

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Etablierung eines RT-PCR-Assays zum Nachweis von
E6/E7-Onkogen-Transkripten aus archiviertem Paraffingewebe von
Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region**

Dissertation zur Erwerbung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



Vorgelegt von
Polyxeni Vlachea
aus Athen, Griechenland
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med K. Sotlar

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stephan Ihrler
PD Dr. Bernhard G. Weiß

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. G. Assmann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	12
1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome	12
1.2 Ätiologie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	14
1.3 Klinische Manifestation von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen	15
1.4 Humane Papillomaviren.....	16
1.4.1 Genomstruktur	18
1.4.2 Pathophysiologie	19
1.5 HPV-Nachweismethoden	22
1.6 Therapie und Prognose.....	25
1.7 Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Patientenkollektiv	28
2.2 Vorgehensweise.....	28
2.2.1 DNA-Isolierung und die RNA-Gewinnung.....	28
2.2.2 Kontrollen.....	28
2.2.3 Histopathologie	29
2.2.4 Vermeidung von Kontaminationen	32
2.3 Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen.....	33
2.3.1 DNA-Extraktion.....	33
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen.....	35
2.3.3 Primerliste	36
2.3.4 Sequenzierung zur Typisierung	37
2.4 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene	37
2.4.1 Extraktion von RNA zum Nachweis der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene	37
2.4.2 cDNA-Synthese mit typspezifischen Primern.....	38
2.4.3 Einfache RT-PCR und nested-RT-PCR	39

Inhalt

2.4.4	Gelelektrophorese.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Charakterisierung der Stichprobe.....	42
3.2	Ergebnisse immunhistologischer Untersuchungen	45
3.3	Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen.....	45
3.4	Transkriptionelle Aktivität der E6/E7-Onkogene	51
3.5	Korrelation von HPV-Infektion und Karzinomlokalisierung	55
3.6	Korrelation von HPV-Infektion und T-Stadium	56
3.7	Korrelation von HPV-Infektion und p16-Immunohistochemie	57
3.8	Korrelation von HPV-Infektion und Geschlecht	58
4	Diskussion.....	59
4.1	Methodendiskussion.....	60
4.2	Korrelation zwischen p16-Immunohistochemie und HPV-PCR-Nachweis.....	61
4.3	Korrelation von TumorgroÙe/Geschlecht/Lokalisation	62
4.4	Nachweis der HPV-Infektion mittels PCR.....	62
4.5	Einfach- und Mehrfachinfektionen.....	63
4.6	Nachweis der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene aus FFPE-Material.....	64
4.7	Aussagekraft des Onkogentranskriptnachweises an FFPE-Material.....	65
4.8	Anwendung der Methode in der Praxis	67
	Literaturverzeichnis.....	68
	Appendix.....	74
	Danksagung.....	82
	Affidavit	83

Zusammenfassung

Mittlerweile ist gut belegt, dass oropharyngeale Plattenepithelkarzinome zu einem großen Anteil mit high-risk-HPV-Infektionen vergesellschaftet sind. Im Gegensatz zu den ansonsten nikotin- und/oder alkoholinduzierten übrigen Karzinomen des Oropharynx, steht hier im pathogenetischen Korrelat die Interaktion und Inaktivierung zellulärer und Tumorsuppressorproteine p53 und pRb durch die viralen Onkogenprodukte E6 und E7 im Mittelpunkt. Das virale Genom wird entweder als episomale DNA in der epithelialen Wirtszelle gefunden oder in das menschliche Genom integriert und somit samt viralen Onkogenen überexprimiert.

Die Ziele dieser Arbeit waren (I) die Zusammenstellung eines Kollektivs oropharyngealer Plattenepithelkarzinome, (II) dessen molekulare Charakterisierung in Bezug auf den Anteil high-risk-HPV-assoziiierter Fälle samt Typisierung auf DNA-Ebene und (III) die Analyse der Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 auf RNA-Ebene. Schließlich sollte (IV) eine Korrelation der molekularpathologischen Befunde mit der immunhistochemischen Expression von p16 als Surrogatmarker einer HPV-Infektion durchgeführt werden. Dazu wurden 96 Oropharynxkarzinome molekular mittels My09/11, GP 5+/6+, nested-Multiplex-PCR und der typspezifischen nested-RT-PCR aufgearbeitet und die Daten mit den Patientendaten und verfügbaren immunhistochemischen Befunden korreliert.

Zur Vermeidung möglicher Kontaminationen aus angrenzender nicht tumoröser HPV-positiver Schleimhaut wurde das Tumorgewebe vor der Nukleinsäureextraktion mikrodisektiert. Von den untersuchten 96 Proben zeigten 55,2 % (53/96 Fälle) eine Infektion mit insgesamt 6 verschiedenen high-risk-HPV-Typen (16, 18, 33, 35, 59, 66), darunter 90,6 % (48/53) HPV16-assoziierte Plattenepithelkarzinome. In 79,2 % der HPV-positiven Fälle (42/53) konnte die pathogenetische Bedeutung der Infektion in der Tumorgenese durch den Nachweis der transkriptionellen Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 mittels nested-RT-PCR am untersuchten FFPE-Material bestätigt werden. Die Korrelation der molekularen Befunde mit Ergebnissen der immunhistochemisch bestimmten p16-Expression zeigte einen relativ hohen Anteil p16-positiver Plattenepithelkarzinome ohne Nachweis von HPV-DNA.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Studie die pathogenetisch ursächliche Rolle von HPV in der Entstehung von ca. 50 % der Plattenepithelkarzinome des Oropharynx. Diese konnten wir durch Nachweis der E6/E7-Onkogentranskriptaktivität in 79,2 % (42/53) überzeugend untermauern. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie erscheint die

