten ein Ereignis hatten. Der Unterschied nach T-

Stadien verpasst zwar sehr knapp das Signifikanzniveau ($\text{Chi}^2(1)=3,726$, $p=0,054$), deskriptiv ist dieser jedoch anhand der Kaplan-Meier Kurven deutlich zu sehen. Tendenziell statistisch auffällig ist auch die Effektstärke. Patienten mit T3 oder T4-Tumoren haben eine doppelt so hohe Mortalitätsrate im Vergleich zu geringeren T-Stadien (*Hazard Ratio* 1,920, $p=0,059$, 95%-KI 0,976–3,775). Die Ereignisse zum Zeitpunkt 0 sind Patienten, die weniger als einen Monat nach Diagnosestellung überlebt haben (s. Tab. 20).

Tabelle 20: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom T-Status – T1–T2 vs. T3–T4

T-Status (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
T1-T2 (18/56)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
T3-T4 (16/29)	31,000	7,327	16,638	45,362

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio	
					Untere Grenze	Obere Grenze
T-Status T3-T4 (16/29)	,345	1	,059	1,920	,976	3,775

n. e.=nicht ermittelbar, da die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.
Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht T1-T2. 1 Standardfehler, 2 Freiheitsgrade

M-Stadium

Abbildung 4 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **M-Status**.

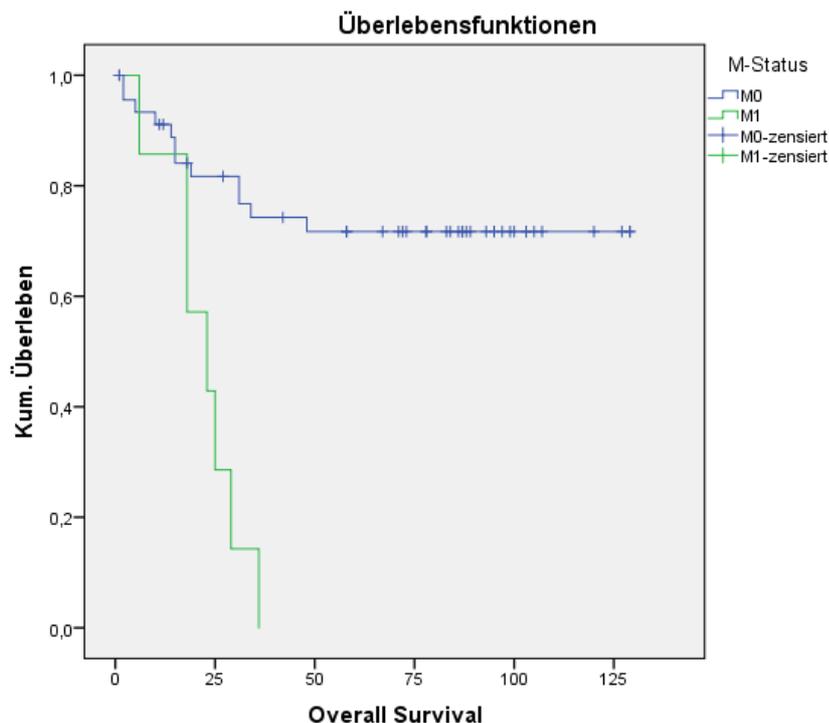


Abbildung 4: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom M1-Status – M0 vs. M1

Die Fallzahl in der Gruppe mit M1-Status ist äußerst gering im Vergleich zur Gruppe mit M0-Status, so dass die Interpretation der Kaplan Meier Kurven problematisch ist. Dies führt zu sehr unterschiedlichen Hazards. Die sieben Patienten versterben allesamt im Verlaufe von ca. 3 Jahren, so dass die Kurven sehr unterschiedlich verlaufen und der Log Rank Test sich statistisch auffällig zeigt ($\text{Chi}^2(1)=16,694$, $p<0,001$). Aufgrund des unterschiedlichen Kurvenverlaufes wird die *Hazard Ratio* (HR) hier nur deskriptiv verwendet. Der Effekt ist mit einer HR von 6 sehr stark ($p<0,001$, 95%-KI 2,269–16,321). Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit M0-Status geht über den Beobachtungszeitraum hinaus und kann daher nicht angegeben werden, außer dass sie größer als 125 Monate (>10 Jahre) ist (s. Tab. 21).

Tabelle 21: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1

M-Status (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
M0 (12/47)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
M1 (7/7)	23,000	6,547	10,169	35,831

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
M1 (7/7)	,503	1	,000	6,086	2,269	16,321

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.
Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht dem M0-Status. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

Die übrigen Kovariablen zeigten in der Kaplan-Meier Analyse keine zu berichtenden Unterschiede.

4.5.2 Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression

Abbildung 5 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **p16^{INK4a}-Expressionsstatus**.

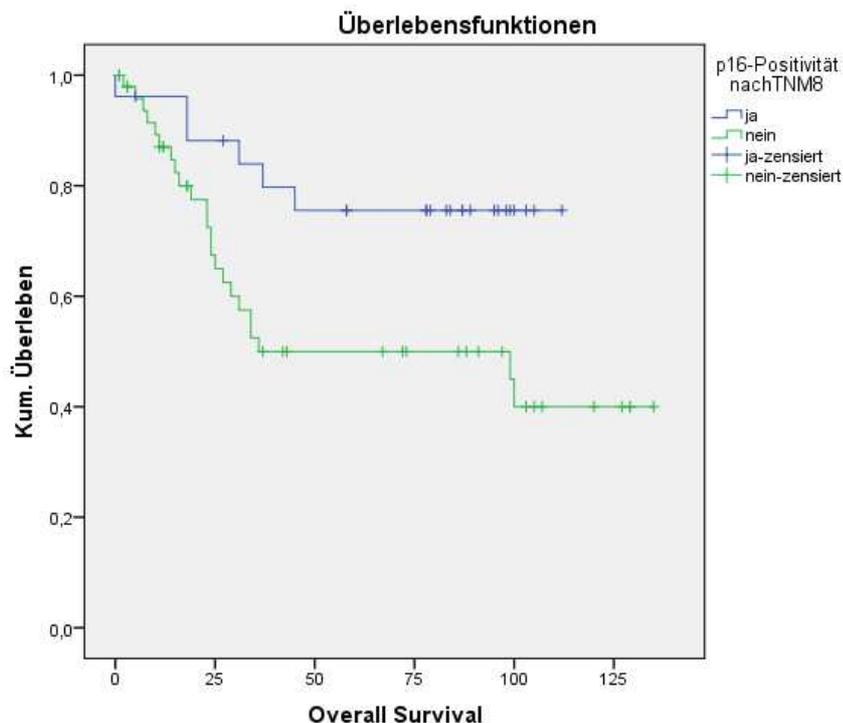


Abbildung 5: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus

Die Kaplan Meier Kurven divergieren bereits nach ca. einem Jahr und zeigen damit einen sehr deutlichen Unterschied in der Überlebenszeit mit einer längeren medianen Überlebenszeit in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe. Wie der Log Rank Test zeigt, ist der Unterschied statistisch auffällig (Chi²(1) 5,209, p=0,022). Auch hier gab es bereits ein Ereignis binnen eines Monats nach Diagnosestellung. Die mediane Überlebenszeit ist

für die p16^{INK4a}-positive Gruppe nicht ermittelbar. Für die p16^{INK4a}-negative Gruppe beträgt sie 36 Monate bei sehr hohem Standardfehler (SE) und breitem Konfidenzintervall (SE 42,449, 95%-KI 0,000–119,201). In der univariaten Cox-Regression zeigt sich der Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status mit einer *Hazard Ratio* von 0,366 (p=0,029, 95%-KI 0,148–0,902) protektiv (s. Tab. 22).

Tabelle 22: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus

p16 ^{INK4a} -Status (Ereigniszahl/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Positiv (6/26)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
Nein (23/51)	36,000	42,449	,000	119,201

(Ereigniszahl/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
p16 ^{INK4a} -positiv (6/26)	,460	1	,029	,366	,148	,902

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.
Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht einem negativem p16^{INK4a}-Status. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

Die multivariaten Cox-Regression, in welcher der Effekt des p16^{INK4a}-Status nach Expressionsstatus der anderen drei Zellzyklusproteine und auch nach möglichen *Confoundern* (Geschlecht, Altersgruppe, initialer BMI, Alkoholkonsum, Nikotinanamnese, T-, N-, M-Stadium, Diabetes mellitus, Lebererkrankung, Nierenerkrankung) kontrolliert wurde, ist durch die geringe Fallzahl erschwert. Es mussten daher mehrere kleine Modelle gerechnet werden mit jeweils 2–3 Faktoren anstelle eines großen Modells, so dass sich mehrere *Hazard Ratios* ergaben. Es werden zum einen nur die statistisch auffälligen Modelle berichtet, da die Schätzungen ansonsten nicht besser als zufällig wären, und es werden nur die zumindest tendenziell statistisch auffälligen *Hazard Ratios* berichtet mit einem Signifikanzniveau von 0,05, wobei dieses, wie bereits beschrieben, als eine Grenze zur statistischen Auffälligkeit verwendet wird. Der in der univariaten Cox-Regression gezeigte protektive Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status bleibt auch nach Adjustierung erhalten (HR 0,387, p=0,042, 95% KI 0,156–0,965 bereinigt durch einen initialen BMI von mindestens 24,9 kg/m², HR 0,328, p=0,026, 95%KI 0,123–0,876 bereinigt durch den Effekt des N-Stadiums). Das Adjustieren nach den übrigen hier untersuchten Zellzyklusproteinen zeigt keinen

statistisch auffälligen Effekt. Auch für die anderen Kovariablen waren keine Effekte nachweisbar, weil entweder die Modelle oder die *Hazard Ratios* oder aber beide nicht statistisch auffällig waren. Deskriptiv betrachtet zeigte allerdings auch jedes dieser Modelle protektive Effekte eines positiven p16^{INK4a}-Status.

Abbildung 6 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **RB1-Expressionsstatus**.

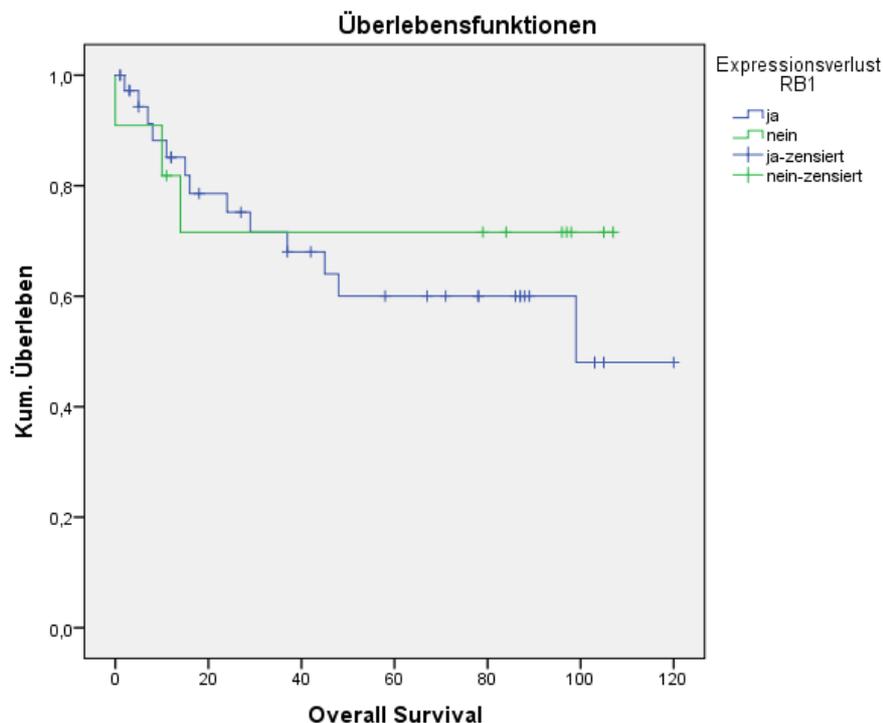


Abbildung 6: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

Die Kaplan Meier Kurven sind bei sehr unterschiedlichen Fallzahlen in den beiden Gruppen schwierig zu interpretieren. Nach etwas über einem Jahr zeigen die Patienten ohne RB1-Expressionsverlust ein besseres Überleben als die mit RB1-Expressionsverlust. Davor verlaufen die Kurven fast gleich. Einen statistisch auffälligen Unterschied zeigt der Log Rank Test nicht an ($\text{Chi}^2(1) = 0.306, p=0.580$).

(s. Tab. 23).

Tabelle 23: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

RB1-Expressionsverlust (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (13/38)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
Nein (3/11)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausgeht.

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
RB1-Expressionsverlust (13/38)	,642	1	,582	1,423	,405	5,004

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht der normalen RB1-Expression. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

In der univariaten Cox-Regression zeigt ein RB1-Verlust eine 1.4-fach erhöhte Mortalitätsrate, wobei dieser Effekt nicht statistisch auffällig ist ($p=0.582$, 95%-KI 0.405 – 5.004). Bei der Adjustierung durch p16^{INK4a}, p53 und Cyclin-D1 sowie durch die möglichen *Confounder* ist die noch viel geringere Fallzahl zu beachten, die zu hohen Zufallsfehlern führt¹² (128). Es konnten lediglich bivariate Modelle berechnet werden für Geschlecht, Alter, BMI, T-, N-, M-Stadium, Raucheranamnese, Alkoholanamnese, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenerkrankungen sowie für die anderen Zellzyklusproteine. Die Mehrzahl der Modelle ist nicht besser als die Zufallsschätzung. Statistisch auffällig und damit verwertbar sind nur die Modelle für die Cyclin-D1-Überexpression, den hohen Alkoholkonsum und für das Vorliegen einer Lebererkrankung. Diese Modelle zeigen allerdings alle keine statistisch auffälligen *Hazard Ratios* (HR 0,832, $p=0,790$ 95%KI 0,216–3,212, HR 1,165, $p=0.844$, 95% KI 0,255–5,324, HR 1,286, $p=0,754$, 95% KI 0,267–6,206). Das Adjustieren nach den übrigen Proteinen zeigt keinen statistisch auffälligen Effekt. Damit kann also auch nach Adjustieren kein Einfluss eines RB1-Expressionsverlusts auf das Gesamtüberleben festgestellt werden.

¹² Gaus W, Muche, R. . Medizinische Statistik. Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2017. S. 208.

In Bezug auf die Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach den hier unterschiedenen RB1-Expressionsmustern ist zu beachten, dass möglicherweise ein systematischer Fehler zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust führt (siehe Kap. 5.8).

Abbildung 7 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **p53-Expressionsstatus**.

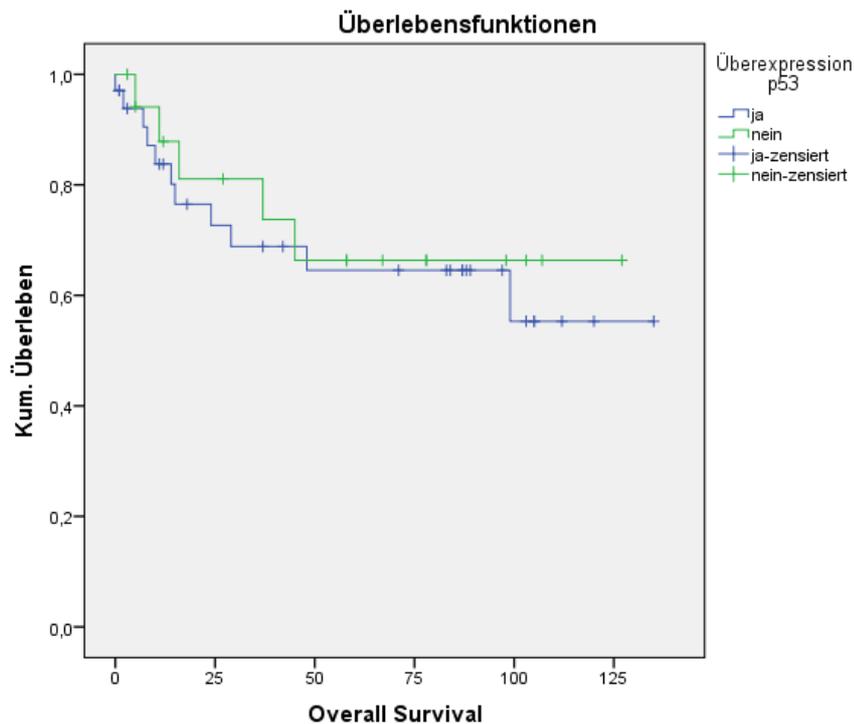


Abbildung 7: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

Sowohl die Kaplan Meier Kurven als auch der Log Rank Test zeigen keinen Unterschied im Gesamtüberleben stratifiziert nach dem p53-Status ($\text{Chi}^2(1)=0,185$, $p=0,667$).

Patienten mit p53-Überexpression des Primarius zeigen in der univariaten Cox-Regression eine um 26% höhere Mortalitätsrate, wobei dieser Effekt nicht statistisch auffällig ist (*Hazard Ratio* 1,26, $p=0,668$, 95% KI 0,438–3,630) (s. Tab. 24). Auch das Adjustieren nach Geschlecht, Alter, BMI, T-, N-, M-Stadium, Raucheranamnese, Alkoholanamnese, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenerkrankungen sowie nach den anderen Zellzyklusproteinen im Rahmen von bivariaten Cox-Regressionen deckt keinen Effekt einer p53-Überexpression auf das Gesamtüberleben auf. Zu verwerfen sind nur die Modelle, in denen nach einer Lebererkrankung und nach einem hohen

Alkoholkonsum in der Anamnese adjustiert wurde. Die sich daraus ergebenden *Hazard Ratios* sind allerdings beide weit vom Signifikanzniveau entfernt (HR 1,056, $p=0,930$, 95% KI 0,315–3,543, HR 1,607, $p=0,433$, 95% KI 0,491–5,261). Auch das Adjustieren nach den anderen Zellzyklusproteinen zeigt keinen statistisch auffälligen Effekt. Damit lässt sich für eine p53-Überexpression kein Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigen.

Tabelle 24: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

Überexpression (Ereignisse/Patientenzahl)	p53	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
		Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (11/34)		n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
Nein (5/18)		n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Überexpression p53 (11/34)	,540	1	,668	1,260	,438	3,630

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.
Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht der normalen/verminderte p53-Expression.
¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

Abbildung 8 zeigt das OS in Abhängigkeit vom **Cyclin-D1-Expressionsstatus**.

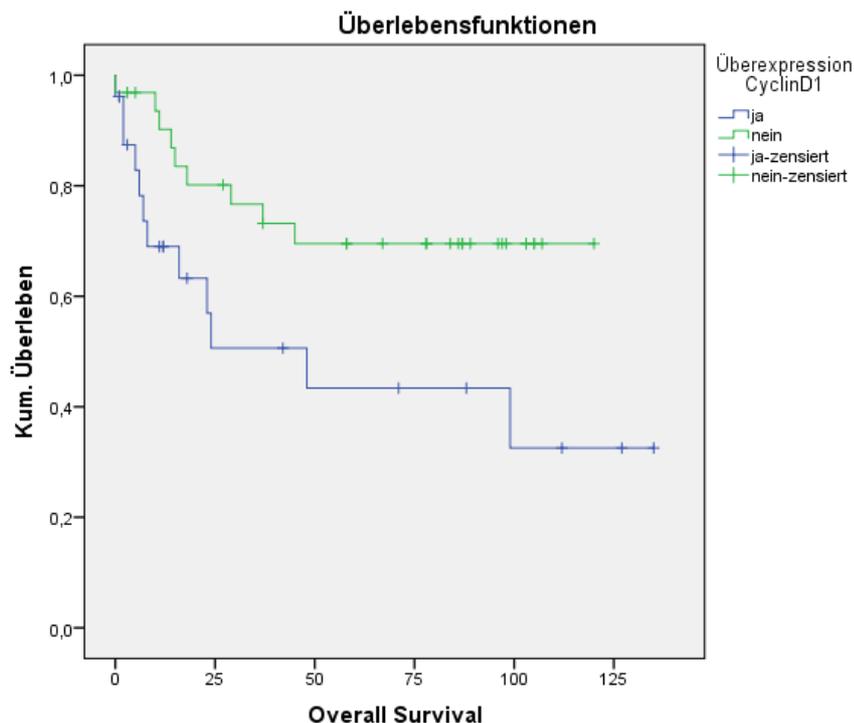


Abbildung 8: Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Für die Gruppe ohne Cyclin-D1-Überexpression geht die mediane Überlebenszeit über den Beobachtungszeitraum hinaus und ist daher nicht ermittelbar. In der Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression beträgt sie 48 Monate (95%-KI 4,630–91,370). Dieser Unterschied zeigt sich auch in den Kaplan Meier Kurven, die deutlich nach wenigen Monaten auseinandergehen, sowie im Log Rank Test, der statistisch auffällig ist ($\text{Chi}^2(1)=5,004$, $p=0,025$). Die univariate Cox-Regression zeigt einen starken Effekt auf das Gesamtüberleben der Cyclin-D1-Überexpression. Die Mortalitätsrate ist demnach 2,6-fach erhöht (HR 2,606, $p=0,031$, 95%-KI 1,090–6,233) gegenüber der Gruppe ohne Überexpression von Cyclin-D1 (s. Tab. 25). Die bivariaten Cox-Regressionen, in denen nach Kovariablen (Geschlecht, Alter, BMI, T-, N-, M-Stadium, Raucheranamnese, Alkoholanamnese, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenerkrankungen) und den anderen Zellzyklusproteinen adjustiert wurde, sind alle verwertbar und zeigen mit einer Ausnahme alle eine zumindest tendenziell statistisch auffällige *Hazard Ratio* im Bereich von 2,374 ($p=0,071$, 95%-KI 0,929–6,063) bis 3,453 ($p=0,063$, 95%-KI 0,935–12,745). Das Adjustieren durch die anderen Proteine ist nur nach RB1-Expressionsverlust tendenziell statistisch auffällig, und die *Hazard Ratio* liegt im oben beschriebenen Bereich. Damit lässt sich für eine Cyclin-D1-

Überexpression auch nach Adjustierung ein starker Einfluss auf das Gesamtüberleben nachweisen, wobei die Patienten eine deutlich höhere Mortalitätsrate haben. Die Modelle, in denen nach den anderen Proteinen adjustiert wurde, sind entweder nicht verwertbar oder die *Hazard Ratios* sind nicht statistisch auffällig.

Tabelle 25: Statistische Analyse des Gesamtüberlebens (OS) in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Cyclin-D1-Überexpression (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (12/26)	48,000	22,128	4,630	91,370
Nein (9/32)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausgeht.

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Cyclin-D1-Überexpression (12/26)	,445	1	,031	2,606	1,090	6,233

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging.

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht der normalen Cyclin-D1-Expression. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

4.6 Zeit bis zum ersten Progress (TTP)

4.6.1 Einfluss von Kovariablen

Auch hier werden nur diejenigen Kovariablen gezeigt, die zumindest einen tendenziell statistisch auffälligen Unterschied (Log Rank Test) in der Zeit bis zum ersten Progress (definiert als loko-regionäres Rezidiv, Fernmetastase oder Zweittumor) oder aber deskriptiv einen Unterschied in den Kaplan- Meier Kurven zeigen. Auffällige Unterschiede zeigten sich für die Variablen Alkoholkonsum, T-Stadium, M-Stadium, Geschlecht und BMI.

Alkohol-Anamnese

Abbildung 9 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **Alkoholkonsum**.

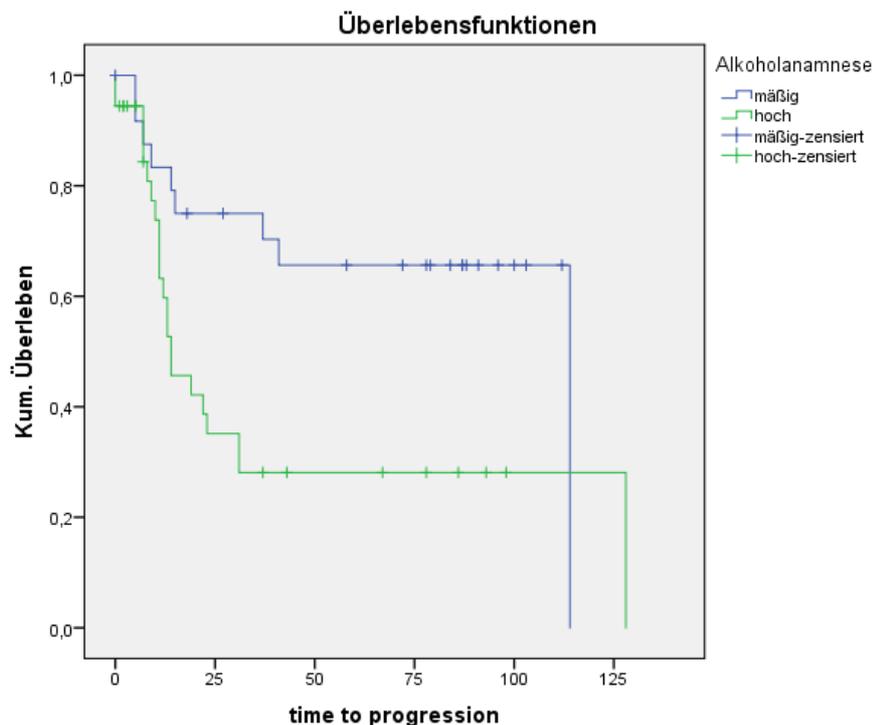


Abbildung 9: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch

Die Kaplan-Meier Kurven zeigen einen deutlichen Unterschied in der Zeit bis zum ersten Progress, der nach dem Log Rank Test statistisch auffällig ist ($\chi^2(1)=6,090$, $p=0,014$). Die mediane Zeit bis zum ersten Progress in der Gruppe mit hohem Alkoholkonsum beträgt 14 Monate (95%-KI 6,761–21,239), während sie für Patienten mit mäßigem Alkoholkonsum in der Anamnese ca. 9,5 Jahre beträgt, ohne eine Angabe eines Konfidenzintervalls für die Letztere machen zu können.