Zusammenfassung

alleinige Bewertung der immunhistochemischen p16-Expression als alleinige Nachweismethode für eine HPV-Infektion als problematisch. Denn diese hat einen Einfluss auf die Prognose und insbesondere die Therapie oropharyngealer Plattenepithelkarzinome. Dennoch ist die Rolle der p16- Antikörper Immunhistochemie als Surrogatmarker für die HPV-Infektion weiterhin unbeeinträchtigt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Oropharynx [4]	12
Abbildung 2: Altersverteilung von Kopf-Hals-Tumore Männern und Frauen und altersspezifische Inzidenz (Tumorregister München, https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC0910G-ICD-10-C09-C10-Oropharynxtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf)	13
Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der humanen Papillomaviren	17
Abbildung 4: Virusgenom des humanen Papillomavirus. Zu den <i>early genes</i> zählen die Sequenzen, die für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 kodieren. Die <i>late genes</i> kodieren die L1 und L2, aus denen das Kapsid gebildet wird. Die Onkogene werden lila angezeigt und die <i>early proteins</i> E1-5 in Blau sowie die <i>late genes</i> in L1 und L2 in Grün. Die LCR-Region, die Promoter und Enhancer enthält, ist rot markiert [51]. Die obere Abbildung wird zeigt die Struktur des HPV als zirkuläres Molekül. Die untere Abbildung zeigt ein bereits in das Wirtsgenom integriertes Virus.....	19
Abbildung 5: HPV16-Virusgenom und mögliche Spliceprodukte [57].....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer HPV-Infektion in den verschiedenen Schichten des Plattenepithels [51].	22
Abbildung 7: (a) zeigt das ungefärbte Schnittpräparat aus Probe 102, (b) den HE-gefärbten Serienschnitt. (c) zeigt den HE-gefärbten Serienschnitt nach Mikrodissektion des Tumorgewebes.	34
Abbildung 8: Beta-Globin-Nachweis als housekeeping-PCR. Proben 61-69 sind positiv. Die Probe 70 ist schwach positiv und aufgrund der Auflösung nicht gut auf diesem Bild erfasst. Die Negativkontrolle zeigt keinen Amplifikatnachweis und die Positivkontrolle zeigt einen positiven Nachweis. In der ersten und letzten Spalte sind jeweils die verwendeten molekularen Leiter dargestellt. Das Amplifikationsprodukt bei den positiven Proben ist 281bp lang.....	45
Abbildung 9:MY- und GP-PCRs von den Proben 40, 52, 53, 54, 88, 90, 94, 97, 103, 105, 133. In der MY-09/11-PCR sind die Proben 53, 90, 97 positiv und die Proben 54, 88, 94, 103, 133 schwach positiv. Das Amplifikationsprodukt der MY09/11-PCR ist 450bp lang. In der GP 5+/6+ sind alle Proben bis auf Probe 105 positiv. In der GP5+/6+-PCR ist Amplifikationsprodukt 150bp lang.....	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 10: Multiplex nested-PCR mit Nachweis von HPV 35, 16. Für HPV 35 ist in der NMPCR ein Amplifikat mit 358bp Länge nachweisbar. Für HPV 16 ist ein Amplifikat mit 457bp Länge nachweisbar.....	47
Abbildung 11: Multiplex nested-PCR mit Nachweis von HPV 18. Die Länge des nachgewiesenen Amplifikats ist 322bp.	47
Abbildung 12: Untersuchungsablauf und Ergebnisse auf DNA-Ebene in schematischer Darstellung.....	48
Abbildung 13: Multiplex-nested-RT-PCR für HPV 16. Erkennbar sind verschiedene Spliceprodukte von HPV16. In Probe 89 am längsten und schwach erkennbar das E6/E7-Amplifikat mit 395 bp Länge. Weiterhin das E6*I-Amplifikat mit 213 bp Länge und das E6*II-Amplifikat mit 95 bp Länge [100].....	52
Abbildung 14: Untersuchungsablauf und Ergebnisse auf RNA-Ebene	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>low-</i> und <i>high-risk</i> -HPV-Typen	18
Tabelle 2: Chirurgische Therapie der Oropharynxkarzinome	25
Tabelle 3: Prognostische Stadien [3]	26
Tabelle 4: Einteilung der Tumorgröße im Bereich des Oropharynx (UICC 2002)	30
Tabelle 5: Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen im oro- und hypopharyngealen Bereich (UICC 2002)	31
Tabelle 6: Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen für p16-negativen im oropharyngealen Bereich (UICC 2017)	32
Tabelle 7: Pathologische Einteilung der regionalen Lymphknotenmetastasen für p16-positive Oropharynxkarzinome pathologisch (UICC 2017)	32
Tabelle 8: Fernmetastasen pTNM-Klassifikation	32
Tabelle 13: Beta-Globin-Primer-Paar(DNA-PCR)	36
Tabelle 14: PPP1CA-Primer-Paar(RT-PCR)	36
Tabelle 15: Verteilung der HPV-Typen in der nested-Multiplex-PCR	36
Tabelle 16: HPV-Typ und RT-PCR-Vorwärts-Primer	39
Tabelle 17: HPV-Typ und Rückwärtsprimer	39
Tabelle 18: HPV- Typ nested RT- PCR-Vorwärts-Primer [83]	40
Tabelle 19: HPV- Typ nested RT-PCR-Rückwärtsprimer [83]	40
Tabelle 20: Tumorlokalisation	42
Tabelle 21: Tumorausdehnung (n=96)	43
Tabelle 22: Lymphknotenstatus	44
Tabelle 23: Grading (n=96)	44
Tabelle 24: Resektionsstatus	44
Tabelle 25: Im Gesamtkollektiv nachgewiesene HPV-Typen	47
Tabelle 26: Ergebnisse der HPV-Untersuchungen auf DNA-Ebene	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 27: PCR Ergebnisse RNA	52
Tabelle 28: Ergebnisse der HPV-Untersuchung auf RNA-Ebene.....	54
Tabelle 29: Korrelation von Lokalisation und HPV-Status	56
Tabelle 30: Korrelation von T-Stadium und HPV-Status.....	56
Tabelle 31: HPV-Typ und Tumorgröße.....	57
Tabelle 32: Korrelation HPV-Status und p16-Immunhistochemie	57
Tabelle 33: Korrelation HPV-Infektion und Geschlechtsverteilung.....	58
Tabelle 34: Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisation und pTNM-Klassifikation des Kollektivs	74
Tabelle 35: Gesamtkollektiv. 0 steht für negatives Ergebnis in der PCR oder Immunhistochemie, 1 steht für positives Ergebnis in der PCR oder Immunhistochemie.	77

Abkürzungsverzeichnis

CDK *Zyclin-abhängige Kinasen*

cDNA *komplementäre DNA*

CKI *CDK Inhibitor*

CUP *Cancer of Unknown Primary*

DNA *Desoxyriboneukleinsäure*

EBV *Ebstein-Barr Virus*

FFPE *Formalin fixiert in Paraffin eingebettet*

HE *Hämatoxylin-Eosin*

HE Färbung *Hämatoxylin-Eosin Färbung*

HIV *Humaner Immundefizienz Virus*

HPV *Humaner Papillomavirus, Humaner
Papillomavirus*

HPV-ISH *HPV in situ Hybridisierung*

IUCC *Union International Contre le Cancer*

LCR *long control region*

NCR *non coding region*

PCR *Polymerase Chain
Reaction/Polymerase Kettenreaktion*

rcf *relative centrifugal force*

RNA *Riboneukleinsäure*

RT-PCR *Reverse Transkriptase PCR*

SN *Seriennummer*

Taq Polymerase *Thermophilus aquaticus
Polymerase*

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome

Die Neuerkrankungsrate der Kopf-Hals-Karzinome (zumeist Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome, *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) wird auf 550.000 Fälle pro Jahr weltweit geschätzt [1] [2]. Epidemiologische Studien zeigten, dass die Inzidenz der Kopf-Hals-Karzinome über die Jahre kontinuierlich abgenommen hat. Dies gilt vor allem für Larynx-, Pharynx- und die Mundhöhlenkarzinome, was auf einen verminderten Alkohol- und Nikotinkonsum zurückzuführen sein dürfte [3].

Im Gegensatz dazu blieb die Inzidenz der Oropharynxkarzinome lange konstant und nimmt in den letzten Jahren langsam zu. Der Oropharynx besteht anatomisch aus der Vorderwand, den Seitenwänden, der Hinterwand und der oberen Wand. Zur Vorderwand des Oropharynx gehört der Zungengrund hinter den *Papillae circumvallatae* und die *Vallecula*. Die Seitenwände bestehen aus den Tonsillen, den *Fossae tonsillare* und den Gaumenbögen sowie den Glossotonsillarfurchen. Zur oberen Wand gehören die orale Oberfläche des weichen Gaumens und die Uvula, vgl. Abbildung 1.

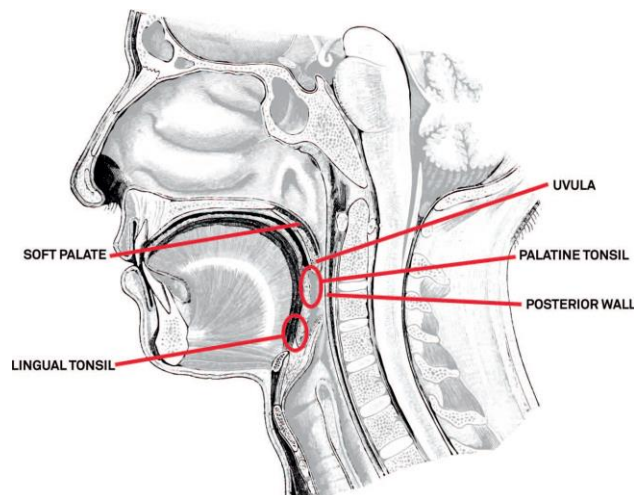


Abbildung 1: Anatomie des Oropharynx [4]

Weltweit stehen Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region an sechster Stelle der Krebshäufigkeit. Die Inzidenzrate in Europa beträgt bei Männern 20 pro 100.000. In den USA machen Kopf-Hals-Karzinome 3 % aller Karzinome aus, ungefähr 52.000 Neuerkrankungen jedes Jahr [5, 6].

Einleitung

Männer erkranken zwei-bis viermal so häufig an Oropharynxkarzinomen wie Frauen. Nach Angaben des Tumorregisters München betrug im Jahr 2016 die Inzidenz von Oropharynxkarzinomen 1,4 pro 100.000 bei Männern und 1,1 pro 100.000 bei Frauen.

Die kumulative Inzidenz bei Patienten unter dem 75. Lebensjahr lag bei jeweils 0,12 % und 0,10 %. Das mittlere Diagnosealter der Patienten mit Oropharynxkarzinomen war bei beiden Geschlechtern 63,5 Jahre. Das mittlere Sterbealter wird bei Männern mit 67,4 Jahren und bei Frauen mit 67,0 Jahren angegeben.

Nach statistischen Daten des Tumorregisters München wurden im Jahr 2016 für Kopf-Hals-Tumoren 259 Neuerkrankungen registriert, darunter 196 Männer und 63 Frauen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 66,6 Jahre und 68,8 Jahre respektive [7].

Dem Tumorregister München zufolge wurden seit 1998 in München insgesamt 13.445 Patienten mit HNO-Tumoren registriert, wovon 124 männliche und 43 weibliche Patienten nachweislich an einem Oropharynxkarzinom (ICD Code C09-C10) erkrankt waren [8]. Das standardisierte Inzidenzverhältnis trifft eine Aussage über die Inzidenz einer betrachteten Kohorte, in diesem Fall Oropharynxkarzinome, in Bezug auf die Gesamtbevölkerung (HNO-Tumore).

Unter den Verstorbenen im Zeitraum zwischen 1998 und 2016 nahmen Oropharynxkarzinome einen Anteil von 4,9 % (148) bei Männern und 5,0 % (40) bei Frauen [7].

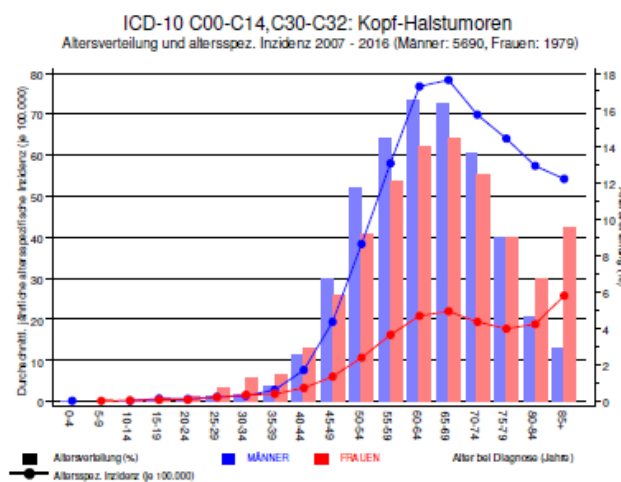


Abbildung 2: Altersverteilung von bösartigen Neubildung vom Oropharynx und Tonsille bei Männern und Frauen und altersspezifische Inzidenz (Tumorregister München, <https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bc0910G-ICD-10-C09-C10-Oropharynx-tumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf>)

Patienten mit Humanen Papillomaviren (HPV) assoziierten Oropharynxkarzinomen sind jünger im Vergleich zu Patienten, die keine HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen aufweisen.