Die Hazard Ratio in der univariaten Cox-Regression zeigt bei hohem Alkoholkonsum in der Anamnese eine 2,5-fach erhöhte Progressrate (95%-KI 1,170–5,668) (s. Tab. 26).

Tabelle 26: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – mäßig vs. hoch

Alkoholkonsum /Patientenzahl)	(Ereignis-	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
		Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
Mäßig (9/25)		114,000	,000	n. e.	n. e.
Hoch (22/36)		14,000	3,693	6,761	21,239

n. e.= nicht ermittelt

Alkoholkonsum /Patientenzahl)	(Ereignis-	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 %-Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
						Untere Grenze	Obere Grenze
						Hoch (22/36)	,402

n. e.= nicht ermittelt. Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht einem mäßigem Alkoholkonsum in der Anamnese. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade.

T-Stadium

Abbildung 10 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **T-Stadium**.

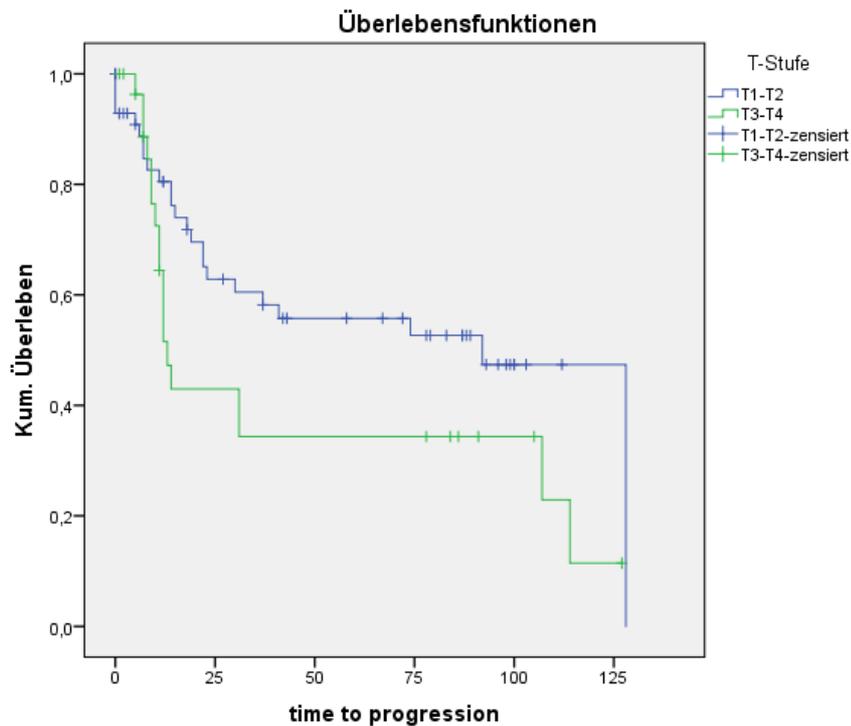


Abbildung 10: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom T-Stadium – T1–T2 vs. T3–T4

Der Unterschied in der Zeit bis zum ersten Progress für die niedrigen vs. weiter fortgeschrittenen T-Stadien zeigt sich in den Kaplan Meier Kurven sowie in dem tendenziell statistisch auffälligen Log Rank Test ($\chi^2(1)=3,055$, $p=0,08$). So ist die mediane Zeit bis zum ersten Progress für Patienten mit initialen T1- oder T2-Tumoren 92 Monate (ca. 7,5 Jahre) (95%-KI 66,208–117,792) vs. 13 Monate (95%-KI 10,220–15,780) für Patienten, die sich initial mit fortgeschrittenen T-Stadien vorstellen. In der univariaten Cox-Regression zeigt sich eine 1,7-fach erhöhte Ereignisrate für Patienten mit T3- oder T4-Tumoren (95%-KI 0,923–3,237) (s. Tab. 27).

Tabelle 27: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom T-Status – T1–T2 vs. T3–T4

T-Status (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
T 1-2 (24/56)	92,000	13,159	66,208	117,792
T 3-4 (18/29)	13,000	1,418	10,220	15,780

T-Status (Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall. für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
T 3-4 (18/29)	,320	1	,087	1,729	,923	3,237

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht dem T-Status T1–T2. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade.

M-Stadium

Abbildung 11 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **M-Stadium**.

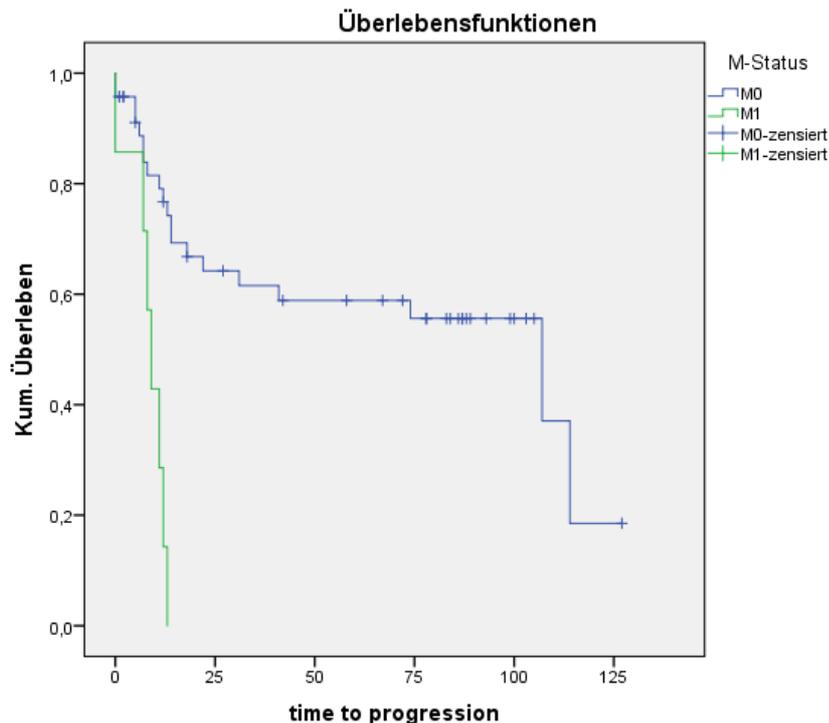


Abbildung 11: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1

In der Auswertung der Zeit bis zum ersten Progress zeigt der M-Status wie auch schon in der Analyse des Gesamtüberlebens das Problem, dass die Gruppe mit M1-Status zu schwach besetzt ist, als dass man wirklich einen zuverlässigen Unterschied ermitteln könnte. Die sehr viel stärker besetzte Gruppe mit M0-Status zeigte eine mediane Zeit bis zum ersten Progress von 107 Monaten (ca. 9 Jahre) bei sehr großem Konfidenzintervall (95%-KI 51,035–162,965) vs. 9 Monate (95%-KI 6,434–11,566) in der M1-Gruppe. So zeigt sich auch der Log Rank Test statistisch auffällig ($\chi^2(1)=16,099$, $p<0,0001$) (s. Tab. 28). Die univariate Cox-Regression ergibt eine Hazard Ratio von 5,7, allerdings sind die *Hazards* eigentlich zu unterschiedlich, als dass man eine Cox-Regression rechnen dürfte. Die Voraussetzungen für die Durchführung einer Cox-Regression sind daher nicht gegeben. Sie ist hier nur deskriptiv erfolgt.

Tabelle 28: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1

M-Status (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
M0-Status (20/47)	107,000	28,554	51,035	162,965
M1-Status (7/7)	9,000	1,309	6,434	11,566

M-Status (Ereignis-/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
M1-Status (7/7)	,496	1	,000	5,708	2,159	15,091

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht dem M0-Status. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade.

Geschlecht

Abbildung 12 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **Geschlecht**.

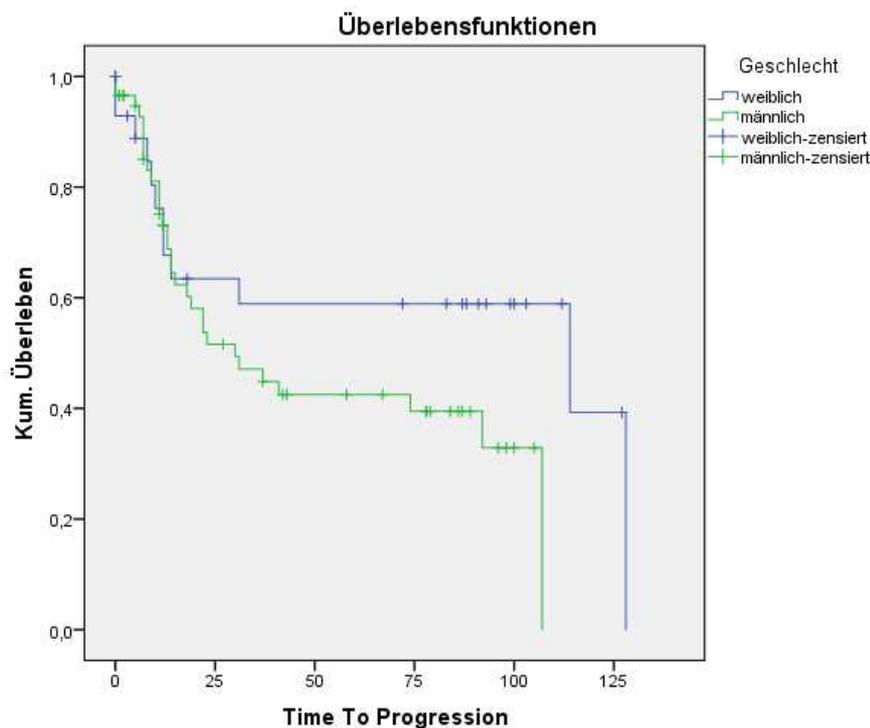


Abbildung 12: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – männlich vs. weiblich

Ein statistisch auffälliger Unterschied in der Zeit bis zum ersten Progress zwischen den Geschlechtern zeigt sich nicht ($\chi^2(1) = 2,211$, $p = 0,137$). In den Kaplan-Meier Kurven zeigt sich jedoch ein Unterschied nach 2 Jahren, wobei die mediane Zeit bis zum ersten Progress 114 Monate (9,5 Jahre) bei sehr breitem Konfidenzintervall (95%-KI 0,000–258,018) für Frauen vs. 30 Monate (95%-KI 10,688–49,312) für Männer beträgt

(s. Tab. 29). Für das Geschlecht wird die univariate Cox-Regression nicht angegeben, weil das Modell das Risiko nicht besser vorhersagt als der Zufall.

Tabelle 29: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – männlich vs. weiblich

Geschlecht (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Weiblich (12/28)	114,000	73,479	,000	258,018
Männlich (31/58)	30,000	9,853	10,688	49,312

Body-Mass-Index (BMI)

Abbildung 13 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **BMI**.

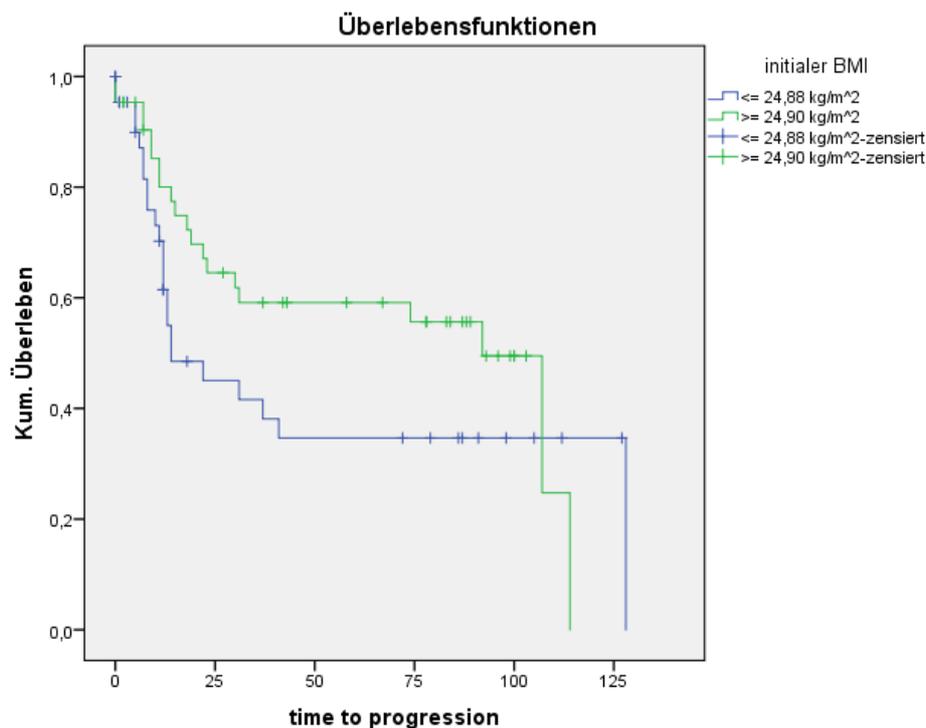


Abbildung 13: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Geschlecht – BMI $\leq 24,88$ kg/m² vs. BMI $\geq 24,90$ kg/m²

Auch in Bezug auf den BMI zeigt sich der Log Rank Test nicht statistisch auffällig ($\chi^2(1)=1,937$, $p=0,164$), in den Kaplan-Meier Kurven sieht man einen Unterschied nach ca. einem Jahr, wobei in der Gruppe mit einem BMI von mindestens 24,9 kg/m² die mediane Zeit bis zum ersten Progress 92 Monate (ca. 7,5 Jahre) (95%-KI 72,535–111,465) vs. 14 Monate (95%-KI 0,000–30,166) in der Gruppe mit einem BMI von

höchstens 24,88 kg/m² beträgt. Eine univariate Cox-Regression für den *BMI* wird an dieser Stelle nicht berichtet, weil das Modell nicht besser als der Zufall war (Tab. 30).

Tabelle 30: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Body-Mass-Index – BMI ≤ 24,88 kg/m² vs. BMI ≥ 24,90 kg/m²

Initialer BMI /Patientenzahl)	(Ereignis-	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
		Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
<= 24,88 kg/m ² (23/43)		14,000	8,248	,000	30,166
>=24,90 kg/m ² (20/43)		92,000	9,931	72,535	111,465

¹ Standardfehler

4.6.2 Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression

Abbildung 14 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **p16^{INK4a}-Expressionsstatus**.

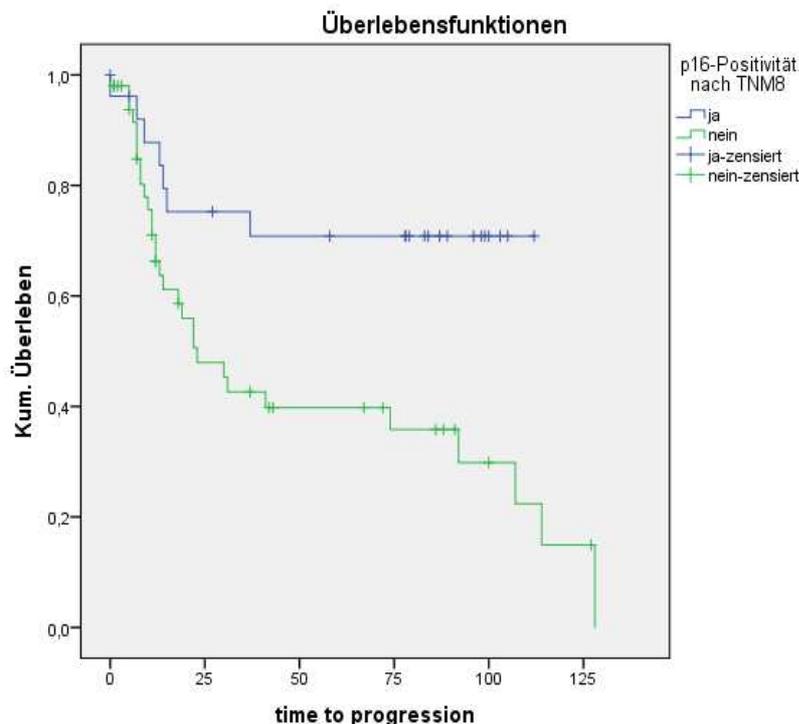


Abbildung 14: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus

In der deskriptiven Analyse der Zeit bis zum ersten Progress zeigt sich ein statistisch auffälliger Unterschied im Log Rank Test ($\chi^2(1)=6,931, p=0,008$) sowie auch in den Kaplan-Meier Kurven. Die mediane Zeit bis zum ersten Progress der p16^{INK4a}-

überexprimierenden Gruppe geht über den Beobachtungszeitraum hinaus und kann daher nicht ermittelt werden. Die Gruppe mit negativem p16^{INK4a}-Status zeigt eine mediane Zeit bis zum ersten Progress von 23 Monaten (95%-KI 9,174–36,826) (s. Tab. 31). Es fällt auf, dass Patienten bereits innerhalb des ersten Monats (zum Zeitpunkt 0) Progresse haben. Dabei handelt es sich um einen Zweitumor (Fall 43) und um eine Fernmetastase (Fall 78). In einem Fall kam es versehentlich zu der Fehleintragung eines Primarius als Progress (Fall 48).

Tabelle 31: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus

p16 ^{INK4a} -Überexpression (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (7/26)	n. e..	n. e..	n. e..	n. e..
Nein (30/51)	23,000	7,054	9,174	36,826

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Zeit bis zum ersten Progress in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausgeht.

p16 ^{INK4a} -Überexpression /Patientenzahl	(Ereignis-SE ¹)	Df ²	Signifikanz	HR	95 %-Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (7/26)	,426	1	,012	,345	,150	,795

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht der Gruppe ohne p16^{INK4a}-Überexpression.

¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade.

In der univariaten Cox-Regression zeigt sich der protektive Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status mit einer *Hazard Ratio* von 0,345 (95%-CI 0,150–0,795) (s. Tab. 31). In der multivariaten Analyse wurden auch hier aufgrund der geringen Fallzahl mehrere kleine Cox-Regressionsmodelle gerechnet, wobei der Effekt des p16^{INK4a}-Status jeweils nach einer anderen Variablen adjustiert wurde. Adjustiert wurde jeweils nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, *BMI*, Alkoholkonsum, Raucherstatus, Begleiterkrankungen (Leber-, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus), T-, N-, M-Stadium, RB1-Expressionsverlust, p53-Überexpression, Cyclin-D1-Überexpression. Die sich daraus ergebenden statistisch auffälligen *Hazard Ratios* reichten von 0,188 (p=0,011, 95%-CI 0,052–0,685) adjustiert nach RB1-Expressionsverlust bis 0,383 (p=0,029, 95%-CI 0,162–0,905) adjustiert nach Lebererkrankungen. Das einzige Modell, das keinen statistisch auffälligen Effekt auf die Zeit bis zum ersten Progress zeigte, war die Kontrolle nach hohem Alkoholkonsum. Der protektive Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status blieb also auch nach der Adjustierung erhalten.

Abbildung 15 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **RB1-Expressionsstatus**.

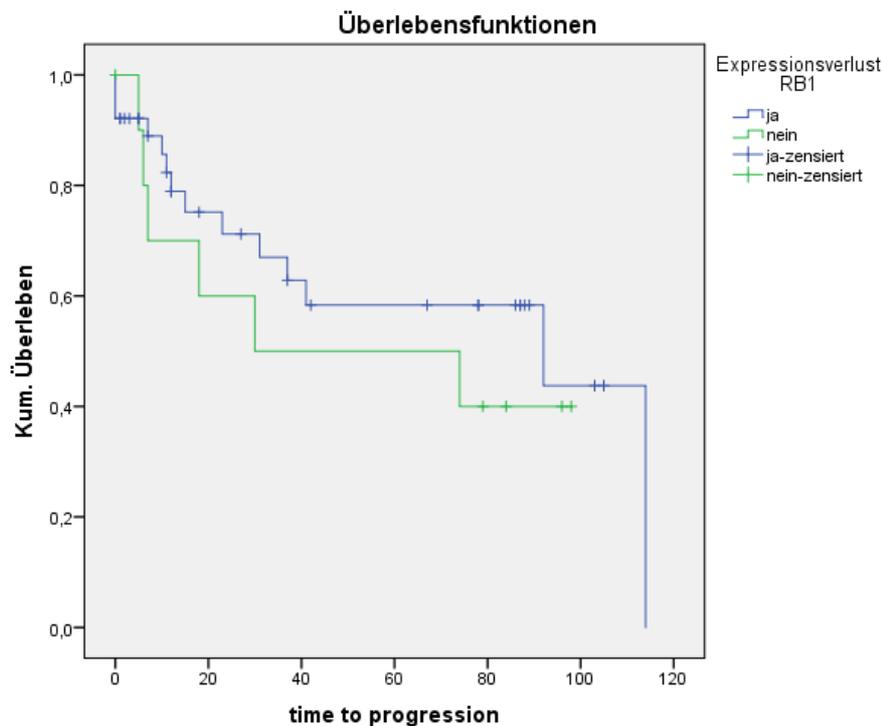


Abbildung 15: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

Die Patientenzahl ist vergleichsweise gering in der Gruppe ohne RB1-Verlust, so dass deren Kaplan-Meier Kurve früher ausdünn. Damit ist die Vergleichbarkeit erschwert. Auch der Log Rank Test ist nicht statistisch auffällig ($\chi^2(1)=0,557$, $p=0,455$). Deskriptiv erscheint die mediane Zeit bis zum ersten Progress in der Gruppe mit RB1-Verlust mit 92 vs. 30 Monaten bei Patienten, deren Primarius einen RB1-Expressionsverlust zeigt, länger. Die 95%-Konfidenzintervalle sind jedoch beide bei der geringen Fallzahl äußerst breit (0,000–191,566 vs. 0,000–116,773) (s. Tab. 32). In der univariaten Cox-Regression war das Modell nicht besser als der Zufall, weswegen der Effekt, der ebenfalls nicht statistisch auffällig war, hier nicht berichtet wird. In den bivariaten Cox-Regressionen deckte sich kein statistisch auffälliger Effekt auf. Die Adjustierung nach M-Status zeigte einen protektiven Effekt, da allerdings wie oben beschrieben die Hazards zu unterschiedlich sind, als dass die Voraussetzung für eine Cox-Regression erfüllt wären, wird dieser Effekt hier nicht weiter beschrieben. Adjustiert wurde in den bivariaten Cox-Regressionen jeweils nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Alkoholkonsum, Raucherstatus, Begleiterkrankungen (Leber-, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus), T-, N-, M-Status, p16^{INK4a}-Überexpression, p53-

Überexpression, Cyclin-D1-Überexpression. Auch hier ist zu beachten, dass bei der Bestimmung des RB1-Expressionsstatus möglicherweise ein systematischer Fehler vorliegt, der zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust führt (s. Kap. 5.8).

Tabelle 32: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

RB1-Expressionsverlust (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (14/38)	92,000	50,799	,000	191,566
Nein (6/11)	30,000	44,272	,000	116,773

¹ Standardfehler

Abbildung 16 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **p53-Expressionsstatus**.

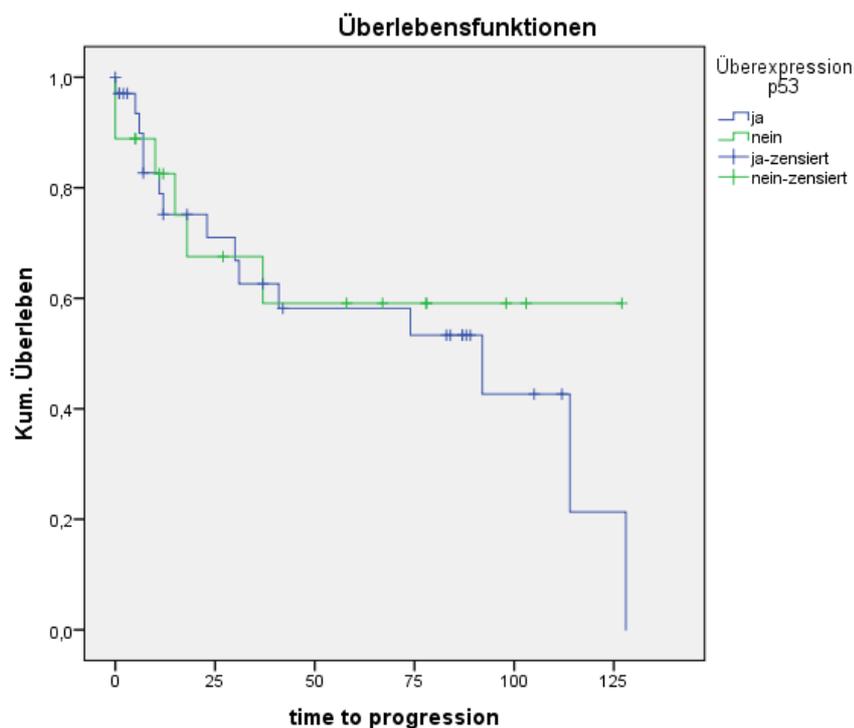


Abbildung 16: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

In der Zeit bis zum ersten Progress zeigt das p53-Expressionsmuster keinen Unterschied, weder in den Kaplan Meier Kurven noch im Log Rank Test ($\chi^2(1)=0,215$, $p=0,643$). Die mediane Zeit bis zum ersten Progress geht in der Gruppe ohne p53-Überexpression über den Beobachtungszeitraum hinaus und ist daher größer als 125 Monate vs. 92 Monate (95%-KI 11,359–172,641) bei Patienten, deren

Tumoren eine p53-Überexpression zeigen (s. Tab. 33). Die univariate Cox-Regression wird hier nicht berichtet, weil das Modell sich nicht besser zeigte als ein Zufallsmodell. Adjustiert wurde in den bivariaten Cox-Regressionen jeweils nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Alkoholkonsum, Raucherstatus, Begleiterkrankungen (Leber-, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus), T-, N-, M-Stadium, p16^{INK4a}-Überexpression, RB1-Expressionsverlust sowie Cyclin-D1-Überexpression, wobei sich ebenfalls kein Effekt auftat. Damit kann für p53 keine Assoziation mit der Progressionsrate festgestellt werden.