In einer im Jahr 2016 im Lancet publizierten multizentrischen Kohortenstudie (ICON-S) wurden 1.907 Patienten mit Oropharynxkarzinom und nachgewiesener HPV-Infektion mit 696 Patienten mit einem Oropharynxkarzinom ohne Nachweis einer HPV-Infektion verglichen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Prävalenz der HPV-positiven Oropharynxkarzinome im Alter zwischen 30 und 55 Jahren, wobei das mittlere Alter der HPV-positiven Patienten bei 57 Jahren lag. Im Vergleich hatten Patienten mit HPV-negativen Oropharynxkarzinomen ein mittleres Alter von 61 Jahren [10, 11].

1.2 Ätiologie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Bei den meisten Kopf-Hals-Karzinomen handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Für Oropharynxkarzinome gibt es unterschiedliche ätiologische Faktoren. Zum einen sind die Noxen Alkohol, Nikotin und Kautabak wichtige Risikofaktoren, wobei der gleichzeitige Konsum von Alkohol und Nikotin einen additiven Effekt auf das Risiko der Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms hat [12-14]. Viele Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen weisen jedoch keinen der zuvor genannten Risikofaktoren auf. Hier ist meist eine Infektion mit humanen Papillomaviren für die Pathogenese verantwortlich [9, 15]. Die meisten dieser Karzinome entstehen im Bereich des Zungengrunds, der Tonsillen und im Oropharynx. Diese Regionen werden auch als Waldeyerscher Rachenring bezeichnet. Der Waldeyersche Rachenring besteht aus lymphoepithelialeem Gewebe, speziell den *Tonsillae pharyngeae* und *palatinae* sowie der *Tonsilla lingualis*. Ein Teil der dort lokalisierten Karzinome stellt pathophysiologisch als auch morphologisch eine eigene Entität dar [16]. Analog zu Zervixkarzinomen zeigen die meisten Plattenepithelkarzinome eine Infektion mit HPV 16. Seltener sind Koinfektionen oder Infektionen mit HPV 18, 31 und 33 nachweisbar.

Humane Papillomaviren sind nicht das einzige Beispiel onkogener Viren im Bereich der Kopf-Hals-Tumoren. Seit mehreren Jahrzehnten ist die Assoziation des Epstein-Barr-Virus (EBV) mit Nasopharynxkarzinomen, auch als Schmincke-Tumoren bezeichnet, bekannt [17, 18]. Ihr Auftreten spielt vor allem im asiatischen Raum eine wichtige Rolle [19].

Weiterhin entwickeln Patienten mit einer Infektion durch humane Immundefizienzviren (HIV) häufiger Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich als HIV-negative Patienten [20].

Weitere pathogenetische Faktoren für oropharyngeale Karzinome stellen toxische Substanzen dar. Viele Umweltfaktoren und Toxine wurden mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen in Zusammenhang gebracht, unter anderem Perchlorethylen, Asbest,

Pestizide, Plastik- und Gummiprodukte, Naphthalin und Formaldehyd [21-27]. Eine vorausgegangene Strahlentherapie erhöht ebenfalls das Risiko von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [21] [10]. Weiterhin bergen hämatoonkologische Erkrankungen wie ein myelodysplastisches Syndrom, eine akute myeloische Leukämie und die Fanconi-Anämie ein hohes Risiko für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [28, 29]. Das Patientenalter liegt auch hier im Durchschnitt niedriger als bei Patienten mit Alkohol- und Nikotinkonsum. Risikofaktoren sind darüber hinaus auch eine mangelnde Mundhygiene sowie periodontale Erkrankungen [30]. Das in Asien weit verbreitete Betelnusskauen wurde ebenfalls als Risikofaktor beschrieben [27].

1.3 Klinische Manifestation von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen

HPV-assoziierte Karzinome unterscheiden sich in mehreren Aspekten von den noxen-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen. Zunächst fällt die charakteristische Lokalisation der Primärtumoren in den Bereichen des Waldeyerschen Rachenrings auf. In den USA sind ca. 60% der Plattenepithelkarzinome im Oropharynx HPV-assoziiert. In Kanada beträgt deren Anteil fast 80 %. In Europa zeigen ca. 15-30 % der Oropharynxkarzinome eine HPV-Assoziation [4]. Die IARC (*Agency for Research on Cancer*) bezifferte die Prävalenz von HPV in Mundhöhlenkarzinomen mit 3,9 % und in Oropharynxkarzinomen mit ca. 18,3 % [31, 32].

Ein weiterer Unterschied liegt in der Histomorphologie dieser Plattenepithelkarzinome. Während HPV-assoziierte Karzinome selten verhornend und basaloid differenziert sind, sind bei Tabak- und Alkohol-assoziierten Karzinomen oft eine Hyperkeratose, Hyperplasie oder Akanthose der Epithelschicht nachweisbar [33]. Die relativ vulnerablen Eigenschaften des lymphoepithelialen Kryptenepithels begünstigen eine Infektion mit humanen Papillomaviren. Das lymphoepitheliale Kryptenepithel zeigt eine funktionelle Analogie zum Übergangsepithel der zervikalen und anorektalen Transformationszone. Dieser Umstand erklärt auch gut den deutlich höheren Anteil HPV-assoziiierter Plattenepithelkarzinome in diesen Lokalisationen [34].

Aus epidemiologischer Sicht sind für HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinome weitere Unterschiede zu erkennen. So liegt das Manifestationsalter im Durchschnitt 10 Jahre niedriger als bei Patienten mit Noxen-assoziierten Karzinomen [9, 15, 35]. Und anders als bei Noxen-assoziierten Karzinomen erkranken bei HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinomen Männer

deutlich häufiger als Frauen. In der ICON-S-Datenbank z.B. sind 84 % der Patienten mit einem HPV-assoziierten Karzinom männlich [10].