Tabelle 33: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

p53-Überexpression (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (15/34)	92,000	41,144	11,359	172,641
Nein (6/18)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

n. e.=nicht ermittelbar, weil die mediane Zeit bis zum ersten Progress in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging. ¹ Standardfehler

Abbildung 17 zeigt die Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom **Cyclin-D1-Expressionsstatus**.

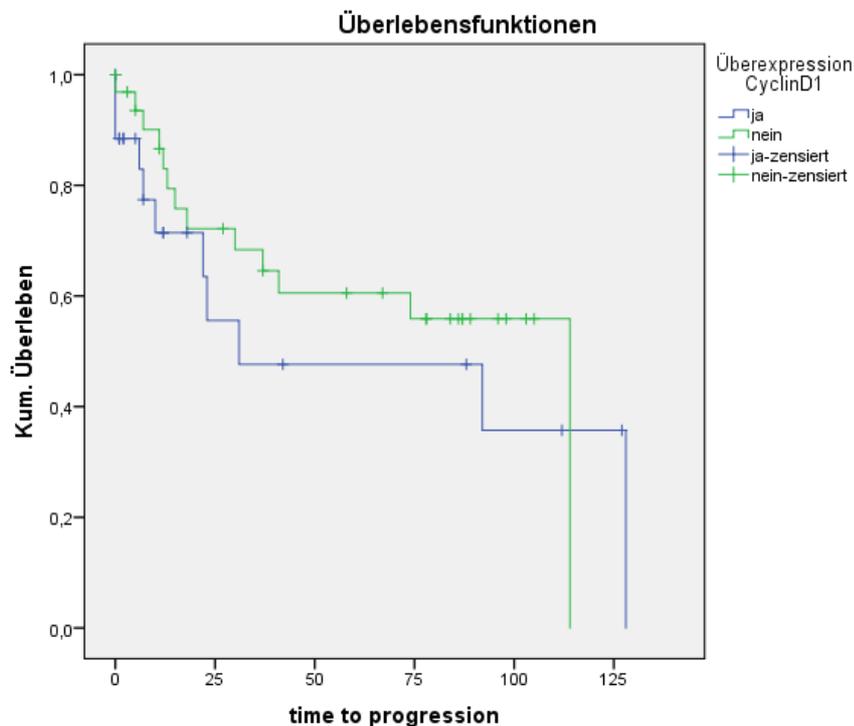


Abbildung 17: Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Für die Cyclin-D1-Expression zeigt sich in der deskriptiven Analyse der Zeit bis zum ersten Progress erst kein deutlicher Unterschied, sondern erst nachdem die Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression zunehmend ausgedünnt ist. Auch der Log Rank Test ist nicht statistisch auffällig ($\text{Chi}^2(1)=0,625$, $p=0,429$). Die mediane Zeit bis zum ersten Progress beträgt für die Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression 31 Monate, allerdings bei sehr hohem Standardfehler und sehr breitem Konfidenzintervall (95%-CI 0,000–120,427). Für die Gruppe ohne Cyclin-D1-Überexpression beträgt sie 114 Monate, ohne Angabe eines Konfidenzintervalls (s. Tab. 34). Die univariate Cox-Regression lieferte kein verwertbares Modell, sodass der univariate Effekt hier nicht berichtet wird. Adjustiert wurde in den bivariaten Cox-Regressionen jeweils nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Alkoholkonsum, Raucherstatus, Begleiterkrankungen (Leber-, Nierenerkrankung, Diabetes mellitus), T-, N-, M-Stadium, p16^{INK4a}-Überexpression, RB1-Expressionsverlust sowie nach Cyclin-D1-Überexpression, wobei sich nur nach Kontrolle durch den RB1-Expressionsverlust eine statistisch auffällige *Hazard Ratio* von 3,113 ($p = 0,037$, 95%-CI 1,073–9,030) zeigte. Der Kehrwert war nicht statistisch auffällig und wurde daher im Unterkapitel für RB1 nicht berichtet. Damit könnte eine Cyclin-D1-Überexpression mit einer erhöhten Progressionsrate assoziiert sein.

Tabelle 34: Statistische Analyse der Zeit bis zum Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Cyclin-D1-Überexpression (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Zeit bis zum ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Ja (11/26)	31,000	45,626	,000	120,427
Nein (13/32)	114,000	,000	n. e.	n. e.

n. e. nicht ermittelbar, ¹ Standardfehler

4.7 Überlebenszeit nach dem ersten Progress

4.7.1 Einfluss von Kovariablen

Bei den Kontrollvariablen sind statistisch auffällige Unterschiede in der Überlebenszeit nach dem ersten Progress nur in Bezug auf den Alkoholkonsum ($\text{Chi}^2(1)=4,814$, $p=0,028$) (s. Abb. 18) und den M-Status ($\text{Chi}^2(1)=5,346$, $p=0,021$) (s. Abb. 19) zu berichten. Dabei ist die mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress bei einem

hohen Alkoholkonsum in der Anamnese kürzer (11 Monate, 95%-KI 6,222–15,778 vs. 30 Monate, 95%-KI 27,474–32,526). Für Patienten mit initialem M1-Status ist die mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress ebenfalls kürzer (11 Monate, 95%-KI 5,868–16,132 vs. 24 Monate, ohne Angabe eines Konfidenzintervalls). Wie die univariaten Cox-Regressionen zeigen, ist die Mortalitätsrate nach dem ersten Progress in der Gruppe mit hohem Alkoholkonsum statistisch auffällig erhöht (HR=3,251, p=0,040, 95% KI 1,056–10,006) (s. Tab. 35) gegenüber der Gruppe mit mäßigem Alkoholkonsum. In der Gruppe mit M1-Status ist die Mortalitätsrate nach dem ersten Progress im Vergleich zur Gruppe mit M0-Status um den Faktor 3,049 erhöht (p=0,030, 95%-KI 1,111–8,366). (s. Tab. 36).

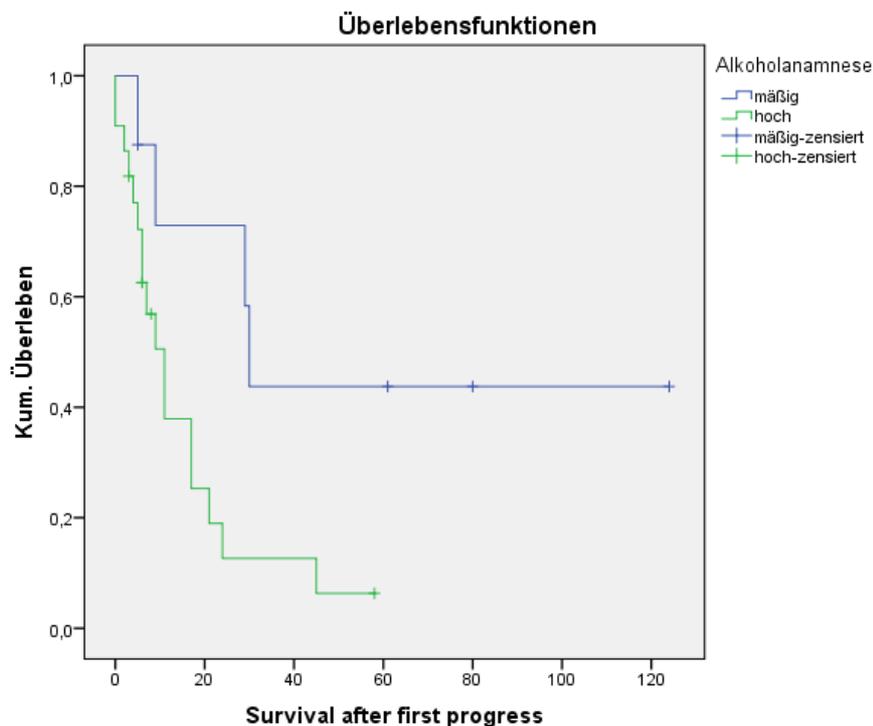


Abbildung 18: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – hoch vs. mäßig

Tabelle 35: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum – hoch vs. mäßig

Alkoholkonsum (Ereignis/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Mäßig (4/8)	30,000	1,289	27,474	32,526
Hoch (17/22)	11,000	2,438	6,222	15,778

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	Df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Alkoholkonsum hoch (17/22)	,574	1	,040	3,251	1,056	10,006

Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht einem mäßigen Alkoholkonsum in der Anamnese.
¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

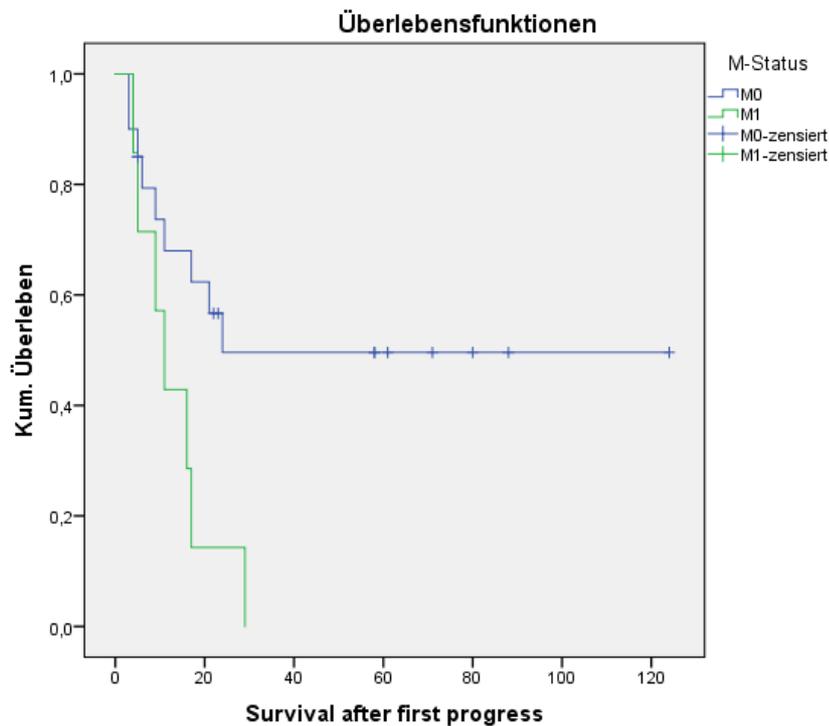


Abbildung 19: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1

Tabelle 36: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom M-Status – M0 vs. M1

M-Status (Ereignis/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
M0-Status (9/20)	24,000	n. e.	n. e.	n. e.
M1-Status (7/7)	11,000	2,619	5,868	16,132

(Ereignisse/Patientenzahl)	SE ¹	df ²	Signifikanz	HR	95 % Konfidenzintervall für Hazard Ratio (HR)	
					Untere Grenze	Obere Grenze
M1-Status (7/7)	,515	1	,030	3,049	1,111	8,366

n. e.=nicht ermittelt. Die HR ist für die Nicht-Referenz angegeben. Die Referenz entspricht dem M0-Status. ¹ Standardfehler, ² Freiheitsgrade

4.7.2 Einfluss der Zellzyklusprotein-Expression

Abbildung 20 zeigt die Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus.

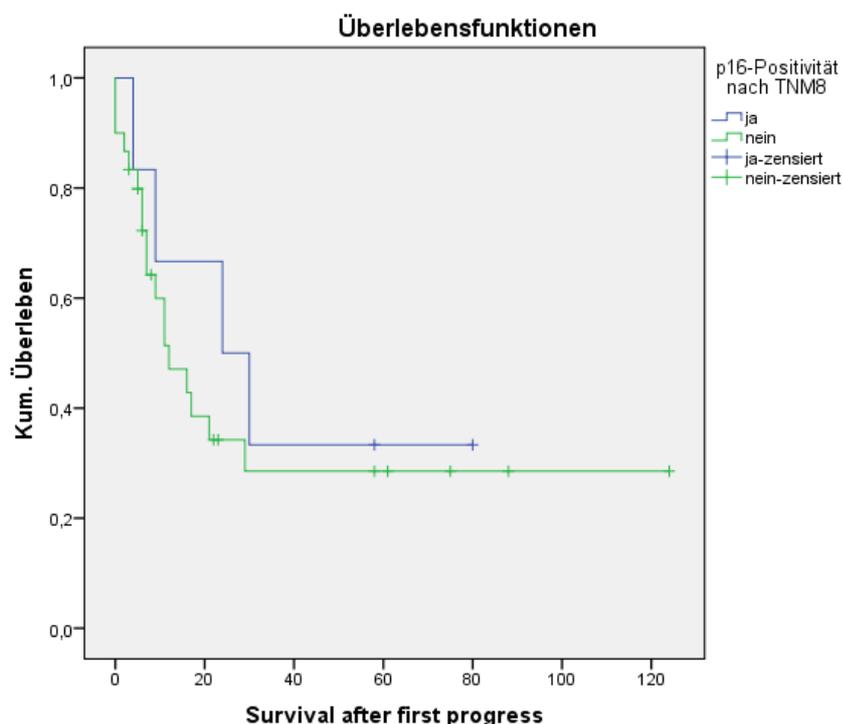


Abbildung 20: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Expressionsstatus

Auch die Betrachtung dessen, wie lange die Patienten stratifiziert nach dem p16^{INK4a}-Status nach erfolgtem Progress überleben, wird durch die geringe Fallzahl der Stichprobe erschwert und geht mit hohen Standardfehlern einher. Der Log Rank Test zeigte keinen statistisch auffälligen Unterschied ($p=0,530$, $\text{Chi}^2(1)=0,394$). Das mediane Überleben nach dem ersten Progress ist in der Gruppe mit positivem p16^{INK4a}-Status länger (24 Monate vs. 12 Monate, 95%-KI 0,000–49,205 vs. 95%-KI 4,025–19,975) (s. Tab. 37). Die Kaplan-Meier Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die univariate *Hazard Ratio* zeigt mit 0,708 einen protektiven Effekt für die Gruppe mit positivem p16^{INK4a}-Status, jedoch ist dieser nicht statistisch auffällig ($p=0,537$, 95% KI 0,237–2,116) und das Modell ist nicht besser als das Zufallsmodell, sodass es hier nicht abgebildet wird. In den bivariaten Cox-Regressionsmodellen zeigt sich sowohl adjustiert nach den anderen Zellzyklusproteinen als auch adjustiert nach den Kovariablen (Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Nikotin, Alkoholkonsum, T-, N-, M-Stadium, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen) kein statistisch auffälliger Einfluss eines positiven p16^{INK4a}-Status auf die Überlebenszeit nach dem ersten Progress. Die Modelle sind alle nicht besser als der Zufall.

Tabelle 37: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p16INK4a-Expressionsstatus

p16 ^{INK4a} -Status (Ereignisse/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
positiv (4/6)	24,000	12,860	,000	49,205
negativ (18/30)	12,000	4,069	4,025	19,975

¹ Standardfehler

Abbildung 21 zeigt die Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus.

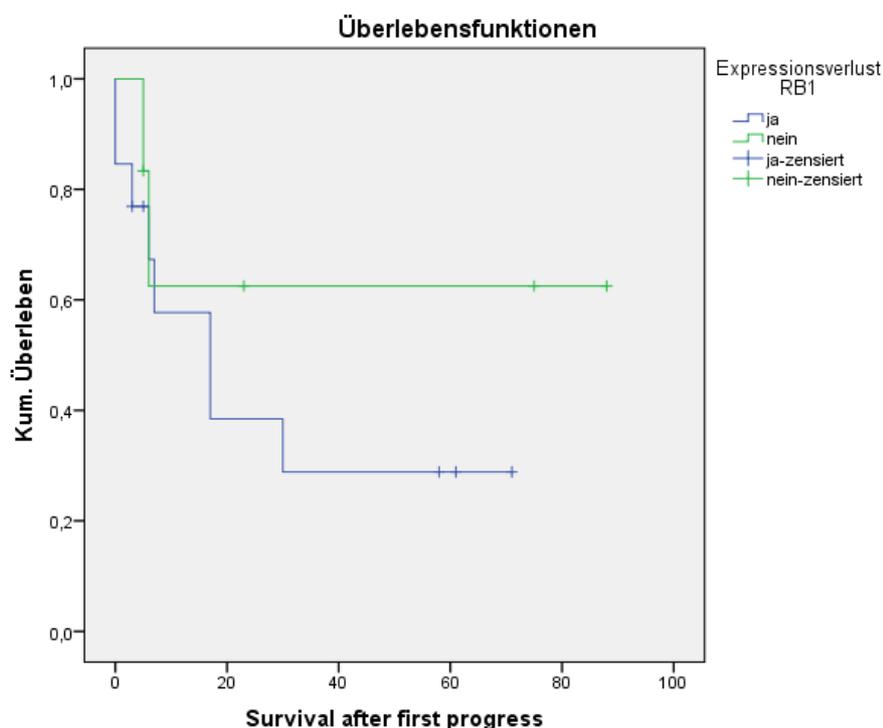


Abbildung 21: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

Der Log Rank Test in Bezug auf die Überlebenszeit nach dem ersten Progress zeigt keinen statistisch auffälligen Unterschied zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne Expressionsverlust von RB1 ($p=0,351$, $\text{Chi}^2(1)=0,869$) (s. Tab. 38). Die mediane Überlebenszeit war nur für die Gruppe mit RB1-Expressionsverlust zu ermitteln und betrug 17 Monate (95%-KI 1,916–32,084). Für die Gruppe ohne RB1-Verlust geht sie über den Beobachtungszeitraum hinaus, da innerhalb dessen nicht 50% der Patienten ohne Expressionsverlust ein Ereignis hatten. Die Fallzahl ist außerdem für die

Ermittlung valider Werte viel zu gering. Die Kaplan-Meier Kurven gehen sehr früh auseinander, weil es nur zwei Ereignisse in der insgesamt sehr schwach besetzten Gruppe ohne RB1-Expressionsverlust gibt. Die univariate *Hazard Ratio* und auch ihr Modell waren nicht statistisch auffällig und werden daher hier nicht berichtet. In den bivariaten Cox-Regressionsmodellen (adjustiert nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Nikotin, Alkoholkonsum, T-, N-, M-Stadium, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, p16^{INK4a}, p53, Cyclin-D1) zeigen sich keine statistisch auffälligen Effekte auf die Überlebenszeit nach dem ersten Progress. Die Modelle sind ebenfalls nicht besser als der Zufall. An dieser Stelle sei nochmals auf den systematischen Fehler hingewiesen, der möglicherweise in der Auswertung des RB1-Expressionsstatus entstanden ist und zu falsch hohen Fällen mit RB1-Expressionsverlust führt (s. Kap. 5.8).

Tabelle 38: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom RB1-Expressionsstatus

Expressionsverlust-RB1 (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
ja (8/13)	17,000	7,696	1,916	32,084
nein (2/6)	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.

n. e. =nicht ermittelbar, weil die mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in dieser Gruppe über den Beobachtungszeitraum hinausging. ¹ Standardfehler

Abbildung 22 zeigt die Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom **p53-Expressionsstatus**.

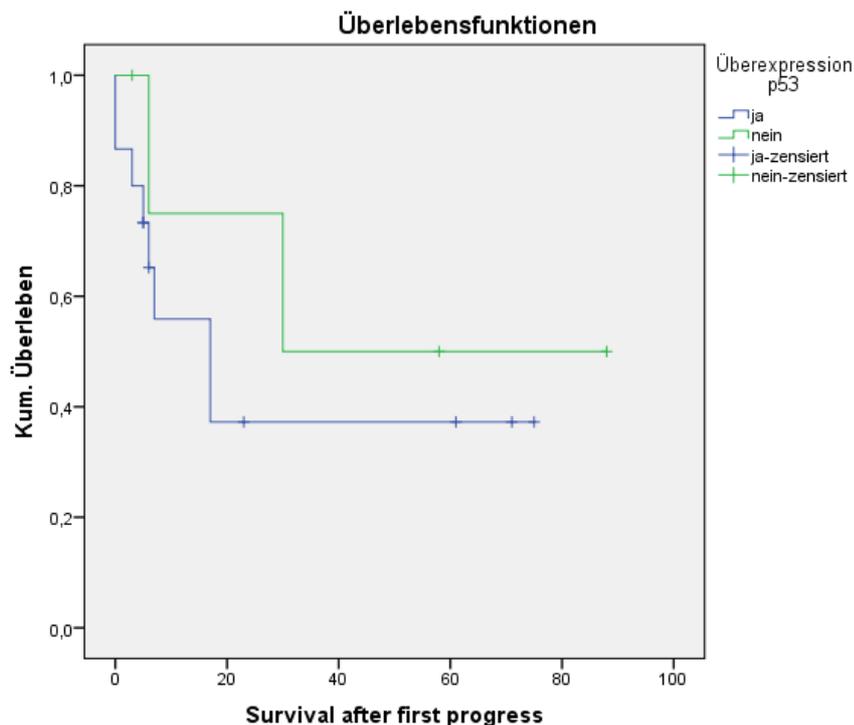


Abbildung 22: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

In der Gruppe ohne p53-Überexpression gibt es nur 2 unzensierte Fälle, so dass die Auswertung schwierig ist. Letztlich lässt sich anhand des vorliegenden Datensatzes die eingangs gestellte Frage nicht beantworten. Die mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress ist in der Gruppe ohne p53-Überexpression länger im Vergleich zur Gruppe mit p53-Überexpression (30 Monate, 95%-KI keine Angabe vs. 17 Monate, 95%-KI 2,059–31,941) (s. Tab. 39), allerdings ist die Schätzung aufgrund der sehr geringen Fallzahl möglicherweise zufällig. Der Log Rank Test ($\chi^2(1)=0,621$, $p=0,431$) zeigt ebenfalls keinen Unterschied im Überleben nach dem ersten Progress an. Die *Hazard Ratio* in der univariaten Cox-Regression zeigt keinen statistisch auffälligen Effekt einer p53-Überexpression auf das Überleben nach dem ersten Progress, wobei das Modell nicht besser schätzen kann als der Zufall. Es wird daher hier nicht abgebildet. In den bivariaten Regressionsmodellen (adjustiert nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Nikotin, Alkoholkonsum, T-, N-, M-Status, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, p16^{INK4a}, RB1, Cyclin-D1) sind keine statistisch auffälligen Effekte zu berichten. Die Modelle sind alle nicht besser als das Zufallsmodell.

Tabelle 39: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus

p53-Überexpression (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
ja (8/15)	17,000	7,623	2,059	31,941
Nein (2/5)	30,000	n. e.	n. e.	n. e.

n. e.=nicht ermittelt. ¹ Standardfehler

Abbildung 23 zeigt die Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus.

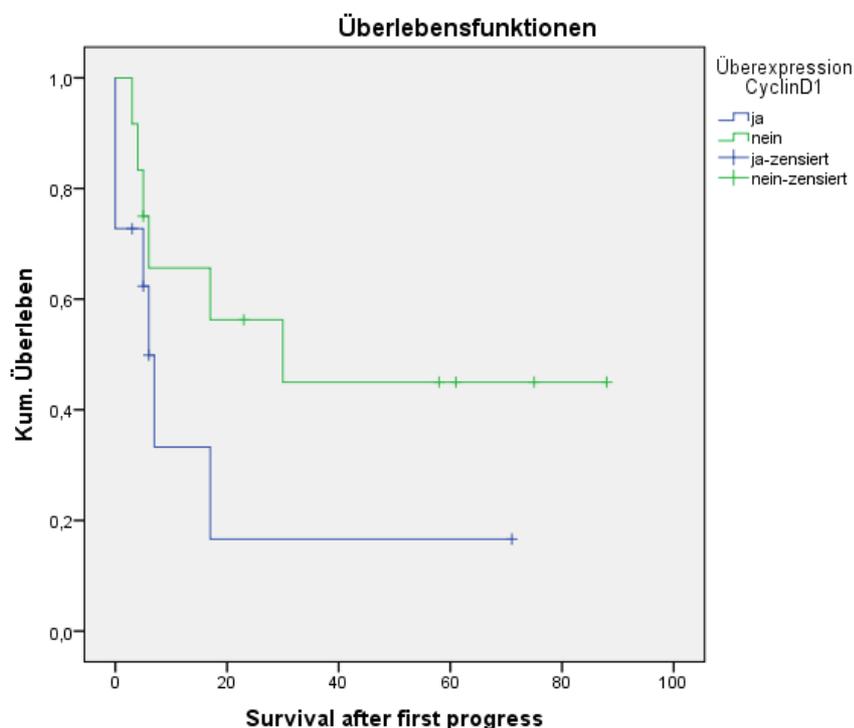


Abbildung 23: Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Die Gruppen stratifiziert nach der Cyclin-D1-Expression sind sich in der Fallzahl recht ähnlich und daher besser vergleichbar. Es ist kein deutlicher Unterschied in den Kaplan Meier Kurven sichtbar, bzw. erst wenn die Fallzahl ausdünn, und auch der Log Rank Test ist nicht statistisch auffällig ($\chi^2(1)=1,914$, $p=0,166$). Die mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress ist für die Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression kürzer als in der Gruppe mit normaler oder verminderter Cyclin-D1-Expression (6 Monate, 95%-KI 3,793–8,207 vs. 30 Monate, 95%-KI 0,000–65.,224) (s.

Tab. 40). Die univariate Cox-Regression zeigt eine zweifach erhöhte Mortalitätsrate für die Gruppe mit Cyclin-D1-Überexpression, wobei sie nicht statistisch auffällig ist (HR 2,118, 95%-KI 0,691–6,493, p=0,189) und auch das Modell nicht besser ist als der Zufall. Es wird daher hier auf die Abbildung verzichtet. In den bivariaten Cox-Regreessionsmodellen (adjustiert nach Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, BMI, Nikotin, Alkoholkonsum, T-, N-, M-Stadium, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, p16^{INK4a}, RB1, p53) zeigt sich kein statistisch auffälliger Effekt auf die Überlebenszeit nach dem ersten Progress. Die Modelle sind alle nicht besser als das Zufallsmodell.

Tabelle 40: Statistische Analyse der Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Abhängigkeit vom Cyclin-D1-Expressionsstatus

Cyclin-D1-Überexpression (Ereignis-/Patientenzahl)	Mediane Überlebenszeit nach dem ersten Progress in Monaten			
	Schätzer	SE ¹	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
ja (7/11)	6,000	1,126	3,793	8,207
Nein (6/12)	30,000	17,972	,000	65,224

¹ Standardfehler

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Tumorproben aus dem Primarius und, falls vorhanden, aus Progressen von 77 Patienten, bei denen im Zeitraum 2008–2011 ein primäres Oropharynxkarzinom mit Plattenepitheldifferenzierung an der Unimedizin Mainz diagnostiziert wurde, zur Expressionsanalyse der Zellzyklusproteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 immunhistochemisch gefärbt und mittels *Software* HALO[®] (IndicaLab, USA) ausgewertet. Anschließend wurden die klinischen Daten zu Patienten- und Tumoreigenschaften, Krankheitsverlauf, Krankheitsprogressen (definiert als loko-regionäre Rezidive, Fernmetastasen und Zweittumore) und Überlebensdaten nach dem jeweiligen Expressionsstatus jedes hier untersuchten Zellzyklusproteins stratifiziert. Auf diese Weise erfolgte eine explorative Untersuchung von potenziellen Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine und den Patienten- und Tumoreigenschaften sowie des Krankheitsverlaufes. Darüber hinaus wurde im Rahmen von Überlebenszeitanalysen der Einfluss des jeweiligen Expressionsstatus jedes der Zellzyklusproteine auf das Gesamtüberleben, der Zeit bis zum ersten Progress und der Überlebenszeit nach dem ersten Progress untersucht. Der Nachbeobachtungszeitraum reichte bis Juli 2019.

Der Biobank der Unimedizin Mainz war es nicht möglich für alle Patienten Tumorproben sowohl aus dem Primarius als auch aus den Progressen zur Verfügung zu stellen. Für einige Patienten konnten lediglich Tumorproben aus den Progressen herausgegeben werden. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Tumorproben aus loko-regionären Progressen oder Fernmetastasen das gleiche Expressionsmuster aufweisen wie der Primarius (129, 130). Diese Arbeit unternahm daher zunächst im Rahmen eines Vorversuches eine Analyse der Expressionskonsistenz der Zellzyklusproteine in den Progressen im Vergleich zu der Expression im Primarius. Hierbei zeigte sich allein für p16^{INK4a}, dass die Expressionsmuster im Sinne einer Überexpression „ja/nein“ in 100% der Fälle (27/27)¹³ denen des Primarius entsprachen, was mit den Befunden von Mehrad et al.

¹³ In nur einem Fall (Fall 8) zeigte die Lymphknotenmetastase keine p16^{INK4a}-Expression bei 80% allein nukleärer p16^{INK4a}-Immunreaktivität im Primarius. Da jedoch ein positiver p16^{INK4a}-Status hier definiert

übereinstimmt (16). Für die anderen Proteine bestand diese seltener (RB1 20/26, p53 17/25, Cyclin-D1 22/29). Die Konsequenz dieses Vorversuches bestand darin, dass für p16^{INK4a} in Fällen, in denen der Primarius nicht vorlag, sondern nur Proben aus Progressen, diese anstelle des Primarius ausgewertet wurden, so dass die Stichprobe für p16^{INK4a} (n=77) größer ist als für die anderen Zellzyklusproteine, in denen nur die Fälle ausgewertet wurden, in denen der Primarius vorlag (RB1 n=49, p53 n=52, Cyclin-D1 n=58). Da eine p16^{INK4a}-Überexpression definiert als $\geq 70\%$ nukleär und zytoplasmatisch immunreaktiver Zellen mit dem HPV-Status korreliert (15), wird der immunhistochemische p16^{INK4a}-Expressionsstatus als Surrogatmarker für eine HPV-assoziierte Tumorgenese verwendet (10). Hierbei besteht jedoch die Gefahr der Klassifikation von Patienten als fälschlicherweise HPV-assoziiert (9).

5.1 Assoziationen zwischen Patienteneigenschaften und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern

Hinsichtlich der Patientencharakteristika zeigte sich eine starke Assoziation (Cramers $V = 0,538$) nur zwischen einem negativen p16^{INK4a}-Status und einem Nikotinkonsum. Die Stichprobe umfasste sehr wenige Nichtraucher (10 Nichtraucher vs. 65 Raucher) und diese waren alle in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe enthalten. Die p16^{INK4a}-negative Gruppe umfasste ausschließlich Raucher. Ein weiterer statistisch auffälliger Befund ist eine tendenziell starke Assoziation zwischen einem hohen Alkoholkonsum und einem negativen p16^{INK4a} -Status (Cramers $V = 0,472$). Lebererkrankungen traten ausschließlich in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe auf, wobei es in der gesamten Stichprobe nur acht Fälle mit Lebererkrankungen gab. Diese Assoziation korrespondiert mit den Befunden von Gillison et al. (24), die in ihrer Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation zwischen HNSCC mit negativem p16^{INK4a} -Status und Rauchen sowie hohen Alkoholkonsum als Risikofaktor für HPV-negative HNSCC in Bezug auf die Normalbevölkerung gefunden haben. Die Patienten mit RB1-Expressionsverlust sind statistisch auffällig älter ($p=0,010$), allerdings liegt bei der Ermittlung des RB1-Status mutmaßlich ein systematischer Fehler vor, so dass dieser Befund fraglich ist (s. Kap.

ist als nukleäre UND zytoplasmatische Expression, wird auch dieser Fall in Bezug auf den p16^{INK4a}-Status als konsistent bewertet, und zwar hier konsistent im Sinne von p16^{INK4a}-negativ.

5.8). Ein Expressionsverlust von RB1 war in anderen Studien (11, 63) mit einem positiven HPV-Status assoziiert und dieser wiederum zeigt sich überwiegend in OPSCC von jüngeren Patienten wie Chaturvedi et al. in ihrer epidemiologischen Studie darstellen (131). Eine Assoziation zwischen einer p16^{INK4a}-Positivität und dem Lymphknotenstatus, wie sie in anderen Studien gefunden wurde (96, 102), zeigte sich in dieser Arbeit nicht.

5.2 Assoziationen zwischen Tumorcharakteristika und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern

Bei der Analyse potenzieller Korrelationen der Tumorcharakteristika mit den Expressionsmustern zeigt sich eine mittelstarke Assoziation zwischen einer p16^{INK4a}-Überexpression und der Tumorlokalisierung ($V=0,444$). Primärtumoren mit positivem p16^{INK4a}-Status sind in dieser Studie am häufigsten in der Tonsilla palatina lokalisiert. Die p16^{INK4a}-negativen Tumoren fanden sich am häufigsten am Weichgaumen / an der Uvula gefolgt vom Zungengrund. Dieser Unterschied war statistisch auffällig ($p=0,002$). Auch in den Studien von Castellsague et al. und Holzinger war die höchste Prävalenz von HPV in den Tonsillen (11, 64).

Bezüglich einer potenziellen Korrelation der Expressionsmuster der einzelnen Zellzyklusproteine untereinander wurde hier nur eine einzige starke Assoziation gefunden. Diese bestand zwischen einem negativen p16^{INK4a}-Status und einer Cyclin-D1-Überexpression (Cramers $V=0,525$). Dieser Unterschied ist auch statistisch auffällig ($p<0,001$). Die Assoziation zwischen einem negativen p16^{INK4a}-Status und einer p53-Überexpression war mittelstark (Cramers $V=0,306$) jedoch statistisch auffällig ($p=0,038$). Zwischen den übrigen von Holzinger (11) beschriebenen und in den Studien von Castellsague et al. (64) und Plath et al. (63) untersuchten Markerkombinationen wurden in der vorliegenden Dissertation keine starken Assoziationen gefunden, wobei die Vierfachkombination aus p16^{INK4a} hoch, RB1, p53 und Cyclin-D1 niedrig nach Holzinger (11) als Marker für eine HPV-Beteiligung hier auch nicht eigens getestet wurde. Es wurde lediglich nach Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine untereinander gesucht. Insbesondere war in dieser Studie keine Assoziation zwischen einem positiven p16^{INK4a}-Status und einem RB1-Expressionsverlust feststellbar, wobei dieses Ergebnis Folge eines systematischen Fehlers bezüglich des RB1-Status sein könnte (s. Kap. 5.8).

Das diagnostische Potenzial der Expressionsmuster der einzelnen Zellzyklusproteine in Bezug auf eine HPV-Beteiligung wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die starke Assoziation zwischen einem negativen p16^{INK4a}-Status und einer Cyclin-D1-Überexpression, die hier ermittelt wurde, könnte jedoch die Cyclin-D1-Überexpression als zusätzlichen Marker für eine fehlende HPV-Beteiligung interessant machen. Es wird daher empfohlen, in einer weiteren Studie den direkten Virusnachweis in den Fällen, bei denen Material aus dem Primarius und p16^{INK4a}- sowie Cyclin-D1-Färbung vorliegt, durchzuführen. Vorgeschlagen wird dabei das Protokoll von Kallioniemi (132), welches im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit etabliert werden könnte. In diesem Zusammenhang wäre außerdem die von Rasmussen et al. (103) gezeigte Assoziation zwischen dem Auftreten von Fernmetastasen und negativem HPV-DNA-Status bei positivem p16^{INK4a}-Status zu prüfen. Hierfür wäre es wünschenswert, die Stichprobe zu vergrößern, um den Untersuchungszeitraum auszudehnen.

5.3 Assoziationen zwischen Parametern des Krankheitsverlaufes und Zellzyklusprotein-Expressionsmustern

Die Analyse des Krankheitsverlaufes zeigte eine starke Assoziation zwischen loko-regionären Rezidiven gefolgt von Zweittumoren als Art des ersten erlebten Progresses mit einem negativen p16^{INK4a}-Status ($V=0,565$). In der p16^{INK4a}-positiven Gruppe zeigten nur sechs Patienten überhaupt Progresse. In der Studie von Fakhry et al. gab es keinen Unterschied in den Progressarten zwischen den p16^{INK4a}-Gruppen. Bei ihnen waren in beiden Gruppen loko-regionäre Progresse die häufigste Progressform (76).

In der Gruppe mit RB1-Verlust bestand eine starke Assoziation mit Zweittumoren als erster Progress, während Patienten mit normaler RB1-Expression wie die p16^{INK4a}-negative Gruppe insbesondere loko-regionäre Rezidive als ersten Progress aufwiesen (Cramers $V=0,587$). In Bezug auf p53 bestand eine starke Assoziation zwischen Zweittumoren gefolgt von loko-regionären Rezidiven für Patienten mit p53-Überexpression (Cramers $V=0,641$). Die Assoziation zwischen einer Cyclin-D1-Überexpression und Zweittumoren bzw. zwischen einer normalen Cyclin-D1-Expression und loko-regionären Rezidiven war lediglich mittelgradig ($V=0,388$).

Aufgrund der geringen Fallzahlen in den einzelnen Ausprägungen waren die Chi²-Tests alle nicht zu verwerten. Nach Literaturrecherche ist dies die erste Studie, die einen Zusammenhang zwischen der RB1-Expression und dem Krankheitsverlauf betrachtet. Es ist zu beachten, dass mutmaßlich falsch viele Patienten einen RB1-Expressionsverlust aufweisen, aufgrund eines systematischen Fehlers (s. Kap. 5.8).

Was die weiteren im Verlauf der Krankheit aufgetretenen Progresse angeht, zeigten sich keine Assoziationen oder statistisch auffälligen Unterschiede zwischen der Häufigkeit von loko-regionären Rezidiven, Fernmetastasen und Zweitumoren und den betrachteten Expressionsmustern der Zellzyklusproteine. Allerdings sind die Fallzahlen in dieser Studie auch sehr gering. Es gibt nicht viele Studien, die nach einem Progressmuster im Verlauf der Erkrankung im Zusammenhang mit den Zellzyklusproteinen gesucht haben. Derartige Studien gibt es nur für p16^{INK4a} (76) (94, 100). Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die explizit zwischen dem ersten Progress und den Progressen insgesamt, d. h. bspw. dem Auftreten von Fernmetastasen in den jeweiligen Expressionsgruppen im gesamten Beobachtungszeitraum, unterschieden hat. Der Umstand, dass einige Patienten mehrere Progresse erleiden, könnte dazu führen, dass sich bei der Betrachtung einer bestimmten Progressform für den gesamten Beobachtungszeitraum keine Unterschiede oder Assoziationen zeigen. Erst aufgrund dieser Unterscheidung (erster Progress vs. bspw. Fernmetastasen insgesamt) zeigten sich Assoziationen zwischen der Art des Progresses und Proteinexpressionsmustern auf. Alle Patienten in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe, die einen Progress ihrer Erkrankung erlitten haben, haben auch noch mindestens einen weiteren erlitten, was mit dem später diskutierten Ergebnis der besseren Gesamtüberlebenszeit korrespondiert. Dabei könnte man argumentieren, dass die Patienten aufgrund der geringeren Mortalitätsraten lange genug überlebten, um mehrere Progresse zu erleiden.

Die von Huang (102) gefundene Assoziation zwischen einem positiven p16^{INK4a}-Status und einem disseminierten Metastasierungsmuster zeigte sich hier nicht. Ein möglicher Grund hierfür besteht darin, dass für die vorliegende Studie vergleichsweise wenig Patienten und in der Folge auch wenig Fälle mit Fernmetastasen vorlagen. In der Stichprobe für p16^{INK4a} hatten acht von 77 Patienten Fernmetastasen, für RB1 vier von 49, für p53 vier von 52 und für Cyclin-D1 sechs von 58. Zudem verteilen sich die Fälle mit Fernmetastasen auf das jeweilige Expressionsmuster jedes Proteins, so dass

Metastasierungsmuster hier, bei zu geringen Fallzahlen, nicht ermittelbar waren. Im Vergleich dazu hatten in der Stichprobe von Huang et al., die den Zusammenhang zwischen dem p16^{INK4a}-Status und dem Metastasierungsmuster untersuchten, 79 von 624 Patienten Fernmetastasen, sodass sich dort ein Metastasierungsmuster ermitteln ließ. Deskriptiv kamen in der vorliegenden Studie mehr pulmonale Fernmetastasen in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe vor, wobei diese in den wenigsten Fällen histologisch gesichert waren und daher die Abgrenzung zu Zweittumoren nicht sicher ist.

Außer den starken Assoziationen zwischen einem negativen p16^{INK4a}-Status und loko-regionären Rezidiven sowie zwischen einem RB1-Expressionsverlust bzw. einer p53-Überexpression und Zweittumoren als jeweils erste Progression kann diese Studie keine Assoziationen zwischen Parametern des Krankheitsverlaufes und den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine aufdecken. Den Untersuchungszeitraum im Rahmen einer weiteren Studie auszudehnen und bspw. ab dem Jahr 2000 Patienten einzuschließen, wäre daher für die Beantwortung dieser Fragestellung empfehlenswert. Das Ausbleiben von Ergebnissen bezüglich dieser Fragestellung ist im Wesentlichen der geringen Fallzahl geschuldet.

5.4 Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklus-Proteine und dem Gesamtüberleben

Die Effekte der Expressionsmuster der Zellzyklusproteine auf das Gesamtüberleben wurden sowohl im Rahmen uni-, als auch multivariater Analysen untersucht, wobei aufgrund der geringen Fallzahl jeweils mehrere kleine Modelle pro Protein gerechnet werden mussten. Dabei konnten die protektiven Effekte für eine p16^{INK4a}-Überexpression, die sich auch bereits in anderen Studien gezeigt haben (2, 63), bestätigt werden (HR 0,387, p=0,042, 95% KI 0,156–0,965 bereinigt durch einen initialen BMI von mindestens 24,9 kg/m², HR 0,328, p=0,026, 95%KI 0,123–0,876 bereinigt durch den Effekt des N-Stadiums). Die mediane Überlebenszeit ging für die p16^{INK4a}-positive Gruppe über den Beobachtungszeitraum von 125 Monaten hinaus, weil nicht 50% der Patienten in dieser Gruppe ein Ereignis innerhalb des Beobachtungszeitraumes hatten. Für die p16^{INK4a}-negative Gruppe betrug sie 36 Monate (p=0,022). Für eine Cyclin-D1-Überexpression zeigten sich in den

multivariaten Analysen statistisch auffällige Effekte auf die Überlebenszeit, wobei die Mortalitätsrate um den Faktor 2,374–3,453¹⁴ erhöht war ($p=0,071$, 95%-KI 0,929–6,063 bzw. $p=0,063$, 95% KI 0,935–12,745). Für die jeweiligen Expressionsmuster von RB1 und p53 konnten in den uni- und multivariaten Analysen keine Effekte auf das Gesamtüberleben festgestellt werden und auch keine statistisch auffälligen Unterschiede in der Überlebenszeit.

Damit bestätigt die vorliegende Studie die Überlebensvorteile für Patienten mit positivem p16^{INK4a}-Status, die in zahlreichen anderen Studien gezeigt worden sind, wie bspw. der Meta-Analyse von Masterson et al. (2) zu entnehmen ist.

Auch konnte der Befund von Ang et al. (81) bestätigt werden, die in ihrer multivariaten Analyse eine Assoziation von Cyclin-D1-Überexpression mit einem schlechteren Gesamtüberleben fanden. In ihrer Studie war die *Hazard Ratio* (HR 3,55, $p=0,007$) zudem mit dieser Studie vergleichbar. In der Studie von Plath et al. (63) war eine Cyclin-D1-Überexpression nur tendenziell mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert (HR 1,59, $p=0,053$). Sie haben in der multivariaten Analyse ihrer Studie außerdem erhöhte Mortalitätsraten für eine hohe p53-Expression gefunden, was alle anderen hier zitierten Studien sowie auch die vorliegende Studie nicht zeigten.

Holzinger (11) hat für das Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse lediglich einen protektiven Einfluss für einen RB1-Expressionsverlust festgestellt, was die vorliegende Studie nicht zeigen konnte. Für die übrigen Proteine waren in der multivariaten Analyse ihrer Studie keine Effekte nachweisbar, sondern nur in den Kaplan- Meier Analysen (11).

Damit lässt sich schlussfolgern, dass die Assoziation einer p16^{INK4a}-Überexpression mit einem besseren Gesamtüberleben konsistent in den Studien nachgewiesen werden kann, wohingegen sich die Assoziationen der anderen Zellzyklusproteine mit dem Gesamtüberleben heterogen in den oben aufgeführten Studien zeigen. Ein Grund dafür mögen die unterschiedlichen Trennwerte für die Klassifizierung der jeweils unterschiedenen Expressionsmuster sein. In Bezug auf p53 haben Tandon et al. (80)

¹⁴ Diese *Hazard Ratios* geben den Bereich an, in dem die *Hazard Ratios* der bivariaten Cox-Regressionen lagen, in denen nach Kovariablen (Geschlecht, Alter, BMI, T-, N-, M-Stadium, Raucheranamnese, Alkoholanamnese, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenerkrankungen) und den anderen Zellzyklusproteinen adjustiert wurde. Aufgrund der geringen Ereigniszahl waren größere Cox-Regressions-Modelle nicht möglich.

in ihrem systematischen Review auf diesen Umstand bereits hingewiesen. Für p16^{INK4a} gibt es dagegen einheitliche Trennwerte (15).

5.5 Assoziationen zwischen Zellzyklusprotein-Expressionsmustern und der Zeit bis zum ersten Progress

Der p16^{INK4a}-Status zeigte ebenfalls einen Unterschied in der Zeit bis zum ersten Progress ($p=0,008$), wobei die p16^{INK4a}-negative Gruppe eine mediane Zeit bis zum ersten Progress von 23 Monaten hatte, während sie in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe nicht zu bestimmen war, weil innerhalb des Beobachtungszeitraumes weniger als die Hälfte der Patienten in dieser Gruppe ein Ereignis hatten. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe nur sieben von 26 Patienten einen Progress hatten (versus 30 von 51 Patienten in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe). Die multivariate Analyse zeigte einen protektiven Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status auf die Progressrate. Die *Hazard Ratios* in den bivariaten Modellen reichten von 0,188 ($p=0,011$, 95%-KI 0,052–0,685) adjustiert nach dem RB1-Expressionsverlust bis 0,383 ($p=0,029$, 95%-KI 0,162–0,905) adjustiert nach dem Vorhandensein von Lebererkrankungen. Dies ist in zweierlei Hinsicht ein Widerspruch zu der Studie von Fakhry et al. (76). Die mediane Zeit bis zum Krankheitsprogress ist in der hier ausgewerteten Stichprobe sehr viel länger und geht in der p16^{INK4a}-positiven Gruppe sogar über den Untersuchungszeitraum hinaus. Bei Fakhry et al. war die mediane Zeit bis zum ersten Progress 8,2 vs. 7,3 Monate ($p=0,67$) für die p16^{INK4a}-positive vs. p16^{INK4a}-negativen Gruppe. Außerdem zeigte sich bei Fakhry et al. kein Unterschied in der Zeit bis zum Progress stratifiziert nach dem p16^{INK4a}-Status. Der Grund könnte in der von Fakhry et al. verwendeten Methode zur Ermittlung von Unterschieden in der Zeit bis zum ersten Progress liegen. Während in der vorliegenden Arbeit Überlebenszeitanalysen zur Anwendung kamen, nutzten Fakhry et al. den Wilcoxon Rang-Summen Test (76). Darüber hinaus ist die Fallzahl hier zu gering, als dass die Ergebnisse nicht auch zufällig sein könnten. Die Studie von Guo et al. (77) hatte für HPV-positive Tumoren eine längere Zeit bis zum Progress gefunden, allerdings hatten sie zusätzlich nach Überleben stratifiziert. Der Überlebensvorteil in der Zeit bis zum Progress zeigte sich dabei nur in der Gruppe, die länger als 2 Jahre überlebte, nicht

jedoch in der Gruppe, die weniger als 2 Jahre überlebte. Allerdings war die Gruppe der länger als 2 Jahre Überlebenden vornehmlich HPV-positiv (79%, (77), S. 98).

In der vorliegenden Arbeit zeigte eine Cyclin-D1-Überexpression in der Kaplan Meier Analyse keinen signifikanten Unterschied. In den bivariaten Analysen zeigte sich lediglich nach Adjustierung durch den RB1-Expressionsverlust ein statistisch auffälliger Effekt mit einer *Hazard Ratio* von 3,113 ($p=0,037$, 95% KI 1,073–9,030). Damit könnte eine Cyclin-D1-Überexpression ein erhöhtes Risiko, einen Progress zu erleiden, darstellen, wobei zu bedenken ist, dass in der immunhistochemischen Färbung von RB1 vermutlich ein systematischer Fehler steckt (s. Kap. 5.8). Für RB1 und p53 zeigten sich weder Unterschiede noch Effekte auf die Zeit bis zum ersten Progress.

Holzinger (11) hat in ihrer Arbeit auch den Einfluss der Zellzyklusproteine auf das progressionsfreie Überleben untersucht, wobei Progresse krankheitsspezifisches Versterben beinhalteten. In ihrer multivariaten Cox-Regression zeigte nur, wie auch für das Gesamtüberleben, ein RB1-Expressionsverlust einen Einfluss. Dieser war ebenfalls protektiv. Die p16^{INK4a}-Überexpression und Cyclin-D1-Überexpression zeigten in ihrer Studie nur in der Kaplan Meier Analyse einen signifikanten Unterschied in der progressionsfreien Überlebenszeit, nicht jedoch nach Adjustierung (11).

Hinsichtlich der Überlebenszeitanalysen zeigen sich die Studien meist uneinheitlich, indem sie verschiedene Überlebenszeiten untersuchen. Hier wurde bspw. zugunsten der Stichprobengröße darauf verzichtet, das krankheitsfreie und auch das krankheitsspezifische Überleben zu untersuchen. Dieses ist auch dem Umstand geschuldet, dass die Todesursache in vielen Fällen nicht zu ermitteln war. Aus diesem Grund wurde auch kein kombinierter Endpunkt im Sinne des progressionsfreien Überlebens untersucht, sondern lediglich die Zeit bis zum Progress unter Zensierung der Ausgeschiedenen sowie der Verstorbenen. Wäre ein kombinierter Endpunkt gewählt worden, dann wäre die Analyse hinsichtlich des Informationsgehaltes der Analyse des Gesamtüberlebens sehr ähnlich gewesen. Zusammenfassend kann also ein protektiver Effekt einer p16^{INK4a}-Überexpression auf die Progressrate festgestellt werden.

5.6 Assoziationen zwischen den Expressionsmustern der Zellzyklusproteine und der Überlebenszeit nach dem ersten Progress

Bezüglich des Gesamtüberlebens nach dem ersten Progress zeigte in der vorliegenden Studie keines der Zellzyklusproteine Unterschiede in der Kaplan Meier Analyse oder Effekte in den Cox-Regressionen.

Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen der p16^{INK4}-Expression und der Überlebenszeit nach dem ersten Progress untersucht hat, ist die Studie von Fakhry et al. (76). Sie konnten ein signifikant besseres 2-Jahres-Überleben für die Gruppe mit p16^{INK4a}-Überexpression feststellen (54,6%, 95%-KI 44,9–64,4 vs. 27,6%, 95%-KI 17,3–37,9). Auch die multivariate Analyse zeigte bei Fakhry et al. einen protektiven Einfluss einer p16^{INK4a}-Überexpression auf das Überleben nach dem ersten Progress (HR 0,48, $p < 0,001$, (76), S. 6 ff.). Aufgrund der sehr viel geringeren Fallzahlen kann die vorliegende Studie keine Vergleichsdaten zu diesen Befunden anbringen.

Für die weiteren Zellzyklusproteine ergab die Literaturrecherche keine Treffer für den Einfluss auf das Überleben nach dem ersten Progress, so dass in diesem Punkt die hier ermittelten Daten diese Frage erstmals, wenn auch auf Grundlage einer geringen Stichprobengröße, versucht haben zu beantworten.