Schließlich unterscheidet sich die klinische Präsentation von HPV-assoziierten Karzinomen von den Noxen-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen. Oropharynxkarzinome mit einer HPV-Assoziation können bereits bei kleinen Primärtumoren (pT1/pT2) eine lymphogene Metastasierung aufweisen. Nicht selten präsentieren sich diese Patienten mit großen Lymphknotenmetastasen im Halsbereich ohne klinischen Nachweis eines Primärtumors. Es liegt zunächst eine CUP(Cancer of Unknown Primary)-Situation vor, wobei der Nachweis einer HPV-Assoziation an der Lymphknotenmetastase auf die Primärtumorlokalisation hinweist. Nach mehreren Biopsieentnahmen im Oropharynx finden sich Hinweise auf den oft klinisch okkulten Primarius. Dieses Vorgehen nennt man auch „Mapping“. Diese Lymphknotenmetastasen zeigen oft eine zystische Degeneration, welche sonographisch zu der Fehldiagnose einer Halszyste führen kann [36].

Trotz der häufigen lymphogenen Metastasierung zeigt sich eine hämatogene Ausbreitung deutlich seltener und in deutlich geringerem Ausmaß als bei HPV-negativen Karzinomen [37, 38]. Das Auftreten von Zweitkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist bei HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen sehr gering [39]. Zweitkarzinome sind dagegen bei Noxen-assoziierten Plattenepithelkarzinomen aufgrund der Feldkanzerisierung häufiger zu beobachten.

1.4 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren werden als die häufigste sexuell übertragbare Infektionserkrankung in den USA beschrieben [40, 41]. In Europa sind die Daten zur Prävalenz einer HPV-Infektion sehr unterschiedlich [41]. HPV-Infektionen manifestieren sich häufig durch das Auftreten von Kondylomen im Genitalbereich (*Condylomata accuminata*) und anogenitalen Plattenepithel-läsionen im Bereich der Zervix, Vagina, Vulva sowie des Penis und der Analregion.

Die Rolle der HPV-Infektion in der Ätiologie und Pathogenese von Plattenepithelkarzinomen wird durch folgende Faktoren belegt: Sowohl die Virus-DNA als auch die Expression der E6- und E7-Onkogene sind in anogenitalen und oralen Plattenepithelkarzinomen, aber auch präkanzerösen Läsionen nachweisbar. Die Expression der E6- und E7-Onkogene ist mit dem Tumorwachstum assoziiert. Die E6- und E7-Onkogene können auf molekularer Ebene die Zellzyklus-regulierenden Funktionen der befallenen Zellen verändern, indem sie die

Einleitung

Tumorsuppressorproteine p53 und pRb inaktivieren. Das Protein p53 fungiert als ein Regulatorprotein des Zellwachstums. Es greift im Kontrollpunkt der G0-Phase des Zellzyklus zum Übergang auf die G1-Phase ein. Weiterhin kann dieses als Tumorsuppressor bei Vorkommen von chromosomalen Defekten die Zellteilung verhindern, so dass DNA-Reparatur-Enzyme eingreifen können [42].

Seit 2004 werden Papillomaviren als eigene Virenfamilie, die *Papillomaviridae*, angesehen. Die HPV-Klassifikation beruht auf der phylogenetischen Analyse des L1-Gens [43]. Bisher sind ungefähr 150 unterschiedliche HPV-Typen bekannt; für 120 davon wurde das gesamte Genom bereits sequenziert. Die humanen Papillomaviren, die die Schleimhäute befallen, gehören zum Genus α . Es gibt weitere Geni von humanen Papillomaviren, z.B. β , γ , μ und ν ; diese kommen allerdings nur auf oberflächlichen Hautläsionen vor [44].

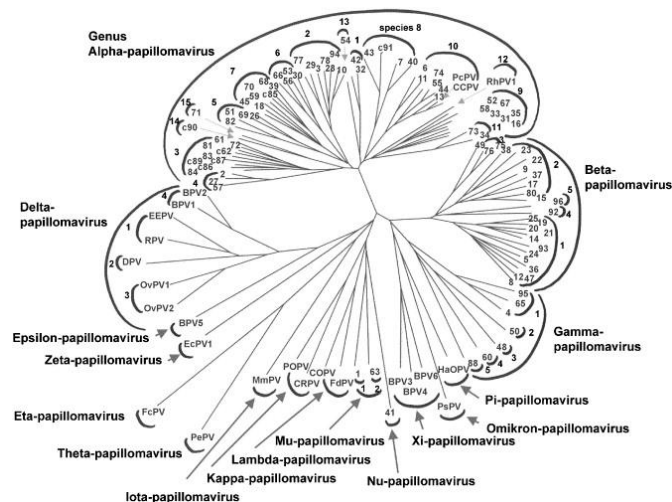


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der humanen Papillomaviren

Humane Papillomaviren sind gekapselte, doppelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die Epithelzellen infizieren können. Ihre Größe beträgt 52-55nm [45, 46]. Das Genom dieser Viren ist ungefähr 8.000bp lang. Zu unterscheiden sind *early* und *late* genes (frühe und späte Gene respektive); bisher wurden 6 *early genes* (E6, E7, E1, E2, E4, E5) und 2 *late genes* (L1, L2) beschrieben. Für die Pathogenese der HPV-assoziierten Karzinome spielen die viralen E6- und E7-Onkogene eine entscheidende Rolle. Diese inaktivieren jeweils die zellregulatorischen Proteine p53 und Rb. Die *early genes* E1-E4 kodieren für Proteine, welche die Virusreplikation und -transkription regulieren. Genauer betrachtet ist das E1-Protein für die virale DNA-Replikation notwendig. Das E2-Protein spielt in der Transkription und Replikation eine Rolle. Das E4-Protein interagiert mit dem Keratinzytoskelett und dem Intermediärfilament, um die Virussekretion aus der Wirtszelle zu initiieren. Das E5-Protein ist ein weiteres Onkoprotein, das

Einleitung

die kontinuierliche Virusproliferation in der Wirtszelle fördert und die Apoptose hemmt. Zuletzt beschrieben wurden die Proteine E3 und E8, die ebenfalls in der *early region* kodiert werden. Diese werden nur in wenigen HPV-Typen wie HPV 1, 11, 18,16, 31, 33 gefunden. Das E3-Protein ist eine Ubiquitin-Ligase (UBE3A), die an das E6-Protein von HPV 16 und HPV18 bindet und die p53-Degradierung fördert [47] [48]. Ein weiteres Protein ist das E8^{E2}, das als Regulatorprotein in der DNA-Replikation fungiert [49, 50] und in den HPV-Typen 11, 31 und 16 nachgewiesen wurde. Es interferiert in seiner Funktion mit der E2-abhängigen Gentranskription und kann die Replikation von Virusplasmiden inhibieren [50]. Die *late genes* L1 und L2 kodieren für Proteine des Viruskapsids [51].