5.7 Effekt eines hohen Alkoholkonsums in den Überlebenszeit-Analysen

Ein Nebenbefund ist, dass ein hoher Alkoholkonsum in allen drei Überlebenszeitanalysen sowohl in der Kaplan Meier Analyse als auch in den univariaten Cox-Regressionen mit einem schlechteren Outcome assoziiert war. Die Analyse des Gesamtüberlebens zeigte einen starken Zusammenhang zwischen einem hohen Alkoholkonsum und der Mortalitätsrate in der univariaten Cox-Regression (HR 4,055, $p = 0,003$, 95%-KI 1,622–10,125). Hinsichtlich der Zeit bis zum Auftreten des ersten Progresses zeigte sich ein hoher Alkoholkonsum in der Anamnese als Faktor mit einer statistisch auffällig kürzeren krankheitsfreien oder krankheitsstabilen Zeit

($p=0,014$) und einer 2,5-fach erhöhten Progressrate (95%-KI 1,170–5,668). Einen statistisch auffälligen Unterschied zeigte ein hoher Alkoholkonsum ($p=0,028$) auch beim Überleben nach dem ersten Progress. In der univariaten Cox-Regression war ein hoher Alkoholkonsum mit einer erhöhten Mortalitätsrate nach erfolgtem Progress assoziiert (HR 3,251, $p=0,040$, 95%-KI 1,056–10,006). Der Alkoholkonsum wurde lediglich nach den Zellzyklusproteinen im Rahmen bivariater Cox-Regressionen adjustiert, nicht jedoch für alle anderen *Confounder*. Eine wichtige Einschränkung hierbei ist, dass ein hoher Alkoholkonsum nicht definiert ist in bspw. alkoholische Getränke pro Woche, Art der alkoholischen Getränke oder anderen Parametern der Dauer und Intensität des Konsums. Die Daten stammen aus den Anästhesieprotokollen der Patienten und sind retrospektiv erhoben worden, so dass keine einheitliche Definition vorlag. Es handelt sich um subjektive Bewertungen durch die Patienten selbst oder durch die Anästhesisten. Eine weitere Einschränkung ist, dass Selbstaussagen über den Konsum von Suchtmitteln schambesetzt sein können und somit nicht unbedingt wahrheitsgemäß sind.

Daraus ergibt sich die Empfehlung, einen hohen Alkoholkonsum in einer zukünftigen Studie zu definieren und anschließend als unabhängigen Prädiktor in Bezug auf die jeweiligen Überlebenszeiten zu untersuchen.

5.8 Kritische Wertung

Eine wichtige Limitation bestand darin, dass aus der initialen Stichprobe sehr viele Patienten unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien ausgeschlossen wurden. Einige Patienten mit Oropharynx-Karzinomen hatten tatsächlich bereits einen Tumor insbesondere im Kopf-Hals-Bereich. Darüber hinaus stand der Biobank nicht für jeden Patienten ausreichend Gewebe zur Herausgabe zur Verfügung, so dass sich die Stichprobengröße unerwartet sehr reduziert hat. Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang bestand darin, dass für manche Patienten nur Tumormaterial aus den Progressen zu bekommen war, so dass für die Proteine RB1, p53 und Cyclin-D1 die Stichprobengröße nochmals kleiner wurde, weil ihre Expressionsmuster sich in den Progressen von denen im Primarius unterschieden. Allerdings ist dieser Vorversuch auch als eine Stärke der vorliegenden Studie hervorzuheben, da die

Literaturrecherche nur zwei Studien ergeben hat, die sich mit dieser Frage bei Oropharynx-Karzinomen beschäftigten und dieses auch nur in Bezug auf p16^{INK4a} (16, 73).

Die geringe Stichprobengröße führt auch dazu, dass die Daten in Bezug auf den Krankheitsverlauf und auf die Verteilung der einzelnen hier untersuchten Progressformen nur von geringer Validität sind. Für p16^{ink4a} gab es insgesamt nur 36 Patienten mit Progressen (für RB1 insgesamt 18 Patienten, für p53 insgesamt 20 Patienten, für Cyclin-D1 insgesamt 23 Patienten). Diese Daten lassen daher kaum Schlussfolgerungen zu und haben nur explorativen Wert.

Betrachtet man die Anzahl der Patienten mit RB1-Expressionsverlust in Holzingers Arbeit (11), so stellt man fest, dass von 186 Tumoren 29% einen RB1-Expressionsverlust aufwiesen (11). Der Großteil der Tumoren zeigte also eine normale RB1-Expressionsdichte. In anderen Studien war der Anteil an Tumoren mit RB1-Expressionsverlust 7,5% (117) und 48,6% (63). In der vorliegenden Dissertation zeigt der Großteil der Tumoren (38/49, d. h. 76%) einen RB1-Expressionsverlust. Wenn die vorliegende Stichprobe auch sehr viel kleiner ist, handelt es sich mutmaßlich um einen systematischen Fehler. Die zur Mittelwertbildung verwendeten TMAs zeigen zwar jeweils eine spezifische Färbung, jedoch ist die Färbung von unterschiedlicher Intensität. Der Mittelwert wurde also aus stärker und weniger intensiv gefärbten TMAs gebildet. Diese Unterschiede könnten aufgrund von Abweichungen in den Inkubationszeiten der verschiedenen Reagenzien zustande gekommen sein, oder aber durch die Verwendung nicht gleich angesetzter Antikörperlösungen. RB1 war das einzige Protein, das manuell an einer Färbebank gefärbt wurde, so dass nicht wie bei der automatischen Färbung jeder TMA genau gleich, das heißt standardisiert, behandelt worden ist. Um solche Abweichungen zu vermeiden, wäre es ratsam, eine Messreihe aus bspw. fünf bis zehn TMAs pro Block anzufertigen, die jeweils in eigenen Färbesitzungen verarbeitet werden, und den Mittelwert daraus zu berechnen. So wäre die Standardisierung aufgrund der Verwendung des gleichen Protokolls und der gleichen Materialien gewährleistet und das *Handling* wäre jeweils auf wenige TMAs pro Sitzung beschränkt, so dass sich die Inkubationszeiten nicht aufgrund der Handhabung unterscheiden. Ein anderer Grund, mehrere TMAs als nur jeweils zwei zur Mittelwertbildung zu verwenden, besteht darin, dass die Expressionsdichte nicht

an jeder Stelle des Tumors gleich sein muss. Außerdem kann man an der Färbung von normaler Mundschleimhaut in Abbildung A2 A des Anhangs sehen, dass die Expression von RB1 insbesondere in basalen und suprabasalen Epithelschichten stark ist. Je nach Anschnitt könnten daher möglicherweise Abweichungen bestehen. Die Kritik an der hier verwendeten Methode liegt also in der zu geringen Anzahl der zur Mittelwertbildung verwendeten Tumorproben pro Patient. Da für die anderen Proteine allerdings ebenfalls nur je zwei Proben verwendet wurden, wurde für RB1 genauso verfahren. Wenn bei der automatischen Färbung zwar weniger Varianz aufgrund des Prozesses besteht, so gilt hier ebenso die Einschränkung, dass die Proteinexpression nicht an jeder Stelle des Tumors gleich sein muss.

Auch der Trennwert sollte an mehreren Proben im Sinne einer Messreihe ermittelt werden, weil nur so die Varianz berücksichtigt werden kann, die bei Mehrfachmessungen zustande kommt. Das betrifft auch die Ermittlung des Trennwertes für die anderen Proteine, wobei hier Proben aus normaler Mundschleimhaut von jeweils zwei Patienten vorlagen. Eine Messreihe mit mehreren unabhängigen Proben wäre ratsam, ist aber möglicherweise nur schwer zu bekommen.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte in dieser Arbeit mittels der *Software* HALO® (IndicaLab, USA). Auch dieses folgt dem Ziel Standardisierung zu steigern. Die *Software* wird trainiert, in der Tumorregion, die man zuvor klassifiziert hat, immunreaktive Kerne zu detektieren und letztlich zu zählen. Der Vorteil ist, dass man nicht schätzen muss, wie viele Zellkerne immunreaktiv sind, sondern dass die Auswertung objektiv und vor allem quantitativ erfolgt. Den *Cut-off*-Wert auf diese Weise zu ermitteln, setzt jedoch die Vergleichbarkeit zu Studien herab, in denen die Bewertung des Expressionsmusters nicht aufgrund eines bestimmten quantitativ ermittelten Trennwertes beruht, sondern aufgrund einer subjektiven Schätzung. Letztere führt zu viel breiteren Rängen von starker Färbung, die nicht scharf voneinander getrennt sind. Wenn der Trennwert bei 75% immunreaktiver Kerne liegt, dann gilt bspw. 73% bereits als Expressionsverlust, zumindest wenn man wie in der vorliegenden Arbeit keine Varianz bei der Ermittlung des Trennwertes berücksichtigt. Bei der subjektiven Einschätzung würde man das als gleiche Expression wahrnehmen, weil der Mensch nicht so genau schätzen kann. Die softwaregestützte Auswertung

erfolgt daher sehr viel sensitiver als die qualitative und außerdem gemäß eines scharfen Trennwertes. Dieses kann die höhere Zahl an Tumoren mit RB1-Expressionsverlust zusätzlich erklären.

Zusammenfassend ergeben sich daraus wichtige Empfehlungen für zukünftige Arbeiten: der Trennwert für einen Expressionsverlust von RB1 sollte besser *Software*-gestützt nach Auswertung mehrerer Referenzschnitte im Sinne einer Messreihe an normaler Oropharynxschleimhaut auf Grundlage des sich daraus ergebenden Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgen, damit diese sehr sensitive Methode zur Ermittlung des Expressionsverlusts nicht zu einer Falschklassifikation führt. Dieses gilt selbstverständlich nicht nur für RB1, sondern auch für die anderen hier untersuchten Proteine. Außerdem sollten die Tumorproben im Rahmen von Mehrfachmessungen unter Mittelwertbildung mit Berücksichtigung einer Streuung bewertet werden.

Um zu ermitteln, welche der beiden hier ermittelten Färbeergebnisse für RB1 die Falschmessung darstellt, hätten weitere TMAs immunhistochemisch gefärbt werden müssen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Damit die explorative Frage nach potentiellen Assoziationen mit Parametern des Krankheitsverlaufes für eine verminderte RB1-Expression auf Grundlage der für diese Arbeit erhobenen klinischen Daten nicht aufgegeben werden muss, wird vorgeschlagen, im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit weitere TMAs gemäß des vorliegenden Protokolls und mithilfe des hier verwendeten Antikörpers (s. Kap. 3.1) immunhistochemisch zu färben. Auf diese Weise wird die mutmaßlich aufgetretene Falschmessung erkennbar und die Mittelwertbildung findet aufgrund validerer Daten statt.

Eine weitere Limitation besteht in der Unvollständigkeit der Daten. Diese beruht meist darauf, dass Patienten nicht konsistent in der Nachsorge sind. Diese findet oftmals in verschiedenen Krankenhäusern statt und nicht immer zentral in der HNO-Ambulanz der Unimedizin Mainz. Das betrifft auch die nachbeobachtende Bildgebung. Es wurde darauf verzichtet, diese Patienten zu zensieren, wenn sie nochmals in irgendeiner Abteilung der Uniklinik Mainz als lebend oder als dort verstorben registriert wurden. Nichtsdestotrotz könnten bspw. Krankheitsprogressen auf diese Weise nicht registriert

worden sein, insbesondere wenn keine weitere Bildgebung an der Uniklinik Mainz erfolgt ist und auch kein Arztbrief des nachbeobachtenden Krankenhauses vorlag. Die Entscheidung so zu verfahren, lag in der ohnehin schon sehr reduzierten Patientenzahl begründet. Darin besteht eine wesentliche Schwäche von retrospektiven Studien im Vergleich zu prospektiven Studien: die erforderlichen Daten sind nicht im Vorfeld definiert und dem Versuchsprotokoll folgend gezielt und an derselben Stelle erhoben. Dies hat ein höheres Maß an Unvollständigkeit und Informationsverlust zur Folge.

In Bezug auf die Erfassung des Krankheitsverlaufes bestand die Schwierigkeit retrospektiv nur schwer zwischen Lokalrezidiven und Zweittumoren am Ort des Primarius unterscheiden zu können, wenn der Zeitraum bis zum Auftreten weniger als 5 Jahre betrug. Es wurden zwar zur Ermittlung der genauen Lokalisation jeweils die OP-Berichte der Patienten gesichtet, ob aber ein Abstand von zwei Zentimetern zum Primarius bestand, lässt sich retrospektiv meist nicht sicher sagen. Falschklassifikationen in der Auswertung des Krankheitsverlaufes sind daher nicht auszuschließen.

Die Eintragungen in die Datentabelle, auf deren Grundlage die statistische Auswertung stattfand, erfolgte in Bezug auf einige Variablen händisch. Das betrifft auch die Translation der Farbeergebnisse in binominale Variablen. Trotz höchster Sorgfalt und Selbstkontrolle können Übertragungsfehler nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Bezüglich einiger Variablen bestand keine einheitliche Definition dessen, was sie beinhalten. Ein hoher Alkoholkonsum bspw. ist nicht in Dauer und Intensität spezifiziert, sondern entspricht subjektiven Angaben von Patienten, Anästhesisten und teilweise auch den Datenerfassenden, weil an der Erhebung der Daten mehrere Doktoranden beteiligt waren. Darüber hinaus besteht ein hohes Maß an Informationsverlust, weil für die vorliegende Studie aufgrund der geringen Fallzahl einige Kategorien von Variablen zusammengefasst worden sind. Ansonsten wären Kategorien zu schwach besetzt gewesen, um Tests durchzuführen. In Bezug auf den Raucherstatus bspw. werden lediglich Raucher und Nicht-Raucher unterschieden, wobei jedoch die Gruppe der Raucher alle *Pack-Year* Kategorien enthält. Es ist offensichtlich, dass Patienten mit weniger als 10 *Pack Years* nicht ohne Weiteres vergleichbar sind mit Patienten, die bspw. 50 *Pack Years* oder mehr haben. Das T-

sowie auch das N-Stadium sind weitere Beispiele dafür, dass Kategorien zusammengefasst wurden, um statistische Tests durchführen zu können. Dies mag ein Grund dafür sein, dass keine Assoziationen gemessen an Cramers V mit positivem p16^{INK4a}-Status und fortgeschrittenem N-Stadium ermittelt worden sind. Dies ist zudem ein weiterer Aspekt, der die Vergleichbarkeit zu den Referenzstudien herabsetzt: in der vorliegenden Arbeit wurden Effektstärkemaße zur Beschreibung von Assoziationen verwendet, weil diese unabhängig von der Stichprobengröße sind. In anderen Studien hingegen wurden aufgrund größerer Stichproben die Ergebnisse von Signifikanztests zum Vergleich verwendet.

Eine weitere Limitation besteht darin, dass die Effekte der Therapien, die die Patienten erhalten haben, nicht berücksichtigt worden sind, insbesondere in den Überlebenszeitanalysen. Demnach haben diese auch keinen Eingang in die multivariaten Analysen gefunden, so dass die gemessenen *Hazard Ratios* nicht durch die Effekte der Therapien bereinigt sind.

Abschließend sei nochmals darauf hingewiesen, dass der HPV-Status in der vorliegenden Studie allein mittels p16^{INK4a}-Immunhistochemie ermittelt wurde. Wie bereits in Kap. 2.4 dargestellt, besteht für dieses Verfahren die Gefahr der Falschklassifikation von Tumoren insbesondere für den Fall, dass p16^{INK4a} nicht HPV-assoziiert überexprimiert ist. Der bereits zitierte systematische Review von Jouhi et al. ermittelte eine mediane Sensitivität von 95,4% und eine mediane Spezifität von 87,3% für einen positiven p16^{INK4a}-Expressionsstatus als Surrogatmarker für eine HPV-Beteiligung (9). Ein zusätzlicher molekularpathologischer Nachweis bspw. der viralen DNA, RNA oder der Virusproteine E6 und E7 ist für Studiendesigns dieser Art wünschenswert.

5.9 Schlussfolgerung

Der Vergleich von Studien, die Assoziationen der Zellzyklusproteine mit Parametern des Krankheitsverlaufes untersuchen, wird durch eine fehlende Standardisierung, insbesondere bezüglich der Trennwerte, des Auswertungsverfahrens (quantitativ vs. qualitativ) sowie der angewandten Antikörper und Protokolle erschwert. Nachdem die Stichproben der vorliegenden Arbeit vergleichsweise sehr klein sind, können RB1, p53

und Cyclin-D1 als zusätzliche Prognosemarker zu p16^{INK4a} nicht ausgeschlossen werden. Die vorliegende Studie zeigt die Cyclin-D1-Überexpression als zusätzlichen möglichen unabhängigen Prädiktor in Bezug auf das Gesamtüberleben. Die Analyse des Krankheitsverlaufes zeigt, dass in p16^{INK4a}-negativen Tumoren insbesondere loko-regionäre Rezidive dominieren und eine p53- sowie Cyclin-D1-Überexpression insbesondere mit einer höheren Inzidenz von Zweittumoren assoziiert ist. Aufgrund der unter 5.8 beschriebenen Limitationen der vorliegenden Studie können diese Ergebnisse nicht unmittelbar für Empfehlungen bezüglich Nachsorgeprotokolle genutzt werden. Hierfür wäre die Auswertung größerer Stichproben erforderlich.

Die Verwendung von p16^{INK4a} zur Differenzierung von Fernmetastasen und Zweittumoren zeigte sich auch in dieser Studie geeignet, da p16^{INK4a} in allen Progressen den gleichen Expressionsstatus wie im Primarius zeigte. Da jedoch in der Studie von Laborde et al. in zwei von 17 Fällen der p16^{INK4a}-Status in den Metastasen von dem des Primarius abwich (73), wird dennoch ein zusätzlicher molekularpathologischer Nachweis des HPV-Status empfohlen.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Oropharynx zeigen bei Überexpression von p16^{INK4a} eine vergleichsweise günstige Prognose (2). Diese Arbeit versucht aufgrund einer Charakterisierung des Krankheitsverlaufes die günstige Prognose genauer zu beschreiben im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen Oropharynx-Karzinomen. Weitere Zellzyklusproteine, die in der Forschung im Zusammenhang mit Oropharynx-Karzinomen untersucht und für die bestimmte Expressionsmuster in HPV- positiven vs. Noxen-assoziierten Tumoren beschrieben wurden, sind u. a. RB1, p53 und Cyclin-D1. Die Beschreibung des Krankheitsverlaufes schließt demnach ihre Expressionsmuster mit ein. Hierzu wurden in primären Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx die Proteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 immunhistochemisch gefärbt und mit den klinischen Daten zum Krankheitsverlauf in Beziehung gebracht.

In Bezug auf die Tumorcharakteristika stratifiziert nach dem Expressionsstatus der Proteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 zeigte sich eine starke Assoziation zwischen Cyclin-D1-Überexpression und einem negativen p16^{INK4a}-Status ($V=0,525$, $p<0,001$). Auch in der Tumorlokalisierung ließen sich Unterschiede nachweisen. In der p16^{INK4a}-positiven Gruppe waren die Tumoren häufiger in den Gaumentonsillen und in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe häufiger am Weichgaumen / an der Uvula oder in der Zungengrundregion lokalisiert ($p=0,002$, $V=0,444$).

Daraufhin wurde der Krankheitsverlauf stratifiziert nach der Expression der Proteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 betrachtet. Eine starke Assoziation ($V=0,565$) besteht zwischen einem p16^{INK4a}-negativen Expressionsstatus und loko-regionären Rezidiven, die häufig den ersten Progress in dieser Gruppe darstellen. Eine p-53-Überexpression ist stark mit Zweittumoren als ersten Progress assoziiert ($V=0,641$). Diese Assoziationen bestehen nur in Bezug auf den ersten Progress. Bei der Testung potenzieller Korrelationen aller im Verlauf der jeweiligen Erkrankung entstandenen Progressen mit den Expressionsmustern der Proteine ergaben sich keine Assoziationen.

Abschließend wurde eine Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach der Expression der Proteine p16^{INK4a}, RB1, p53 und Cyclin-D1 durchgeführt. Statistisch auffällige Unterschiede im Gesamtüberleben sind für p16^{INK4a} ($p=0,022$) und Cyclin-D1

($p=0,025$) zu berichten. In den multivariaten Cox-Regressionen zeigte sich ein protektiver Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status (HR 0,387, $p=0,042$, 95%-KI 0,156–0,965 bis 0,328, $p=0,026$, 95%-KI 0,123–0,876) und eine erhöhte Mortalitätsrate für eine Überexpression von Cyclin-D1 (HR 2,374, $p=0,071$, 95%-KI 0,929–6,063 bis 3,453, $p=0,063$, 95%-KI 0,935–12,745). P53 und RB1 zeigten keinen Unterschied oder Effekt auf das Gesamtüberleben.

Bei Patienten mit p16^{INK4a}-positiven Tumoren traten die Progresse statistisch auffällig später auf ($>$ Beobachtungszeitraum vs. 23 Monate, 95%-KI 9,174–36,826, $p = 0,008$). In der p16^{INK4a}-positiven Gruppe hatten lediglich sieben von 26 Patienten einen Progress, während in der p16^{INK4a}-negativen Gruppe 30 von 51 Patienten einen Progress hatten. In den bivariaten Cox-Regressionen zeigte sich ein protektiver Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status auf die Progressrate (HR 0,188, $p=0,011$, 95%-CI 0,052–0,685, bis HR 0,383, $p=0,029$, 95%-KI 0,162–0,905).

Als Nebenbefund ergab sich, dass allein für p16^{INK4a} in allen Fällen, in denen sowohl Biopsien aus dem Primarius als auch aus Progressen (Lokalrezidive, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen) vorlagen, eine Übereinstimmung im p16^{INK4a}-Status zwischen Primarius und Progressen festgestellt werden (27/27, 100%) konnte. Für die anderen Zellzyklusproteine war das nicht der Fall.

Somit kann diese Studie die protektiven Effekte eines positiven p16^{INK4a}-Status auf das Gesamtüberleben bestätigen sowie ein späteres Auftreten und eine geringere Rate von Krankheitsprogressen im Sinne von Fernmetastasen, loko-regionären Rezidiven und Zweitumoren aufzeigen im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen OPSCC. Die Anzahl der p16^{INK4a}-positiven Fälle, in denen Progresse auftraten, sind in dieser Studie zu gering, als dass ein spezifisches Progress-Muster beschrieben werden könnte. Im Hinblick auf die Überlebenszeit nach dem ersten Progress war kein protektiver Effekt eines positiven p16^{INK4a}-Status mehr nachweisbar. Darüber hinaus stellte sich in den multivariaten Analysen eine erhöhte Mortalitätsrate für Patienten mit Tumoren, in denen Cyclin-D1 überexprimiert war, heraus. Damit könnte eine Cyclin-D1-Überexpression mit einem schlechteren Outcome assoziiert sein.

7 Anhang

7.1 Abbildungen

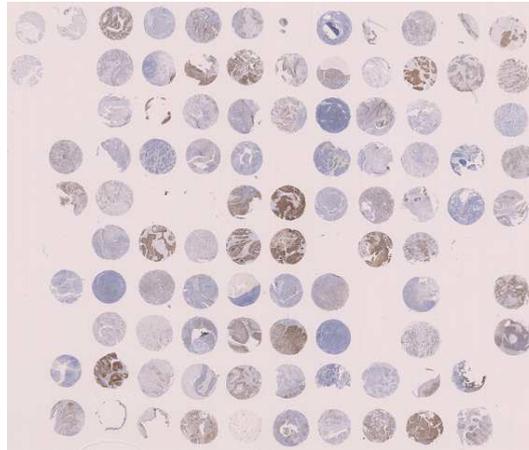


Abbildung A1: Beispiel eines Tissue-Microarray (TMA)

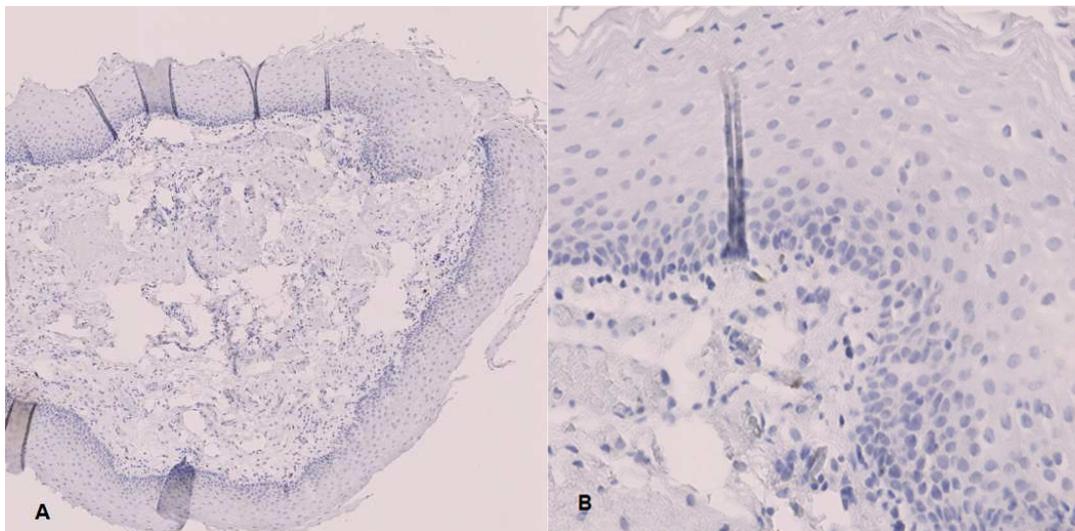


Abb. A2 A und B: p16^{INK4a}-Immunhistochemie – p16^{INK4a}-Expression in gesunder Mundschleimhaut in 5- und 20-facher Vergrößerung.

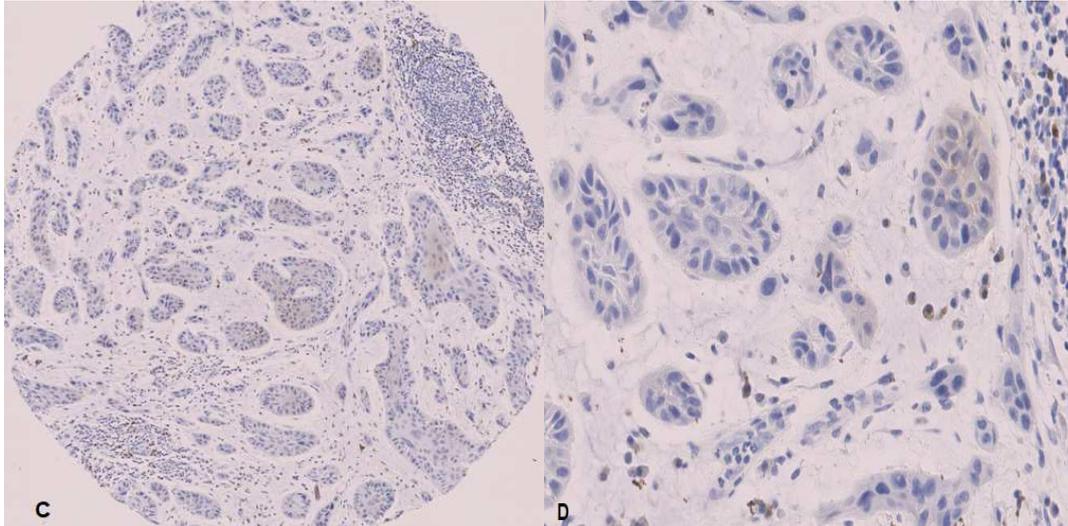


Abb. A2 C und D: p16^{INK4a}-Immunhistochemie – p16^{INK4a}-negatives Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) in 5- und 20-facher Vergrößerung

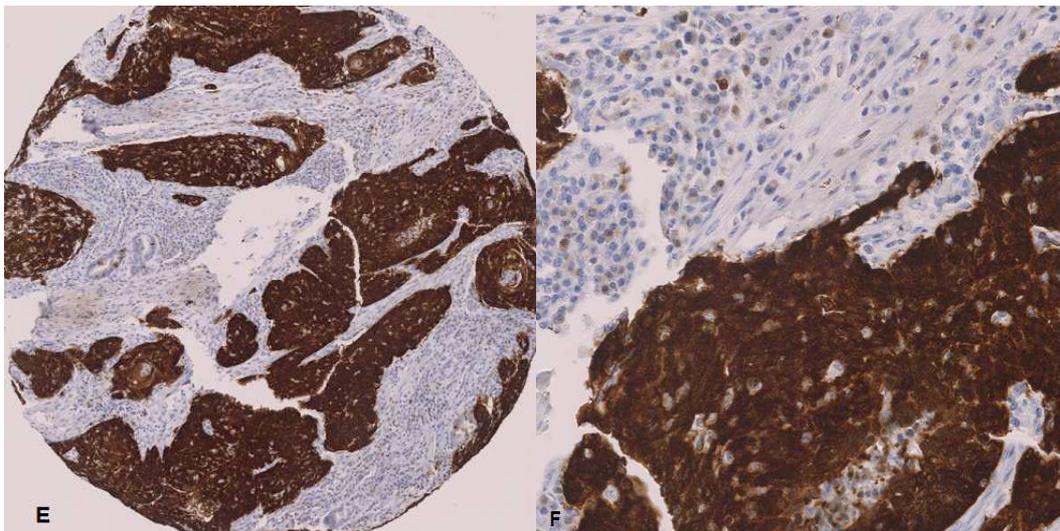


Abb. A2 E und F: p16^{INK4a}-Immunhistochemie – nukleär und zytoplasmatisch stark p16^{INK4a}-immunreaktiver Tumor in 5- und 20-facher Vergrößerung

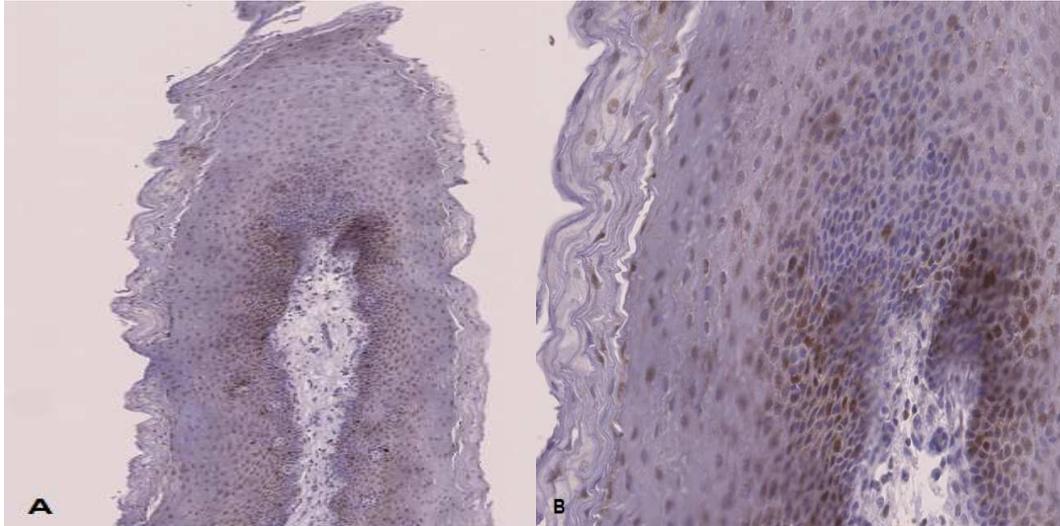


Abb. A3 A und B: RB1-Immunhistochemie – normale Mundschleimhaut in 5- und 20-facher Vergrößerung

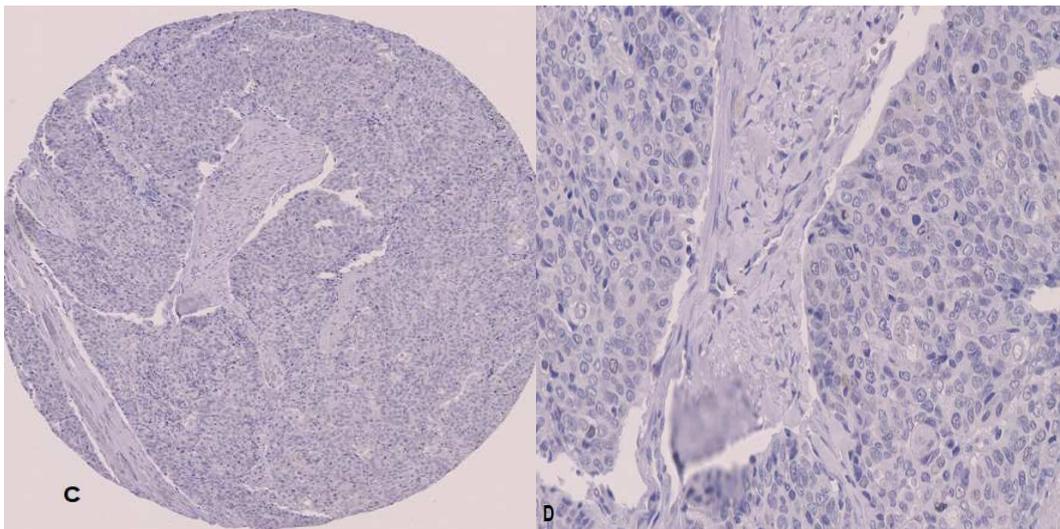


Abb. A3 C und D: RB1-Immunhistochemie – Tumor mit RB1-Expressionsverlust in 5- und 20-facher Vergrößerung

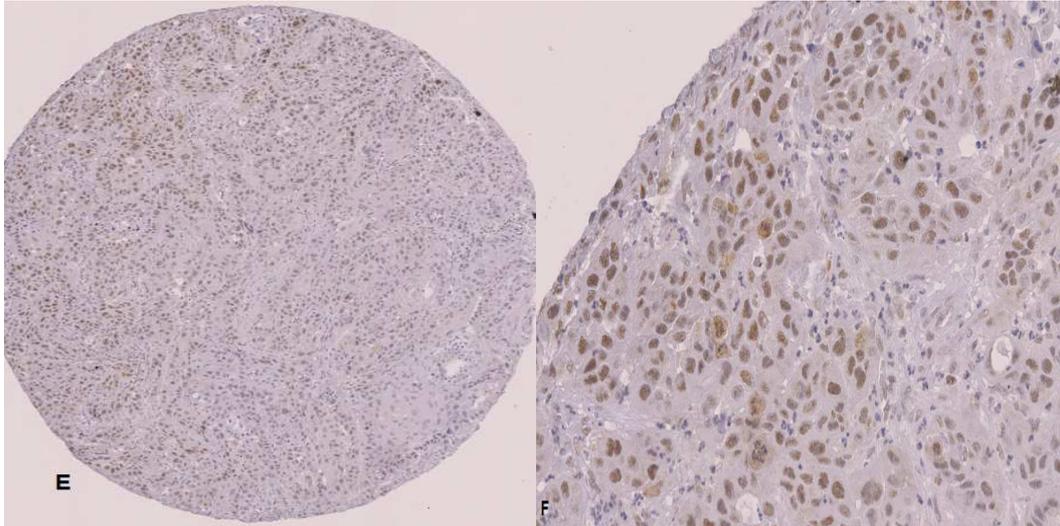


Abb. A3 E und F: RB1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit normaler RB1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung

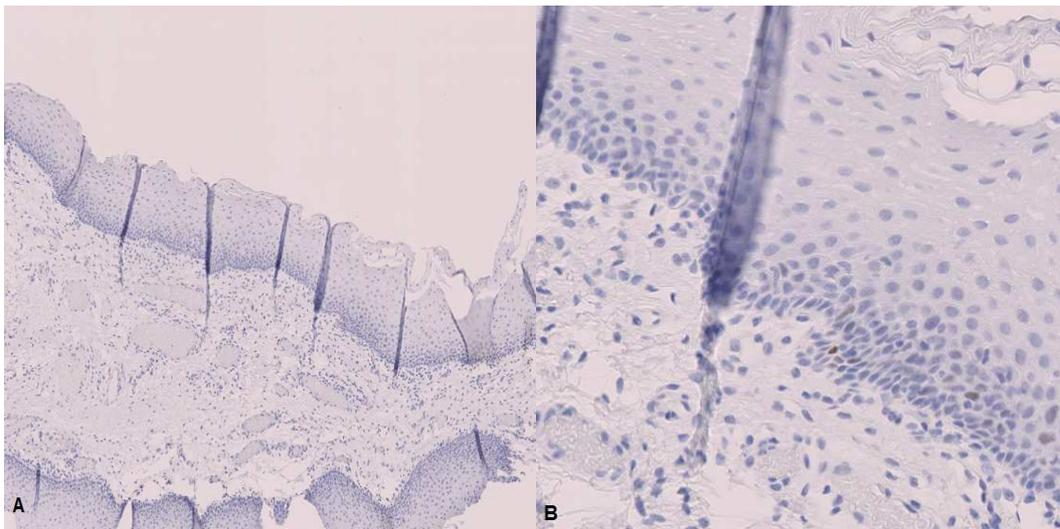


Abb. A4 A und B: p53-Immunhistochemie – Ausschnitte von gesunder Mundschleimhaut in 5-facher und 20-facher Vergrößerung

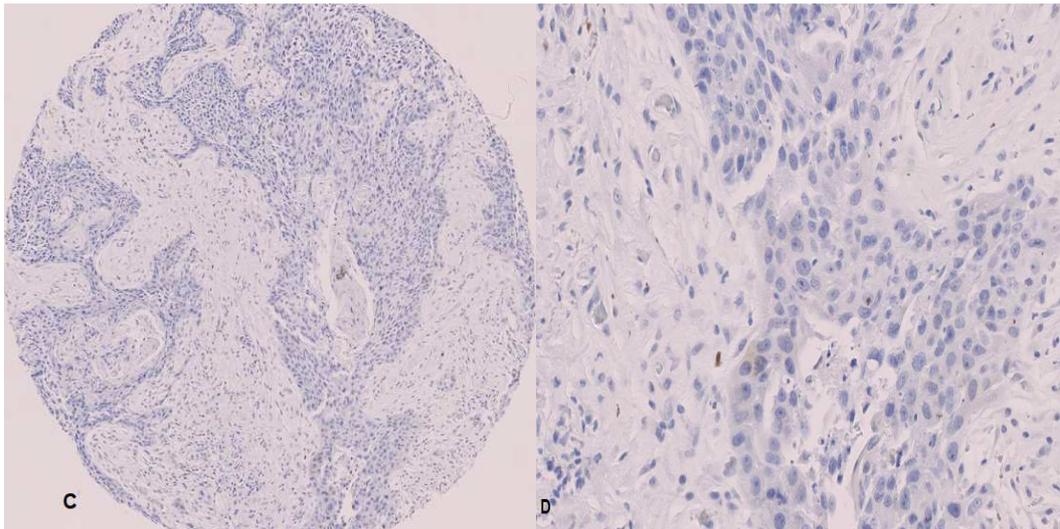


Abb. A4 C und D: p53-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) OPSCC mit normaler p53-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung

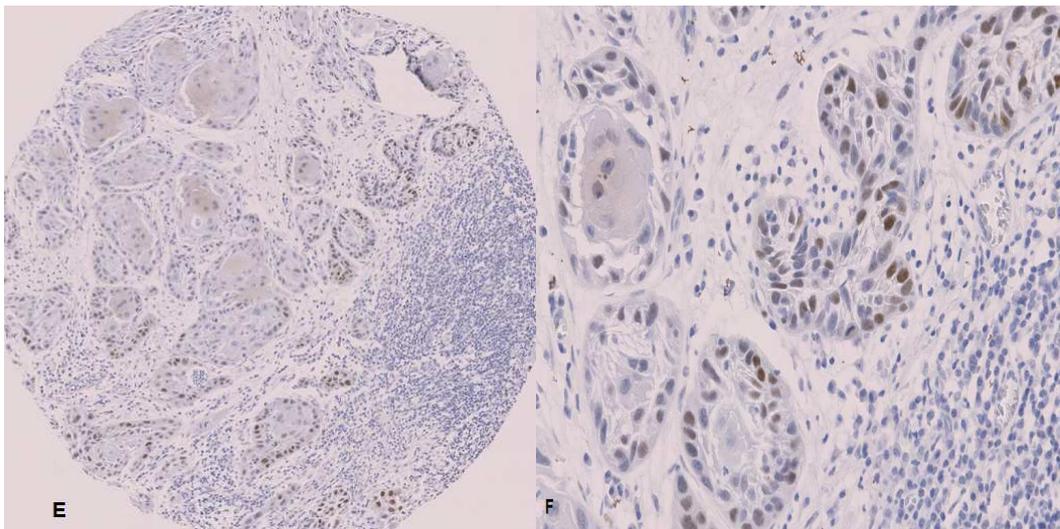


Abb. A4 E und F: p53-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit p53-Überexpression in 5-facher und 20-facher Vergrößerung

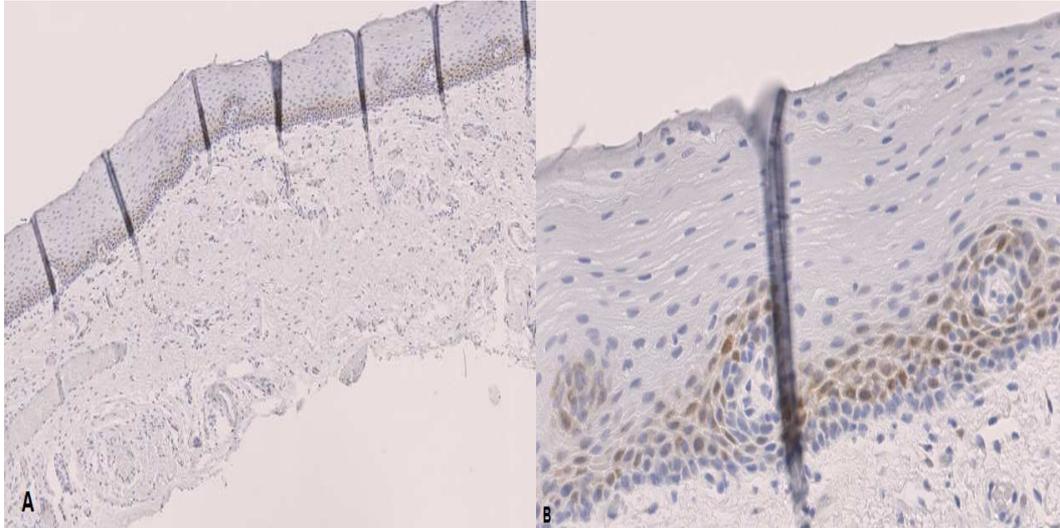


Abb. A5 A und B: Cyclin-D1-Immunhistochemie – suprabasale Cyclin-D1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung in gesunder Mundschleimhaut

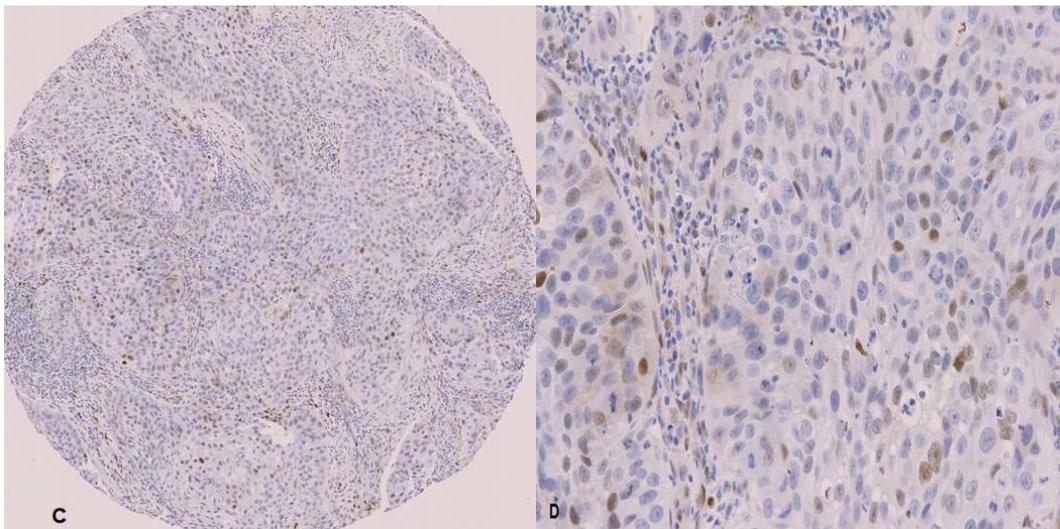


Abb. A5 C und D: Cyclin-D1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit normaler Cyclin-D1-Expression in 5- und 20-facher Vergrößerung

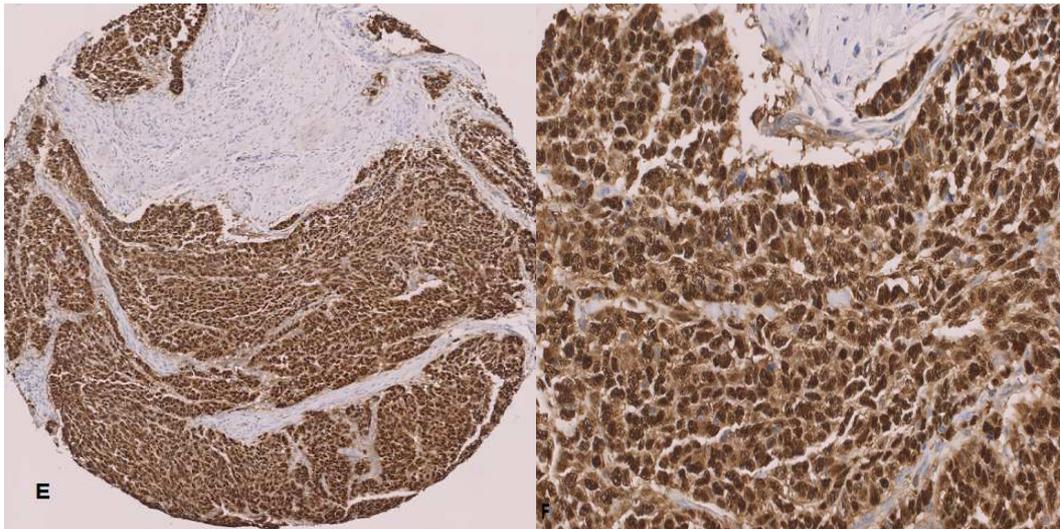


Abb. A5 E und F: Cyclin-D1-Immunhistochemie – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (OPSCC) mit Cyclin-D1-Überexpression in 5- und 20-facher Vergrößerung

7.2 Datentabellen

Tabelle 41: Patienten- und Tumoreigenschaften (Teil 1)

Geschlecht: 1 = weiblich, 2 = männlich; verstorben: 1 = ja, 2 = nein; Altersgruppe: 1 ≤ 58 Jahre, 2 ≥ 59 Jahre; initialer Body-Mass-Index (BMI): 1 ≤ 24,88 kg/m², 2 ≥ 24,9 kg/m²

Fall	Geschlecht	verstorben	letzter Kontakt	Alter ED	bei Altersgruppe	initialer BMI	BMI-Gruppe
1	1	2	09.08.2018	77	2	35,16	2
2	2	1	27.12.2010	64	2	20,86	1
3	2		14.04.2016	66	2	24,92	2
4	1	1	03.01.2013	62	2	24,91	2
5	2	1	13.07.2010	57	1	27,45	2
6	1		21.03.2013	52	1	20,2	1
7	2		30.07.2013	61	2	25,17	2
8	1	2	17.06.2019	61	2	23,01	1
9	1	2	05.07.2019	46	1	25,35	2
10	1	2	09.07.2018	54	1	30,47	2
11	2	1	13.06.2012	59	2	27,04	2
12	2	2	24.09.2018	57	1	28,08	2
13	2	2	06.08.2018	48	1	26,83	2
14	2		15.03.2010	56	1	27,46	2
15	1	2	13.05.2019	44	1	29,38	2
16	2	2	08.04.2019	55	1	23,31	1
17	2	1	23.05.2012	49	1	23,53	1
18	2		20.03.2017	59	2	17,31	1

19	2	2	21.03.2016	54	1	32,49	2
20	1		31.03.2019	54	1	21,91	1
21	2	2	13.02.2017	54	1	28,07	2
22	2		24.07.2016	62	2	34,94	2
23	2	1	09.05.2013	54	1	27,17	2
24	2	1	23.08.2010	56	1	14,86	1
25	2	1	19.03.2013	69	2	28,72	2
26	1		29.09.2014	48	1	19,14	1
27	2		23.05.2008	47	1	22,04	1
28	2		16.08.2010	52	1	24,21	1
29	1	2	05.02.2018	65	2	20,28	1
30	2		28.06.2009	63	2	22,72	1
31	2	1	20.11.2010	58	1	31,92	2
32	1	2	16.04.2019	68	2	29,3	2
33	2	1	20.02.2013	60	2	23,04	1
34	1	1		47	1	18,07	1
35	2	2	16.04.2018	62	2	31,83	2
36	2		22.09.2011	64	2	24,21	1
37	1	2	16.07.2018	53	1	26,81	2
38	2	1	20.11.2012	66	2	25,83	2
39	2	1	26.08.2010	67	2	41,04	2
40	2	1	21.11.2011	56	1	17,03	1
41	2	2	05.06.2019	50	1	27,47	2
42	2		09.01.2009	50	1	20,02	1
43	2		29.07.2011	54	1	20,01	1
44	2		21.08.2013	57	1	25,56	2
45	2	2	23.12.2018	58	1	24,21	1
46	1	1	06.05.2012	78	2	22,66	1
47	2	2	27.05.2019	75	2	31,02	2
48	1	2	03.10.2016	56	1	30,42	2
49	2		22.05.2012	69	2	25,93	2
50	1	1	07.12.2012	66	2	19,33	1
51	2	2	13.08.2018	69	2	22,84	1
52	2	1	22.07.2013	65	2	39,79	2
53	2	1	22.10.2012	58	1	21,8	1
54	2	1	02.12.2011	61	2	24,78	1
55	1	2	14.05.2018	63	2	26,17	2
56	1	1	26.10.2010	68	2	28,6	2
57	2	2	15.05.2019	70	2	24,86	1
58	1	1	08.07.2011	49	1	23,05	1
59	1	1	08.01.2013	56	1	20,2	1
60	2	1	10.03.2011	61	2	26,3	2
61	2		22.06.2011	59	2	37,04	2
62	2		25.02.2011	70	2	23,39	1
63	2		29.08.2012	64	2	32,6	2
64	2	1	26.02.2013	71	2	25,86	2
65	2	1	12.04.2012	47	1	19,62	1

66	2	2	10.09.2018	55	1	26,93	2
67	2		12.12.2017	65	2	27,17	2
68	2	2	01.07.2019	57	1	25,83	2
69	1	2	24.09.2018	52	1	17,58	1
70	1	1	01.03.2012	64	2	16,87	1
71	2	2	02.01.2017	49	1	24,54	1
72	2	1	09.03.2011	63	2	26,42	2
73	2		31.12.2012	62	2	23,15	1
74	1		10.06.2009	55	1	17,92	1
75	2		20.10.2014	58	1	25,68	2
77	1	1	21.12.2011	88	2	21,63	1
78	1	1	01.04.2011	58	1	20,81	1
79	2	2	01.10.2018	52	1	23,67	1
80	2	1	18.11.2011	46	1	21,29	1
81	2		02.09.2010	48	1	18,31	1
82	1	2	06.02.2017	62	2	21,79	1
83	2		27.11.2017	67	2	26,24	2
84	1	2	23.05.2019	49	1	29,39	2
85	2	1	27.02.2015	58	1	24,34	1
86	1	1	18.02.2011	59	2	22,19	1
87	2	1	06.01.2015	61	2	32,89	2

Tabelle 42: Patienten- und Tumoreigenschaften (Teil 2)