Des Weiteren sind bei den HP-Viren *low-risk*- und *high-risk*-Typen zu unterscheiden, je nachdem, welche Arten von Läsionen überwiegend mit ihnen assoziiert sind. *low-risk*-Typen kommen in gutartigen Plattenepithelläsionen oder Kondylomen vor. *high-risk*-Typen werden dagegen meist bei Plattenepithelkarzinomen oder präkanzerösen Läsionen nachgewiesen. In Tabelle 1 sind die bereits bekannten *high*- und *low-risk*-HPV-Typen aufgelistet [44, 52].

Tabelle 1: *low*- und *high-risk*-HPV-Typen

<i>high-risk</i>-Typen	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
<i>low-risk</i>-Typen	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 82

1.4.1 Genomstruktur

Wie bereits beschrieben lässt sich das HPV-Genom in frühe und späte Gene unterteilen. Entscheidend für den Pathomechanismus der Viren ist die Synthese der E6- und E7-Proteine. Das E6-Protein ist ein 16-18kDa großes Protein, das sich aus ca. 150-160 Aminosäuren zusammensetzt. Es greift in die Zellzyklusregulation der Wirtszelle ein, indem es zur Proteasom vermittelten p53-Degradation führt [53]. Das E7-Protein ist mit 11kDa etwas kleiner und 100 Aminosäuren lang. Beide Proteine lassen sich in kleinere Mengen im Zellkern nachweisen. Im HPV-Genom lassen sich auch Sequenzen nachweisen, die für keine Proteine kodieren, und zwar die non-coding-Region (NCR), und die long-control-Region (LCR). Diese Sequenzen sind entscheidend für die Replikation des Virus und die Transkription viraler Gene, da sie die Promoter- und Enhancer-Regionen für die viralen Gene enthalten. Die LCR zeigt die größte Variabilität im HPV-Genom [51].

Einleitung

Interessant ist, dass die HPV-DNA in infizierten Zellen in episomaler Form, also extrachromosomal, oder integriert im Zellgenom vorkommt. Auch eine Mischung beider Formen wurde beschrieben [51, 54, 55].

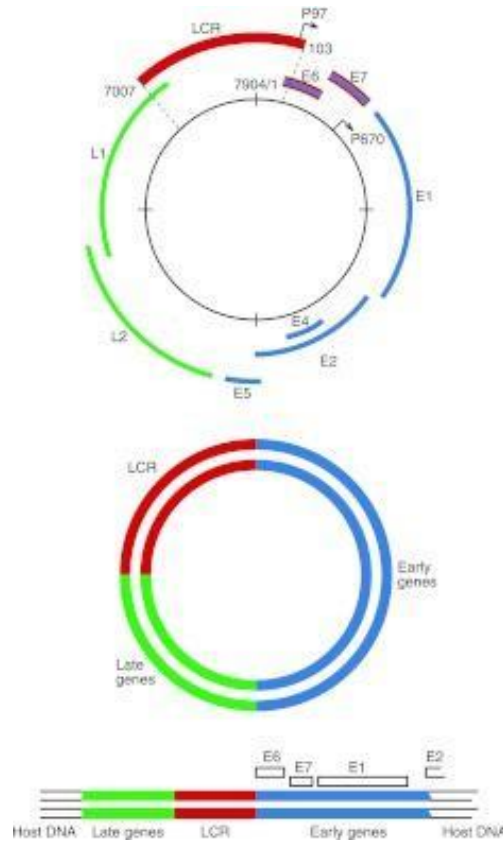


Abbildung 4: Virusgenom des humanen Papillomavirus. Zu den *early genes* zählen die Sequenzen, die für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 kodieren. Die *late genes* kodieren die L1 und L2, aus denen das Kapsid gebildet wird. Die Onkogene werden lila angezeigt und die *early proteins* E1-5 in Blau sowie die *late genes* in L1 und L2 in Grün. Die LCR-Region, die Promoter und Enhancer enthält, ist rot markiert [51]. Die obere Abbildung zeigt die Struktur des HPV als zirkuläres Molekül. Die untere Abbildung zeigt ein bereits in das Wirtsgenom integriertes Virus.

1.4.2 Pathophysiologie

Die HPV-Infektion geht von den Basalzellen des lymphoepithelialen Kryptenepithels der Gaumentonsille und des Zungenrands aus. Wenn ein Trauma oder eine Erosion des Plattenepithels vorliegt, kommen die HPV-Viren in Kontakt mit der Basalmembran. Da die Papillomaviren keine eigenen Replikationsenzyme besitzen, müssen jene des Wirtsgenoms genutzt werden. Das setzt eine Infektion teilungsfähiger Zellen voraus. Aufgrund der hohen Teilungsrate bieten nur die basalen und suprabasalen Zellen des Plattenepithels die Voraussetzungen einer geeigneten Wirtszelle für eine initiale HPV-Infektion.

Einleitung

Die Virusintegration in die Wirtszelle erfolgt über das Viruskapsid. Humane Papillomaviren binden sich an Anteile der Basalmembran und der extrazellulären Matrix wie Heparansulfatproteoglykan und Laminin 5 und können so in die Wirtszelle eindringen.

Durch die Bindung der Kapsidkomponente L1 an Heparansulfatproteoglykane kommt es zu einer Konformationsveränderung des Kapsids und einer proteolytischen Abspaltung der L2-Komponente mit weitergehender Exposition des L1-Epitops. Nach Bindung des L1-Epitops an den spezifischen Rezeptor wird das Virusgenom in der Zelle aufgenommen und an die späten Endosomen transportiert, wo das Genom des Virus freigesetzt werden kann. Die Transkription des Virusgenoms kann somit stattfinden [51, 56].

HPV 16 besitzt keine eigene DNA-Polymerase und die E1- und E2-Proteine sind die Schlüsselproteine für die Replikation des Virus. Das E2-Protein akkumuliert in der Zelle und bindet an den Promoter p97 (siehe Abbildung 4), so dass die Expression von E6 und E7 herunterreguliert wird. Der Promoter p97 generiert alternativ gespligte mRNAs, die alle polyadenyliert sind [57]. Das erlaubt den Zellen, sich weiter zu differenzieren und auf der Oberfläche des Plattenepithels zu wandern.

Die Zelldifferenzierung trägt zur Aktivierung des *late*-Promoters p670 bei, sodass alle HPV-Proteine außer E6 und E7 exprimiert werden [58]. In dieser Phase kommt es zum Splicing und einer Polyadenylierung in den infizierten Zellen. E6 und E7 werden früh in der Infektion der Zelle exprimiert, aber für die *late*-Protein-Synthese ist die Zelldifferenzierung notwendig. Hohe Konzentrationen von E2-Protein führen zu einem Übergang vom frühen ins späte Genexpressionsprogramm und die L1- und L2-Proteine werden exprimiert, so dass Virionen produziert und aus der Zelle freigesetzt werden [59].

Je nach HR-HPV-Typ wurden verschiedene E6/E7-Spliceprodukte beschrieben. Das zumeist nachgewiesene verkürzte Spliceprodukt von E6 ist E6*[60, 61]. Der Splicingmechanismus von HPV16 ist bisher am besten untersucht. Weitere bisher identifizierte E6/E7-Spliceprodukte sind E6*I, E6*II, E6*III, E6E7, E6E7*II, E6*IV, E6*V und E6*VI[62-66]. Das Spliceprodukt E6*I wurde in Vergleich zum E6-Transkript in höheren Mengen in der Epithelzelle nachgewiesen [67-69].

Einleitung

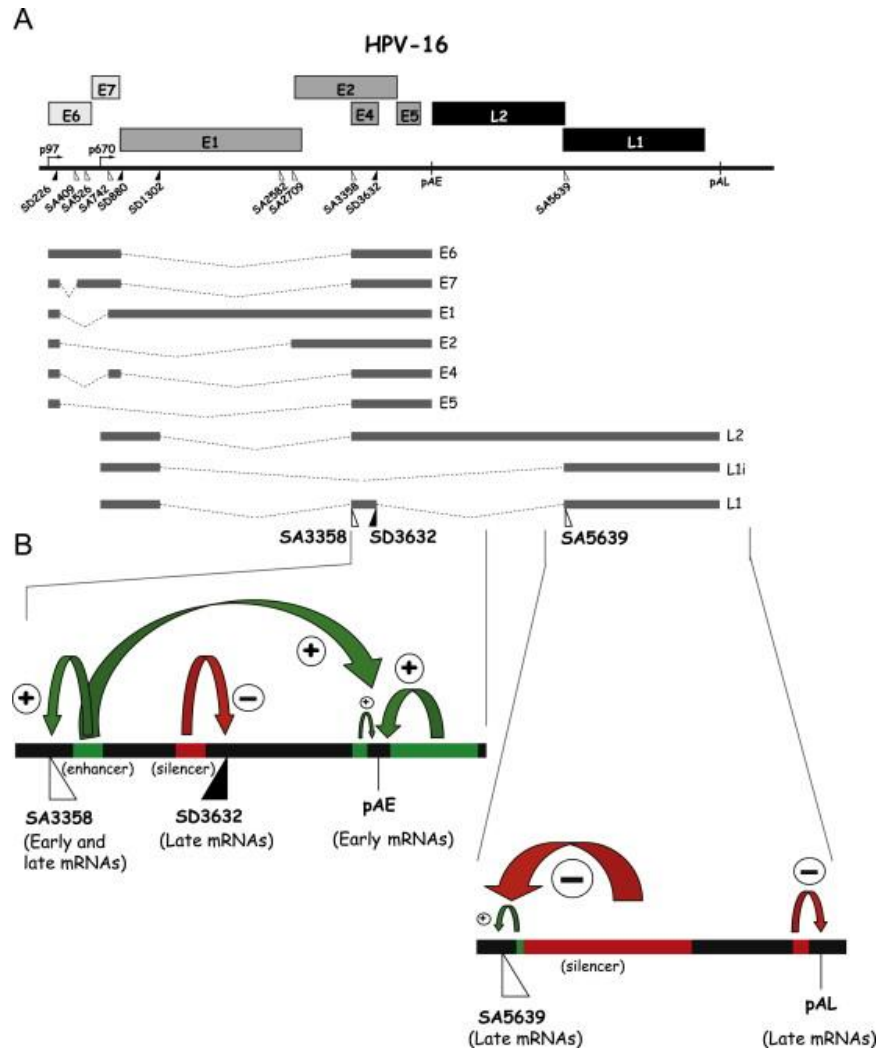


Abbildung 5: HPV16-Virusgenom und mögliche Spliceprodukte [57].

Nach der Infektion der Basalzellen gelangen die infizierten Zellen im Rahmen der physiologischen Ausreifung des Epithels in höhere Schichten und differenzieren sich aus. Durch diese Ausdifferenzierung kommt es zum kompletten Verlust der Replikationskontrolle der Zellen, zur vermehrten Synthese von viralen Proteinen des späten Viruspromoters und zeitgleich zu einer vermehrten Transkription des Virusgenoms. Die viralen Kapsidproteine L1 und L2 werden exprimiert. Somit können infektiöse Viruspartikeln gebildet und aus den Superficialzellen freigesetzt werden, die weitere Schleimhautareale oder Individuen infizieren [33, 34, 55].

Einleitung

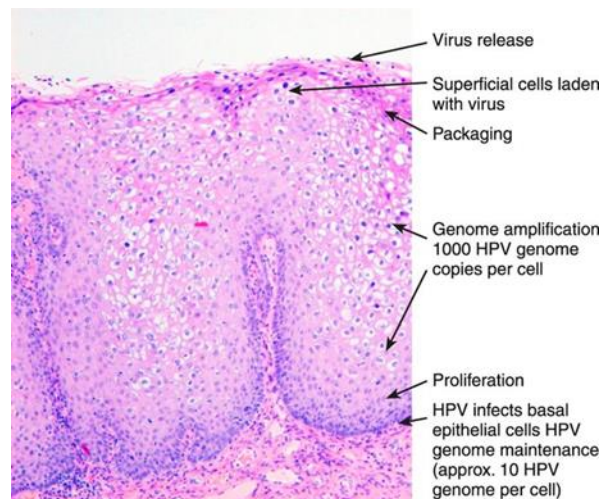


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer HPV-Infektion in den verschiedenen Schichten des Plattenepithels [51].