Alkoholkonsum: 1 = mäßig, 2 = hoch; Leberkrankung / Nierenerkrankung / Diabetes mellitus: 1 = ja, 2 = nein; T-Status: 1 = T1–2, 2 = T3–4; N-Status: 1 = N0, 2 = N1–N2a, 3 = N2b–N2c; Raucherstatus: 1 = positiv, 2 = negativ; Tumor bei Erstdiagnose: 1 = Primärtumor, 2 = CUP; Lokalisation: 1 = Oropharynx, 2 = Lymphknotenmetastase; Sublokalisierung: 1 = Weichgaumen/Uvula, 3 = Zungengrund/Vallecula/ling. Epiglottisfläche, 4 = Tonsilla palatina, 5 = andere (GTF = Glossotonsillarfurche, RHW = Rachenhinterwand, CUP = Cancer of unknown Primarius), ED = Erstdiagnose

Fall	Alkohol-Anamnese	Lebererkrankung	Nierenerkrankung	Diabetes mellitus	T-Status binär	N-Status binär	M	Raucherstatus	Tumor bei ED	Lokalisation bei ED	Sublokalisierung ED	bei
1	1		1	2	2	1	1 0	1	1	1	1	1
2	2		2	2	2		1 0	1	1	1		3
3	1		2	2	2	1	3 0	2	1	1	1	3
4	1		2	2	2	2	1	2	1	1	1	3
5	2		2	2	2	1	3	1	1	1	1	3
6	1		2	2	2	1	3 0	1	1	1	1	3
7			2	2	2	1	2	1	1	1	1	4
8	2		2	2	2	1	3	1	1	1	1	1
9			2	2	2	1	1 0	2	1	1	1	4
10			2	2	2	1	1 0	1	1	1	1	1
11	2		1		1	2	3	1	1	1	1	4
12			2	2	2	1	2 0	1	1	1	1	4
13	1		2	2	2	2	1 0	1	1	1	1	4
14			2	2	2	1	2	1	1	1	1	1
15	1		2	2		1	3 0	2	1	1	1	3
16	1		1	2	2	2	3 0	1	1	1	1	3
17	2		1	2		1	1 0	1	1	1	1	4
18	2		2	2	2	2	3 0	1	1	1	1	4
19	1		2	2	2	2	3 0	1	1	1	1	4
20			2	2	2	2	3 0	1	1	1	1	4
21			2	2	2	1	1 0	1	1	1	1	5
22	2		2	2	2	1	1 0	1	1	1	1	4
23	2		2	2	2	2	3 1	1	1	1	1	3
24				2	2	2	3	1	1	1	1	1

25	1	2	2	1	1	3	1	1	1	1	3
26	2	2	2	1	1	2	0	1	1	1	4
27		2	1	2	2	3	0	1	1	1	1
28	2	2	2	2	1	1	0	1	1	1	1
29	1	2	2	2	2	2		1	1	1	3
30		2	2	2	1	1	0		1	1	3
31	2	2	1	2	2	3	0	2	1	1	4
32	1	2	2	2	2	1	0	1	1	1	1
33	2	2	2	2	1	2	0	1	1	1	3
34		2	2	2	2	3	1	1	1	1	4
35		2	2	2	1	1	0	1	1	1	1
36	2	2	2	2	1	3		1	1	1	4
37	1	2	2	2	1	3	0	1	1	1	4
38	1	2		1	1	3		2	2	2	5
39	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
40	2	2	2	2	1	3		1	1	1	5
41		2	2	2	2	3	0		1	1	3
42				1	1	3	0	1	1	1	3
43	2	2	2	2	1	1		1	1	1	1
44	1	2	2	2	1	2	0	2	1	1	4
45	2	2	2	1	1	2		2	1	1	4
46	1	2	2	2	1	3	0	1	1	1	3
47	1	2	2	2	2	1	0	1	1	1	4
48		2	2	2	1	3	0	1	2	2	5
49		2	1	2	1	1	0	1	1	1	1
50	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
51	1	2	2	2	1	3	0	2	1	1	4
52			2	1	1	3		1	1	1	4
53	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	4
54	1	2	1	2	1	1		1	1	1	4
55	1	2	2	2	1	3	0	1	1	1	4
56	2	2	1	1	2	1	0	1	1	1	3
57		2	2	1	2	1	0	1	1	1	3
58		2	2	2	1	2		1	1	1	4
59	2	2	2	2	2	3		1	1	1	3
60	2	1	2	2	1	2	0	1	1	1	5
61	2	2	2	2	2	3		1	1	1	3
62		2	2	2	1	1		1	1	1	4
63	2	2	1	1	1	3		1	1	1	4
64	2	2	2	2	1			1	1	1	5
65	2		2	2	2	3	0	1	1	1	5
66	1	2	2	2	1	3		2	1	1	4
67	2	2	2	2	1	2	0	1	1	1	4
68		2	2	2	1			1	1	1	5
69	1	2	2	2	1			1	1	1	1
70	2	1	2	2	2	3		1	1	1	1
71	1	2	2	2	1	2		1	1	1	3
72	2	2	2	2	2	2	0	1	1	1	3
73		2	2	2	1	1		1	1	1	1
74	2	2	2	2	1	1		1	1	1	1
75	2	1	2	2	1	1		1	1	1	1
77	1	2	2	2	1	3		1	1	1	3
78	2	1	2	2	1	3	1	1	1	1	4
79	1	2	2	2	1	2	0	1	1	1	1
80		2	2	2	2	3	0	1	1	1	3
81	2	1	2	2	2	3		1	1	1	4
82	1	2	2	2	1	3	0	1	1	1	3
83		2	2	2	1	1	0	1	1	1	1
84	2	1	1	2	1	3	0	1	1	1	3
85	2	2	2	2	1			1	1	1	4
86		2	2	2	2			1	1	1	3
87	2	1	2	1	2	1	0	1	1	1	1

Tabelle 43: Färbeergebnisse p16INK4a

p16^{INK4a}: 1 = positiv, 2 = negativ, binäre Variablen: 1 = ja, 2 = nein; Prog1–Prog5 = Progress 1 bis Progress 5; N-Stadium = p^{16INK4a} – Status in regionalen Lymphknotenmetastasen bei initial positivem Nodalstatus, 1 = positiv, 2 = negativ.

Fall	p16 ^{INK4a} - Status_	Primarius	N-Stadium	Prog1	Prog2	Prog3	Prog4	Prog5
1	2	2						
2	2					2		
3	1	1						
4	1			1				
5	2			2				
6	2	2	2					
7	2		2					
8	2	2	2					
9	1	1						
10	1	1						
11	2	2						
12	1	1	1					
13	1	1						
14	2	2	2					
15	1		1					
16	2			2	2		2	
17	2	2						
18	2	2						
19	1	1	1					
20	2	2	2					
21	2	2						
22	2	2						
23	2		2	2				
24	2	2	2					
25	2			2				
26	2				2			
27	2	2						
28	2	2						
29	2	2						
30	2	2						
31	1			1	1			
32	2	2						
33	2			2				
34	2		2					
35	2	2						
36	1	1	1					
37	1	1	1					
38	1	1		1		1	1	1
39	2	2						
40	2	2	2					
41	2		2					
42	2	2	2					
43	2	2		2				
44	1	1						
45	1	1						
46	2	2		2				
47	1				1			
48	1	1						
49	2	2						
50	2	2		2				
51	1	1	1					
52	2		2					
53	1	1				1		
54	1	1			1			1
55	1	1	1					
56	2	2						
57	1	1						
58	1	1	1					
59	2		2		2			
60	2	2	2					
61	2		2					
62	2	2						
63	2		2					
64	2	2						
65	2	2						
66	1	1	1					
67	1	1	1					
68	2	2						
69	1	1						
70	2	2	2	2				
71	1		1					
72								
73	2	2						
74	2	2						
75	2	2						

77				
78				
79	2			2
80				
81				
82	2			
83		2		
84				
85				
86	2			
87		2		

Tabelle 44: Färbeergebnisse – RB1 (Teil 2)

RB1: 1 = Expressionsverlust, 2= normale Expression; binäre Variablen: 1 = ja, 2 = nein; Prog1–Prog5 = Progress 1 bis Progress 5; N-Stadium = gemeint ist hier Expressionsverlust bei initial positivem Nodalstatus, 1 = ja, 2 = nein.

Fall	Primarius	N-Stadium	Prog1	Prog2	Prog3	Prog4	Prog5
1	1						
2					1		
3							
4			1	1			
5			1				
6	1	1					
7		1					
8		2					
9							
10							
11	1						
12	1	2					
13	2						
14	1	1					
15		1					
16			1	1		2	
17			1				
18	1						
19	1	1					
20		1					
21	2						
22	1						
23		1	1				
24	1	1					
25			1				
26				1			
27							
28	1						
29		1					
30	1						
31			1	1			
32	1						
33			1				
34		1					
35	2						
36	1	1					
37	1	1					
38	1		2	2	1	2	1
39	1						
40	1	1					
41		1					
42	2	2					
43	1						
44	1						
45	2						
46	2		2				
47				1			

48	1						
49	1						
50	1		1				
51	1	1					
52		1					
53					1		
54	1		2	1			1
55	1	1					
56	1						
57	1						
58	2	2					
59		1		1			
60	1	1					
61		1					
62	1						
63		1					
64	1						
65	2						
66	2	1					
67	1	1					
68	2						
69							
70	1	1	1				
71	2	1					
72							
73	1						
74	1						
75	1						
77							
78							
79	1						
80			1				
81							
82							
83	1						
84							
85							
86							
87	1						

Tabelle 45: Färbeergebnisse – p53 (Teil 3)

p53: 1 = Überexpression, 2 = normale Expression; binäre Variablen: 1 = ja, 2 = nein; Prog1–Prog5 = Progress 1 bis Progress 5; N-Stadium = gemeint ist hier Überexpression bei initial positivem Nodalstatus, 1 = ja, 2 = nein.

Fall	Primarius	N-Stadium	Prog1	Prog2	Prog3	Prog4	Prog5
1	1						
2					1		
3	2						
4			2				
5			1				
6	1	1					
7		2					
8	1	2					
9							
10	1						
11	1						
12	1	2					
13	1						
14	1	1					
15		2					
16			1	1		1	
17			2				
18							
19	2	2					
20	2	2					
21	2						
22	2						

23		1	1					
24	2	1						
25			1					
26					2			
27	1							
28	1							
29		1						
30	1							
31			2		2			
32	1							
33			2					
34		2						
35	1							
36	2	1						
37	2	2						
38	2		2		2	2	1	
39	1							
40	1	1						
41		2						
42	1	1						
43	2	1						
44	2							
45	2							
46	1		1					
47					1			
48	2							
49	1							
50	1		2					
51	1	1						
52		1						
53						2		
54	2				2			2
55	1	2						
56	2							
57	1							
58	1	2						
59		2			2			
60	1							
61		1						
62	1							
63		2						
64	1							
65	1							
66		2						
67	2	2						
68	1							
69	1							
70	2		2					
71		2						
72								
73	2							
74	1							
75	1							
77								
78								
79	1							
80								
81								
82								
83	1							
84								
85								
86								
87	1							

Tabelle 46: Färbeergebnisse Cyclin-D1 (Teil 4)

Cyclin-D1: 1 = Überexpression, 2 = normale Expression; binäre Variablen: 1 = ja, 2 = nein; Prog1–Prog5 = Progress 1 bis Progress 5; N-Stadium = gemeint ist hier Überexpression bei initial positivem Nodalstatus, 1 = ja, 2 = nein.

Fall	Primarius	N-Stadium	Prog1	Prog2	Prog3	Prog4	Prog5
1	1						
2					2		
3	2						
4			2				
5			1				
6	1	1					
7		1					
8	1	2					
9							
10							
11	1						
12	2	2					
13	2						
14	1	2					
15		2					
16			1	1		2	
17			2				
18	2						
19	2	2					
20	1	1					
21	2						
22	2						
23		1	2				
24	2	1					
25			2				
26				1			
27	1						
28	1						
29		1					
30	1						
31			2	2			
32	2						
33			1				
34		1					
35	2						
36	2	2					
37	2	2					
38	2		2		2	2	2
39	2						
40	1	1					
41		1					
42	1	1					
43	1	2					
44	2						
45	2						
46	2		1				
47				2			
48	2						
49	1						
50	2		2				
51	2	2					
52	1	2					
53	2				2		
54	2			2			2
55	2	2					
56	1						
57	2						
58	2	2					
59		1		1			
60	1	1					
61		1					
62	1						
63		2					
64	1						
65	2						
66	2	2					
67	2	2					
68	2						
69	1						

70	1	1	1
71		2	
72	1		
73	1		
74	2		
75	2		
77	1		
78	1		
79	2		
80			
81			
82			
83	1		
84			
85			
86			
87	1		

Tabelle 47: Expressionskonsistenz in den Progressen (Teil 5)

1 = ja, 2 = nein, P/N-Konsistenz = Primarius zu Lymphknotenmetastase

Fall	RB1	p53	p16 ^{INK4a}	Cyclin-D1	P_N_Konsistenz_RB1	P_N_Konsistenz_p53	P_N_Konsistenz_p16 ^{INK4a}	P_N_Konsistenz_Cyclin-D1
1								
2								
3								
4	1							
5								
6	1	1	1		1	1	1	1
7								
8		2	1		2	2	1	2
9								
10								
11								
12	2	2	1		1	2	2	1
13								
14	1	1	1		2	1	1	2
15								
16	2	1	1		1			
17								
18								
19	1	1	1		1	1	1	1
20		1	1		1	1	1	1
21								
22								
23	1	1	1		2			
24	1	2	1		2	1	2	1
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31	1	1	1		1			
32								
33								
34								
35								
36	1	2	1		1	1	2	1
37	1	1	1		1	1	1	1
38	2	1	1		1			
39								
40	1	1	1		1	1	1	1
41								
42	1	1	1		1	1	1	1
43		2	1		2	2		2
44								
45								

46	1	1	1	2				
47								
48								
49								
50	1	2	1	1				
51	1	1	1	1	1	1	1	1
52				2				2
53			1	1				
54	2	1	1	1				
55	1	2	1	1	1	2	1	1
56								
57								
58	1	2	1	1	1	2	1	1
59	1	1		1				
60	1		1	1	1		1	1
61								
62								
63								
64								
65								
66	2		1	1	2		1	1
67	1	1	1	1	1	1	1	1
68								
69								
70	1	1	1	1	1		1	1
71	2				2			
72								
73								
74								
75								
77								
78								
79								
80								
81								
82								
83								
84								
85								
86								
87								

Tabelle 48: Färbeargebnisse nach Anteilen immunreaktiver Zellen (Teil 6)

LK = Lymphknoten, PT = Primärtumor, PE = Material aus Probenentnahme (Biopsie)

Fall	Tumor	RB1 (%)	p53(%)	p16 ^{INK4a} (%)	Cyclin-D1 (%)
1	PT	71	61		0 72
2	Lokalrezidiv	59	45		0 50
3	PT		0		95 1
4	PT				
4	Lokalrezidiv	68	9		98 2
4	Lokalrezidiv	9			
5	Lokalrezidiv	53	53		0 75
6	LK-Metastase	27	51		15 99
6	LK-Metastase	10	37		42 94
6	PT	29	44		6 85
7	LK-Metastase	37	0		1 70
8	PT		60	80 nur nukleär! Per Def. keine	ÜE 74
8	LK-Metastase	90	0		0 49
9	PT				93
10	PT				100
10	PT		89		
11	PT	49	73		1 76
12	PT	58	26		97 32
12	LK-Metastase	99	8		99 2
13	PT	93	46		96 49

13	PT				
13	PT a				
14	PT	54	64	0	73
14	LK-Metastase	38	43	0	59
15	LK-Metastase	26	13	99	7
16	Lokalrezidiv	82	16	3	56
16	LK-Metastase	10	27	1	61
16	Zweitumor	45	64	1	82
17	LK-Rezidiv	53	14	0	24
18	PT	55		0	26
19	PT	25	6	100	20
19	LK-Metastase	27	0	100	0
20	LK-Metastase	60	0	1	81
20	PT		0	0	75
21	Primärtumor	93	1	2	32
22	PT	69	5	0	53
23	PT				
23	LK-Metastase	47	87	1	74
23	Lokalrezidiv	48	70	2	42
24	LK-Metastase	51	21	0	78
24	PT	30	8	1	37
25	LK-Metastase	21	50	0	53
26	Lokalrezidiv	39	0	1	93
27	PT		66	0	77
28	PT	71	83	1	78
29	LK-Metastase	59	95	0	66
30	PT	64	67	0	95
31	Lokalrezidiv	2	0	100	2
31	LK-Metastase	44	0	100	1
32	PT	49	41	0	36
33	LK-Metastase				
33	Lokalrezidiv	49	10	1	60
34	LK-Rezidiv	37	1	0	81
35	PT	82	58	1	55
36	PT	6	8	98	8
36	LK-Metastase	54	29	97	12
37	PT	5	2	99	8
37	LK-Metastase	28	0	100	1
38	LK-Metastase	9	3	99	54
38	PT	78	3	98	8
	LK-Metastase zum				
38	Lokalrezidiv	85			
38	Fernmetastase	25	1	98	15
38	LK-Metastase	79	2	98	17
38	Lokalrezidiv	55	32	98	2
39	PT	51	51	0	14
39	PE zum PT	5	100	0	41
40	PT	42	66	0	99
40	LK-Metastase	38	88	0	99
41	LK-Rezidiv	58	11	0	66
42	PT PE				
42	PT	99	67	1	60
42	LK-Metastase	76	33	1	71
43	PT Uvula	73	5	0	92
43	PT Sinus piriformis		65	1	56
44	PT	57	13	98	3
45	PT	82	12	98	5
46	PT	99	85	1	34
46	Rezidivmetastase Parotis	87	93	0	61
47	Residuum	46	43	98	41
48	PT	59	4	97	30
49	PT	69	54	0	78
50	PT	37	54	1	54
50	Lungenmetastase	17	5	3	56
51	LK-Metastase	18	26	98	44
51	PT	72	25	99	2
51	LK-Metastase		2	91	
51	LK-Metastase				
52	PT				63
52	LK-Metastase	61	76	0	40
53	PT			98	27
53	LK-Metastase	35	7	97	1
54	Primärtumor	48	5	100	48
54	Progress Weichteilmetastase	85	10	100	25
54	cervikal	61	9	100	50

54	Weichteilmetastase OS	1	1	100	41
55	PE des PT	38	73	98	48
55	PT		5	64	
55	LK-Metastase	13	11	92	11
56	PT	69	14	1	80
57	PT	53	71	97	7
58	PT	89	28	97	30
58	LK-Metastase	89	13	98	13
59	LK-Metastase	22	13	1	63
59	LK-Metastase	61	11		85
60	PT	47	62	1	78
60	LK-Metastase	14		0	68
61	LK-Metastase	55	71	0	83
62	PT				
62	PT	63	88	3	79
63	LK-Metastase	3	0	0	12
64	PT	18	90	0	86
65	PT	89	83	0	55
65	LK-Metastase				
66	PT	78		96	29
66	LK-Metastase	25	13	99	5
67	PT	58	12	98	35
67	LK-Metastase	18	7	98	1
68	PT	79	84	0	21
69	PT		49	78	65
70	PT	64	8	0	89
70	LK-Metastase	66		1	82
70	Lokalrezidiv	44	5	1	81
71	PT	75			
71	LK-Metastase	44	13	98	4
72	PT				93
73	PT	32	6	73 nur nukleär!!	77
74	PT	33	45	1	52
75	PT	44	77	0	45
77	PT				60
78	PT				90
79	Zweittumor	47	59	1	44
80	Lokalrezidiv	3			
82	PT				
83	PT	71	68	7	93
83	PT	84			
84	PT				
85	Lokalrezidiv				
86	Lokalrezidiv				
87	PT	73	46	4	96

Die Fälle 8 und 73 zeigen nur nukleäre Immunreaktivität in der Immunhistochemie. Nach der hier geltenden Definition werden diese Fälle daher nicht als p16^{INK4a}-positiv bewertet.

Tabelle 49: : Krankheitsverlauf (Teil 1)

Progress 1: 1 = Primärtumor (bei CUP-Syndrom); 3 = loko-regionäres Rezidiv; 4 = Zweittumor; 7 = Zweittumor DD: Fernmetastase; 8 = Fernmetastase. **Progress 2:** 1 = loko-regionäres Rezidiv; 4 = Fernmetastase; 5 = Zweittumor; 6 = Zweittumor DD: Fernmetastase. **Progress 3:** 1 = loko-regionäres Rezidiv; 2 = Fernmetastase

Fall	Art_ Progress 1	Art_ Progress 2	Art_ Progress 3
1			
2		3	1
3			1
4	3		1
5	3		
6			
7			
8	4		
9			
10			
11			
12			

13			
14	4		
15			
16	3	1	1
17	8		
18			
19			
20			
21	3	1	1
22			
23	3	4	
24			
25	3	5	1
26	3	1	1
27			
28			
29			
30			
31	3	1	1
32	4	5	
33	3	1	2
34	7	6	1
35	4		
36			
37			
38	1	1	2
39	3		
40	8	4	2
41	4		
42	3	1	
43	4		
44			
45			
46	8		
47	4	1	1
48	1		
49			
50	7		
51			
52	7	5	
53	8	6	1
54		4	1
55			
56			
57			
58			
59	3	1	
60			
61	3		
62			
63			
64	7		
65	3		
66			
67			
68	3		
69			
70	3		
71			
72			
73			
74			
75			
77			
78	8		
79	4		
80	3	4	
81	3		
82			
83	4	5	
84			
85	3	5	1
86	3	6	1
87	4	1	1

Bei Fall 48 handelt es sich um ein Fehleintragung des Primarius als Progress 1

Tabelle 50: Krankheitsverlauf (Teil 2)

Progress 4: 1 = loko-regionäres Rezidiv; 3 = Fernmetastase. **Progress 5:** 1 = loko-regionäres Rezidiv; 2 = Fernmetastase; 3 = Zweittumor; für Progress binär und multiple Progresse stattgefunden: 1 = ja, 2 = nein

Fall	Art_ Progress 4	Art_ Progress 5	Progress_ binär	Multiple Progresse_ stattgefunden
1				2
2		1		1
3				2
4				1
5				2
6				2
7				2
8				2
9				2
10				2
11				2
12				2
13				2
14				1
15				2
16	1			1
17				2
18				2
19				2
20				2
21				1
22				2
23				1
24				2
25	1			1
26				1
27				2
28				2
29				2
30				2
31	1			1
32				1
33				1
34				1
35				2
36				2
37				2
38	1	1		1
39				2
40				1
41				2
42				1
43				2
44				2
45				2
46				2
47				1
48				2
49				2
50				2
51				2
52				1
53	3	2		1
54	3	2		1
55				2
56				2
57				2
58				2
59				1
60				2
61				2
62				2

63			2	2
64			1	2
65			1	2
66			2	2
67			2	2
68			1	2
69			2	2
70			1	2
71			2	2
72			2	2
73			2	2
74			2	2
75			2	2
77			2	2
78			1	2
79			1	2
80			1	1
81			1	2
82			2	2
83			1	1
84			2	2
85	1	3	1	1
86			1	1
87			1	1

Tabelle 51: Krankheitsverlauf (Teil 3)

Loko-reg. Rezidiv = loko-regionäres Rezidiv; SPT DD: DM = Zweittumor differentialdiagnostisch Fernmetastase

Fall	loko-reg. Rezidiv (LRR)	≥1_LRR	Zweittumor (SPT)	≥1 SPT	Fernmetastasen (DM)	SPT_DD: DM
1		2		2		2
2		1	1	2		2
3		2		2		2
4		1	1	2		2
5		1	2	2		2
6		2		2		2
7		2		2		2
8		2		1	2	2
9		2		2		2
10		2		2		2
11		2		2		2
12		2		2		2
13		2		2		2
14		2		1	2	2
15		2		2		2
16		1	1	2		2
17		2		2		1
18		2		2		2
19		2		2		2
20		2		2		2
21		1	1	2		2
22		2		2		2
23		1	2	2		1

24	2		2		2	2
25	1	1	1	2	2	2
26	1	1	2		2	2
27	2		2		2	2
28	2		2		2	2
29	2		2		2	2
30	2		2		2	2
31	1	1	2		2	2
32	2		1	1	2	2
33	1	1	2		1	2
34	1	2	2		2	1
35	2		1	2	2	2
36	2		2		2	2
37	2		2		2	2
38	1	1	2		1	2
39	1	2	2		2	2
40	2		2		1	2
41	2		1	2	2	2
42	1	1	2		2	2
43	2		1	2	2	2
44	2		2		2	2
45	2		2		2	2
46	2		2		1	2
47	1	1	1	2	2	2
48	2	2	2		2	2
49	2		2		2	2
50	2		2		2	1
51	2		2		2	2
52	2		1	2	2	1
53	1	2	2		1	1
54	1	2	2		1	2
55	2		2		2	2
56	2		2		2	2
57	2		2		2	2
58	2		2		2	2
59	1	1	2		2	2
60	2		2		2	2
61	1	2	2		2	2
62	2		2		2	2
63	2		2		2	2
64	2		2		2	1
65	1	2	2		2	2
66	2		2		2	2
67	2		2		2	2
68	1	2	2		2	2
69	2		2		2	2
70	1	2	2		2	2

71	2		2		2	2
72	2		2		2	2
73	2		2		2	2
74	2		2		2	2
75	2		2		2	2
77	2		2		2	2
78	2		2		1	2
79	2		1	2	2	2
80	1	2	2		1	2
81	1	2	2		2	2
82	2		2		2	2
83	2		1	1	2	2
84	2		2		2	2
85	1	1	1	1	2	2
86	1	1	2		2	1
87	1	1	1	2	2	2

Tabelle 52: Krankheitsverlauf (Teil 4)

DM = Fernmetastase, 1 = ja, 2 = nein; Gl. = Glandula

Fall	DM_pulmonal	DM_Weichteil	DM_ossär	DM_thorakal	DM_hepatisch	DM_Gl_parotis/ Gl. thyreoidea
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17			1			
18						
19						
20						
21						
22						
23		1				
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33	1			1		
34	1					
35						
36						
37						

16	0	129	1	5	0	124
17	1	31	1	22	1	9
18	0	86	0	86		
19	0	78	0	78		
20	0	127	0	127		
21	0	107	1	18	0	88
22	0	67	0	67		
23	1	23	1	11	1	11
24	1	11	0	11		
25	1	36	1	7	1	29
26	0	73	1	14	0	58
27	0	1	0	1		
28	0	1	0	1		
29	0	91	0	91		
30	0	12	0	12		
31	1	31	1	7	1	24
32	0	120	1	114	0	5
33	1	19	1	8	1	11
34	1	25	1	8	1	16
35	0	97	1	74	0	23
36	0	5	0	5		
37	0	103	0	103		
38	1	45	1	15	1	30
39	1	15	1	11	1	3
40	1	8	1	7	1	0
41	0	129	1	107	0	22
42	0	11	1	6	0	5
43	0	3	1	0	0	3
44	0	27	0	27		
45	0	98	0	98		
46	1	10	1	5	1	5
47	0	95	1	14	0	80
48	0	58	1	0	0	58
49	0	42	0	42		
50	1	29	1	12	1	17
51	0	87	0	87		
52	1	23	1	22	1	0
53	1	18	1	13	1	4
54	1	37	1	37		
55	0	87	0	87		
56	1	5	0	5		
57	0	105	0	105		
58	1	0	0	0		
59	1	34	1	31	1	2
60	1	2	0	2		
61	0	18	1	9	0	8
62	0	1	0	1		
63	0	43	0	43		
64	1	24	1	23	1	0
65	1	14	1	7	1	6
66	0	96	0	96		
67	0	78	0	78		
68	0	105	1	30	0	75
69	0	112	0	112		
70	1	16	1	10	1	6
71	0	79	0	79		
72	1	2	0	2		
73	0	12	0	12		
74	0	3	0	3		
75	0	37	0	37		
77	1	0	0	0		
78	1	6	1	0	1	5
79	0	103	1	41	0	61
80	1	15	1	12	1	3
81	0	18	1	11	0	6
82	0	72	0	72		
83	0	71	1	0	0	71
84	0	93	0	93		
85	1	59	1	14	1	45
86	1	24	1	12	1	12
87	1	48	1	31	1	17

8 Literaturverzeichnis

1. Wienecke A, Kraywinkel K. Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Der Onkologe*. 2019; 25(3): 190-200.
2. Masterson L, Moualed D, Liu ZW, Howard JE, Dwivedi RC, Tysome JR, Benson R, Sterling JC, Sudhoff H, Jani P, Goon PKC. De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2014; 50(15): 2636-48.
3. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, Lee N, Riaz N, Pei X, Koyfman SA, Adelstein D, Burkey BB, Friborg J, Kristensen CA, Gothelf AB, Hoebbers F, Kremer B, Speel EJ, Bowles DW, Raben D, Karam SD, Yu E, Xu W. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The Lancet Oncology*. 2016; 17(4): 440-51.
4. Wittekindt C., Hrsg. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage. Weinheim Wiley-VCH; 2017: 32-39.
5. Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(14): 6289-93.
6. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017; 169(6): 1000-11.
7. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*. 2013; 75: 685-705.

8. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2011; 10(15): 2497-503.
9. Jouhi L, Hagstrom J, Atula T, Makitie A. Is p16 an adequate surrogate for human papillomavirus status determination? *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2017; 25(2): 108-12.
10. Fakhry C, Lacchetti C, Perez-Ordonez B. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement Summary of the CAP Guideline. *Journal of oncology practice*. 2018; 14(10): 613-7.
11. Holzinger D. Virale und zelluläre Faktoren zur Identifizierung HPV-assoziiierter Oropharynxkarzinome [Dissertation]. Heidelberg: Universität; 2012.
12. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (New York, NY)*. 1989; 243(4893): 934-7.
13. Li S, Hong X, Wei Z, Xie M, Li W, Liu G, Guo H, Yang J, Wei W, Zhang S. Ubiquitination of the HPV Oncoprotein E6 Is Critical for E6/E6AP-Mediated p53 Degradation. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 2483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02483>.
14. Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(8): 2945-9.
15. Larsen CG, Gyldenlove M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, Konge L, von Buchwald C. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *British journal of cancer*. 2014; 110(6): 1587-94.

16. Mehrad M, Zhao H, Gao G, Wang X, Lewis JS, Jr. Transcriptionally-active human papillomavirus is consistently retained in the distant metastases of primary oropharyngeal carcinomas. *Head and neck pathology*. 2014; 8(2): 157-63.
17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018; 68(6): 394-424.
18. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86.
19. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, Kimple RJ. Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2015; 21(3): 138-46.
20. Wuerdemann N, Wagner S, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlohner S, Klusmann JP, Wittekindt C. Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology*. 2017; 7: 129. S. 1-10. doi: [10.3389/fonc.2017.00129](https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00129).
21. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancersystematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 2013; 35(5): 747-55.
22. AG HPV der Ständigen Impfkommission (STIKO). Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren [Internet]. Letzter Stand 28.06.2018 [zitiert am 29.01.2020]. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/26/Art_01.html.
23. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene

mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14(2): 366-9.

24. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008; 100(6): 407-20.

25. Westra WH. The pathology of HPV-related head and neck cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Semin Diagn Pathol*. 2015; 32(1): 42-53.

26. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015; 517(7536): 576 - 82.

27. Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride AA. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*. 2017; 45(D1): D499-D506.

28. NIH/National Institute of Allergy and Infectious Diseases U. Papillomavirus Episteme [Internet]. last updated 01/13/20 [zitiert am 11.02.2020]. URL: https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database/kw?dbNamespace=Genomes&includeNR=false&refCloneOnly=false&sort=Locus_ID&sortType=true&Host%20Species=Homo%20sapiens&page=600&start=1&showTable=1&.

29. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, Kataoka A, Hossain S, Hakangard C, Hansson BG. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *The Journal of general virology*. 2003; 84(Pt 7): 1881-6.

30. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol*. 2000; 74(24): 11636-41.

31. Poljak M, Kocjan BJ, Potocnik M, Seme K. Anogenital hairs are an important reservoir of alpha-papillomaviruses in patients with genital warts. *The Journal of infectious diseases*. 2009; 199(9): 1270-4.
32. Potocnik M, Kocjan BJ, Seme K, Luzar B, Babic DZ, Poljak M. Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. *Journal of medical virology*. 2006; 78(12): 1673-8.
33. Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostolozza J, McKinney S, Sun C, Schlecht NF, Fatahzadeh M, Herrero R, Schiffmann M, Burk RD. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *The Journal of infectious diseases*. 2011; 204(5): 787-92.
34. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401(1): 70-9.
35. de Koning MN, ter Schegget J, Eekhof JA, Kamp M, Kleter B, Gussekloo J, Feltkamp MC, Bouwes Bavinck JN, Purdie KJ, Bunker CB, Proby CM, Meys R, Harwood CA, Quint WG. Evaluation of a novel broad-spectrum PCR-multiplex genotyping assay for identification of cutaneous wart-associated human papillomavirus types. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(5): 1706-11.
36. Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Fife KH. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and Southern blot techniques. *Journal of clinical microbiology*. 1993; 31(10): 2667-73.
37. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *Journal of clinical microbiology*. 1999; 37(10): 3316-22.

38. Figueiredo MC, Justino MC, Delmonico L, Silvestre RT, de Castro TL, Dos Santos Moreira A, Macedo JMB, da Costa Carvalho MDG, Scherrer L, de Medeiros Lima DJM, Alves G, Ornellas MH. Prevalence and clinical implications of low-risk human papillomavirus among patients with recurrent respiratory papillomatosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Auris, nasus, larynx*. 2019; 46(4): 570-5.
39. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015; 25(Suppl 1): 2-23.
40. Palefsky JM. Virology of human papillomavirus infections and the link to cancer. In: UpToDate, Bloom, A. (Deputy Ed.), UpToDate, Waltham, MA.[Internet] 2019 (Accessed on January 29,2020). URL:<https://www.uptodate.com/contents/virology-of-human-papillomavirus-infections-and-the-link-to-cancer>.
41. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015; 7(7): 3863-90.
42. Jura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, Garland SM, Giuliano AR, Hernandez-Avila M, Huh W, Iversen OE, Kjaer SK, Luna J, Miller D, Monson J, Munoz N, Myers E, Paavonen J, Pitisuttithum P, Steben M, Wheeler CM, Perez G, Saah A, Luxembourg A, Sings HL, Velicer C. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014; 23(10): 1997-2008.
43. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens [Ebook]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100(Pt B):1-441. URL: <https://publications.iarc.fr/119>. (Zuletzt aufgerufen am 26.02.2020).
44. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E,

Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menendez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andujar M, Castellsague X, Sanchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Munoz N, Bosch FX. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010; 11(11): 1048-56. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8.

45. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007; 356(19): 1944-56.

46. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *The Journal of infectious diseases*. 1998; 177(2): 361-7.

47. Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, Clark C, Tickman R, Hewan-Lowe K, Chenggis ML, Swan DC. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hum Pathol*. 1991; 22(9): 908-13.

48. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5): F55-70.

49. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011; 11(1): 9-22.

50. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F

and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(10): 4549-53.

51. Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*. 2006; 25(38): 5277-85.

52. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005; 24(17): 2810-26.

53. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends in biochemical sciences*. 2004; 29(8): 409-17.

54. Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*. 2002; 21(3): 437-46.

55. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei medical journal*. 2005; 46(5): 597-613.

56. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*. 1994; 14(3): 2066-76.

57. Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008; 13: 1003-17. doi: 10.2741/2739.

58. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer*. 2010; 10(8): 550-60.

59. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016; 6(3): a026104.

60. Smeets SJ, van der Plas M, Schaaij-Visser TBM, van Veen EAM, van Meerloo J, Braakhuis BJM, Steenbergen RDM, Brakenhoff RH. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *International journal of cancer*. 2011; 128(7): 1596-605.
61. Katzenellenbogen R. Telomerase Induction in HPV Infection and Oncogenesis. *Viruses*. 2017; 9(7): 180. doi.org/10.3390/v9070180.
62. James CD, Fontan CT, Otoa R, Das D, Prabhakar AT, Wang X, Bristol ML, Morgan IM. Human Papillomavirus 16 E6 and E7 Synergistically Repress Innate Immune Gene Transcription. *mSphere*. 2020; 5(1): e00828-19. doi: 10.1128/mSphere.00828-19.
63. Plath M, Broglie MA, Forbs D, Stoeckli SJ, Jochum W. Prognostic significance of cell cycle-associated proteins p16, pRB, cyclin D1 and p53 in resected oropharyngeal carcinoma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale*. 2018; 47(1): 53. doi.org/10.1186/s40463-018-0298-3.
64. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, Calvero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimera N, Lloveras B, Leon X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, AJayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Felix A, Germar MJV, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, Lopez-Revilla R, Mandys V, Gonzalez ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Munoz N, de Sanjose S, Bosch FX. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108 (6): djv403. doi:10.1093/jnci/djv403.
65. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency.

Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck. 2012; 34(4): 459-61.

66. Doescher J, Veit JA, Hoffmann TK. [The 8th edition of the AJCC Cancer Staging Manual : Updates in otorhinolaryngology, head and neck surgery]. Hno. 2017; 65(12): 956-61.

67. Dreyer JH, Hauck F, Barros MHM, Niedobitek G. pRb and CyclinD1 Complement p16 as Immunohistochemical Surrogate Markers of HPV Infection in Head and Neck Cancer. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM. 2017; 25(5): 366-73.

68. Gotte K, Riedel F, Neubauer J, Schafer C, Coy JF, Hormann K. The relationship between allelic imbalance on 17p, p53 mutation and p53 overexpression in head and neck cancer. International journal of oncology. 2001; 19(2): 331-6.

69. van Houten VMM, Tabor MP, van den Brekel MWM, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. Journal of Pathology. 2002; 198(4): 476-86.

70. Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P, Akervall J, Wennerberg J. p53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. British journal of cancer. 1998; 78(8): 1084-90.

71. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. Hum Pathol. 1999; 30(10): 1221-5.

72. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer. 1997; 79(2): 380-9.

73. Laborde RR, Janus JR, Olsen SM, Wang VW, Garcia JJ, Graham RP, Moore EJ, Olsen KD, Kasperbauer JL, Price DL, Berres M, Halling G, Smith DI. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: assessing virus presence in normal tissue and activity in cervical metastasis. *The Laryngoscope*. 2012; 122(12): 2707-11.
74. Lu XJD, Liu KYP, Soares RC, Thomson T, Prisman E, Wu J, Poh CF. Potential clinical implications of HPV status and expressions of p53 and cyclin D1 among oropharyngeal cancer patients. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2018; 47(10): 945-53.
75. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2010; 363(1): 24-35.
76. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, Soulieres D, Trotti A, Avizonis V, Ridge JA, Harris J, Le QT, Gillison M. Human Papillomavirus and Overall Survival After Progression of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2014; 32(30): 3365-73.
77. Guo T, Rettig E, Fakhry C. Understanding the impact of survival and human papillomavirus tumor status on timing of recurrence in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2016; 52: 97-103.
78. Khan H, Gupta S, Husain N, Misra S, Negi MPS, Jamal N, Ghatak A. Correlation between expressions of Cyclin-D1, EGFR and p53 with chemoradiation response in patients of locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Bba Clinical*. 2015; 3:11-7.
79. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJC, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 Expression: Predicting Recurrence and Second Primary Tumors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88(8): 519-29.

80. Tandon S, Tudur-Smith C, Riley RD, Boyd MT, Jones TM. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2010; 19(2): 574-87.
81. Ang SH, Haaland B, Acharyya S, Thu MMM, Krisna SS, Hwang SG, Tan PH, Ng QS, Tan DSW, Tai WM, Tan EH, Lim WT, Ang MK. Interactions between clinical factors, p16, and cyclin-D1 expression and survival outcomes in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck.* 2015; 37(11): 1650-9.
82. Lin RJ, Lubpairee T, Liu KY, Anderson DW, Durham S, Poh CF. Cyclin D1 overexpression is associated with poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery.* 2013; 42(1): 23.
83. Gioacchini FM, Alicandri-Ciufelli M, Kaleci S, Magliulo G, Presutti L, Re M. The prognostic value of cyclin D1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2016; 273(4): 801-9.
84. Warren S GO. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and statistical study. *Am J Cancer.* 1932; 16: 1358–1414.
85. Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ, Dimery IW, Brown BW, Goepfert H. Prevention Of Second Primary Tumors With Isotretinoin In Squamous-Cell Carcinoma Of The Head And Neck *The New England journal of medicine.* 1990; 323(12): 795-801.
86. Adeel M, Siddiqi MI. Metachronous second primary malignancy in head and neck cancer patients: is five years of follow-up sufficient? *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2018; 44(5): 220-4.
87. Bugter O, van Iwaarden DLP, Dronkers EAC, de Herdt MJ, Wieringa MH, Verduijn GM, Mureau MAM, Ten Hove I, van Meerten E, Hardillo JA, Baatenburg de

Jong RJ. Survival of patients with head and neck cancer with metachronous multiple primary tumors is surprisingly favorable. *Head & neck*. 2019; 41(6): 1648-55.

88. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1995 ;75(6): 1343-53.

89. Xu CC, Biron VL, Puttagunta L, Seikaly H. HPV status and second primary tumours in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale*. 2013; 42(1): 36.

90. Haremza C, Baert M, Pascual C, Biet-Hornstein A, Page C. Head and neck squamous cell carcinoma and metachronous second primaries. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*. 2019; 136(5): 367-372.

91. Leon X, Martinez V, Lopez M, Garcia J, Venegas Mdel P, Esteller E, Quer M. Second, third, and fourth head and neck tumors. A progressive decrease in survival. *Head & neck*. 2012; 34(12): 1716-9.

92. Birkeland AC, Rosko AJ, Chinn SB, Prince ME, Sun GH, Spector ME. Prevalence and Outcomes of Head and Neck versus Non-Head and Neck Second Primary Malignancies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*. 2016; 78(2): 61-9.

93. Wang M, Sharma A, Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Schootman M, Piccirillo JF, Huh WK, Adjei Boakye E. Risk of subsequent malignant neoplasms after an index potentially-human papillomavirus (HPV)-associated cancers. *Cancer epidemiology*. 2020;64:101649. doi: 10.1016/j.canep.2019.101649

94. Canavan JF, Harr BA, Bodmann JW, Reddy CA, Ferrini JR, Ives DI, Chute DJ, Fleming CW, Woody NM, Geiger JL, Joshi NP, Koyfman SA, Adelstein DJ. Impact of routine surveillance imaging on detecting recurrence in human papillomavirus

associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2020; 103: 104585. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104585

95. Homann N, Nees M, Conradt C, Dietz A, Weidauer H, Maier H, Bosch FX. Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2001;7(2):290-6.

96. Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, Puttagunta L, Cote DW, Seikaly H. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale.* 2013;42:53.

97. Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, Meyn RE, Yordy JS, Beadle BM, Fitzgerald AL, Giri U, Ang KK, Myers JN. TP53 Disruptive Mutations Lead to Head and Neck Cancer Treatment Failure through Inhibition of Radiation-Induced Senescence. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(1):290-300.

98. Tinhofer I, Budach V, Saki M, Kanschak R, Niehr F, Johrens K, Weichert W, Linge A, Lohaus F, Krause M, Neumann K, Endris V, Sak A, Stuschke M, Balermipas P, Rodel C, Avlar M, Grosu AL, Abdollahi A, Debus J, Belka C, Pigorsch S, Combs SE, Monnich D, Zips D, Baumann M. Targeted next-generation sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2016;57:78-86.

99. Wiegand S, Zimmermann A, Wilhelm T, Werner JA. Survival After Distant Metastasis in Head and Neck Cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35(10): 5499-502.

100. Tiedemann D, Jakobsen KK, von Buchwald C, Gronhoj C. Systematic review on location and timing of distant progression in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Head & neck.* 2019; 41(3): 793-8.

101. Jaber JJ, Murrill L, Clark JI, Johnson JT, Feustel PJ, Mehta V. Robust Differences in p16-Dependent Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Distant Metastasis: Implications for Targeted Therapy. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2015; 153(2): 209-17.
102. Huang SH, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Hope A, Massey C, Waldron JN, Kim J, Bayley AJ, Cummings B, Cho BCJ, Ringash J, Dawson LA, Siu LL, Chen E, Irish J, Gullane P, Hui A, Liu FF, Shen X, Xu W, O'Sullivan B. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2013; 49(1): 79-85.
103. Rasmussen JH, Gronhoj C, Hakansson K, Friberg J, Andersen E, Lelkaitis G, Klusmann JP, Wittekindt C, Wagner S, Vogelius IR, von Buchwald C. Risk profiling based on p16 and HPV DNA more accurately predicts location of disease relapse in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019; 30(4): 629-36.
104. Eger CS. Die klinische Relevanz der Protease Taspase 1 in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität. 2019.
105. F. Pontén KJ, M. Uhlen. The Human Protein Atlas - a tool for pathology. *Journal of Pathology*. 2008; 216: 387-93.
106. S. Hober MU. Human protein atlas and the use of microarray technologies. *Current opinion in Biotechnology* 2008; 19: 30-5.
107. Khan MZ, Brandimarti R, Shimizu S, Nicolai J, Crowe E, Meucci O. The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. *Cell death and differentiation*. 2008; 15(10): 1663-72.

108. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science (New York, NY)*. 1994; 263(5148): 802-5.
109. Gstraunthaler G, Lindl, T. Zell- und Gewebekultur. Allgemeine und spezielle Anwendungen [E-Book]. 7. Auflage. Berlin: Springer; 2013. DOI 10.1007/978-3-642-35997-2.
110. Teifel M. Transfektion von Säugerzellen. In: Jansohn, M., Rothhämel, S., Hrsg. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Springer; 2012: 351-383.
111. Lang G. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2. überarbeitete Auflage. Wien: Springer; 2013.
112. Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S, Welsch U. Schnittpräparation für die Lichtmikroskopie. In: Mulisch, M., Welsch, U., Hrsg. Romeis - Mikroskopische Technik. 19. Auflage. Berlin: Springer; 2015: S. 107 - 108.
113. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003 ;21(20): 3798-807.
114. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS, Jr. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res*. 1989; 49(4): 1052-6.
115. Dreyer JH, Hauck F, Oliveira-Silva M, Barros MH, Niedobitek G. Detection of HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma: a practical proposal. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2013; 462(4): 381-9.

116. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordenez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *The American journal of surgical pathology*. 2012; 36(7): 945-54.
117. Kunz C, Bosch FX, Klein-Kuhne W, Nollert J, Rudat V, Conradt C, Dietz A. [Immunohistochemical determination of cell cycle regulatory proteins. No prognostic significance in advanced squamous epithelial carcinomas of the head-neck area]. *Hno*. 2003; 51(10): 800-5.
118. Uhlen M. The Human Protein Atlas [Internet]. [zuletzt besucht am 22.01.2020]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139687-RB1/tissue/tonsil#img>. .
119. Deichelbohrer M. TuBa - A head and neck cancer database providing input assistance, visualization, and R-based analysis [Master's Thesis]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität; 2016.
120. Beltz AK. Staging von Oropharynxkarzinomen - HPV-Status und extranodales Wachstum als neue Parameter zur Risikostratifizierung und die prognostische Auswirkung der achten Edition der UICC Klassifikation [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität; 2019.
121. Deuss E. Vergleichende Analyse von Wachstumsfaktorrezeptoren und klinisch-pathologischen Parametern Cetuximab-therapierter Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches aus der Tumordatenbank TuBa und deren prognostische Relevanz [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität;. 2019.
122. Beltz A, Gösswein D, Zimmer S, Limburg I, Wunsch D, Gribko A, Deichelbohrer M, Hagemann J, Stauber RH, Künzel J. Staging of oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck: Prognostic features and power of the 8th edition of the UICC staging manual. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2019; 45(6): 1046-53.

123. Lenhard WL, Lenhard A. Berechnung von Effektstärken. Dettelbach: Psychometrica [Internet]. 2016 [zitiert am 11.02.2020] URL: <https://www.psychometrica.de/effektstaerke.html>. DOI: 10.13140/RG.2.2.17823.92329.
124. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences (2. Auflage). Hillsdale, NJ: Erlbaum. 1988.
125. Saad ED, Katz A. Progression-free survival and time to progression as primary end points in advanced breast cancer: often used, sometimes loosely defined. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2009; 20(3): 460-4.
126. Li L, Pan Z. Progression-Free Survival and Time to Progression as Real Surrogate End Points for Overall Survival in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of 37 Trials. *Clinical breast cancer*. 2018; 18(1): 63-70.
127. US Food and Drug Administration. Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics. Guidance for Industry [Internet]. Dezember 2018 [zuletzt besucht am 17.04.2020]. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-trial-endpoints-approval-cancer-drugs-and-biologics>. 2018.
128. Gaus W, Muche, R. . Medizinische Statistik. Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2017.
129. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017; 168(4): 613-28.
130. Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer discovery*. 2015; 5(8): 806-20.
131. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. Worldwide Trends in Incidence

Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2013; 31(36): 4550-9.

132. Kallioniemi A. DNA Copy Number Analysis on Tissue Microarrays. In: Simon R, Hrsg. *Tissue Microarrays: Methods and Protocols*. Heidelberg: Springer; 2010: 127-134.

9 Danksagung

Den größten Dank richte ich an Prof. Dr. rer. nat. ... und PD Dr. med. ... für die Begutachtung und für die stets hervorragende Betreuung dieser Dissertation, sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Dr. rer. nat. ... danke ich herzlich für die Auswahl und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die hervorragende Organisation des Projektes mit allen Kooperationspartnern.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. med. ... für die Organisation und Herausgabe des Tumorgewebes und für die sehr angenehme Einarbeitung und Anleitung in die morphologische Beurteilung von Oropharynx-Karzinomen sowie für die Beaufsichtigung in der Auswahl der korrekten Antikörper-Konzentration. Außerdem bedanke ich mich sehr bei Dr. med. ... für die geduldige und freundliche Einarbeitung in die Anwendung der Software HALO® (Indicalab, USA).

Darüber hinaus danke ich ... und ... für die Einführung in die immunhistochemische Färbung mittels Autostainer und für die Färbung der TMAs für p16^{INK4a}, p53 und Cyclin-D1. Außerdem danke ich ... für die geduldige Einarbeitung in die manuelle immunhistochemische Färbung sowie ... für die Isolation der Plasmide und die Bereitstellung der Zelllinien. Ganz besonders danke ich Dr. rer. nat. ... für die Einarbeitung in das Verfahren der Transfektion und die Herstellung der Zellpellets sowie für die Anleitung und Hilfestellung bei der Etablierung einer PCR für den direkten Virusnachweis. Wenn letztere bei mangelndem Tumorgewebe auch nicht zur Anwendung kommen konnte, habe ich trotzdem sehr viel dabei lernen dürfen.

Ganz herzlich bedanke ich mich außerdem bei ..., MSc. für die statistische Beratung, ..., MSc. für die Selektion der Daten meiner Stichprobe aus der TuBa und, ebenfalls ganz besonders, bei meinen beiden Doktoranden-Kollegen, ... und ..., für das stets außerordentlich freundschaftliche Arbeitsklima.

10 eigene Publikationen

10.1 Publierte Artikel

Beltz A, Gösswein D, Zimmer S, Limburg I, Wunsch D, Gribko A, Deichelbohrer M, Hagemann J, Stauber RH, Künzel J. Staging of oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck: Prognostic features and power of the 8th edition of the UICC staging manual. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2019; 45(6): 1046-53.

10.2 Posterpräsentation am 07.05.2016

Limburg I, Gösswein D, Künzel J, Stauber R H. Einfluss des HPV-Status auf das Metastasierungsmuster bei Kopf-Hals-Tumoren. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 87. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Düsseldorf, 04.-07.05.2016. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2016. Doc16hnod029. doi: 10.3205/16hnod029. Diese umfasste jedoch lediglich eine Präsentation des Promotionsvorhabens und enthielt keinerlei Ergebnisse, da diese zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorlagen.

11 Lebenslauf