Durch die HPV-Infektion kommt es zu einer gesteigerten Zellproliferation und zu einer Architekturstörung des Plattenepithels. Histomorphologisch lassen sich charakteristische Zellveränderungen nachweisen, die Koilozyten. Die Bezeichnung ist vom griechischen Wort *koilos* für Deutsch „rund“ abgeleitet. In diesen Zellen ist der Zellkern und um den Zellkern ein leeres Zytoplasma zu erkennen (Abbildung 5). In den Koilozyten lässt sich im Elektronenmikroskop eine hohe Zahl an Viruskopien nachweisen [70]. Die Koilozyten gelten als pathognomonisches Zeichen einer HPV-Infektion.

1.5 HPV-Nachweismethoden

Für den Nachweis einer Infektion mit humanen Papillomaviren stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. In der Praxis werden zumeist der immunhistologische Nachweis von p16 als Screeningmethode, die HPV-in Situ-Hybridisierung (HPV-ISH) und eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) als Nachweismethoden verwendet.

Die zumeist angewandte Methode zum Nachweis einer HPV-Assoziation bei Oropharynxkarzinomen ist der immunhistologische Nachweis von p16. Diese Methode ist mit Formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) mit kommerziell erhältlichen Antikörpern in der Pathologie sehr leicht durchzuführen. p16 dient im klinischen Alltag als Surrogatmarker für den Nachweis einer HPV-Assoziation von Oropharynxkarzinomen.

Das p16-Protein ist ein Zyklin-abhängiges Kinase (CDK)-Inhibitor-Protein der Familie Ink4. Diese hemmen spezifisch CDK4 und CDK6. Die Proteine der CDK-Inhibitor (CKI)-Familie greifen an einem Kontrollpunkt der Phase G1 des Zellzyklus ein und verhindern den Übergang von der G1-

Einleitung

Phase zur S-Phase. Die Aktivität von pRb hängt von seinem Phosphorylierungsgrad ab. Heterodimere aus Zyklin D und CDK4 oder CDK6 können pRb in einen phosphorylierten Zustand bringen, so dass die Zelle in die S-Phase übergehen kann. Als Tumorsuppressorgen greift p16 in diese Übergangsphase ein. Es bindet direkt an CDK4 und 6 und interagiert so mit den D-Zyklinen [71]. Das Retinoblastomprotein bleibt so in einem hyperphosphorylierten Zustand. So kann der E2F-Transkriptionsfaktor an das pRb binden und die Übergangsphase inhibieren. Die HPV-Integration resultiert in dem Verlust des viralen E2-Gens und somit zur Überexpression der E6- und E7-Onkogentranskripte. Durch Bindung des E7-Proteins an das pRb wird dieses degradiert, wodurch es zu einer kompensatorischen Überexpression des p16-Proteins kommt [71-74]. Nur eine durchgehend kräftig positive Reaktion in der Immunhistochemie gilt als Anhalt für eine HR-HPV-Infektion. Die Sensitivität und Spezifität der Methode ist somit relativ hoch [39, 72, 75].

Die Polymerase-Kettenreaktion oder Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird zur Amplifikation von DNA oder cDNA verwendet. Als cDNA bezeichnet man die aus extrahierter RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase synthetisierte komplementäre DNA, die als Matrix für die Translation dient. Die PCR läuft in unterschiedlichen Phasen ab. Zuerst beginnt bei einer hohen Temperatur von ca. 95 °C die Denaturierung der doppelsträngigen DNA. In der anschließenden Annealingphase werden bei einer niedrigeren Temperatur (55 °C) die spezifischen Primer an die einzelsträngige DNA gebunden. Ein PCR-Zyklus endet mit der Elongation der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq Polymerase) bei einer Temperatur von 72°C. Diese Methode kann sowohl an frischem als auch an FFPE-Material durchgeführt werden, obwohl sie an frischen Proben aufgrund der geringeren Degradation eine höhere Sensitivität besitzt [9].

Eine in der Praxis ebenfalls verwendete Methode ist die HPV-in situ-Hybridisierung (HPV-ISH). Der Vorteil der HPV-ISH ist die Möglichkeit einer topographischen Zuordnung der HPV-Infektion zum Tumor oder der umgebenden Schleimhaut; HPV-ISH erlaubt also zu unterscheiden, ob sich das Virus in den Tumorzellen oder in den benachbarten Epithel- oder Stromazellen befindet, so dass die klinische Relevanz der Infektion beurteilt werden kann. Weiterhin lässt HPV-ISH eine Aussage zu, ob sich das Virus im Zellkern oder im Zytoplasma befindet, ob es sich also um im Genom integrierte oder episomale DNA handelt. Das Ergebnis kann man mikroskopisch evaluieren. Ein punktuell Signal weist auf eine integrierte HPV-DNA hin, im Unterschied zu einem verstreuten Signal, das auf eine episomale HPV-DNA schließen lässt. Die Spezifität der

Einleitung

HPV-ISH ist somit sehr hoch, allerdings ist die Sensitivität der Methode begrenzt; ein positives Ergebnis lässt sich erst ab ungefähr 10 Viruskopien nachweisen [76].

Trotz deutlich höherer Sensitivität gibt es auch einige Nachteile der PCR im Vergleich zur HPV-ISH. Die PCR ist technisch aufwendig. Ein weiterer wichtiger Nachteil der PCR ist die fehlende Nachweismöglichkeit, ob es sich um eine episomale oder im Genom integrierte DNA handelt, und ob die nachgewiesene HPV-DNA aus der Tumorzelle stammt oder aus einer anderen Epithelzelle. Somit ist für das PCR ununterscheidbar, ob es sich um eine klinisch signifikante Infektion handelt oder nicht [34]. Darüber hinaus ist die Primerauswahl für die amplifizierten Gene wichtig für das Untersuchungsergebnis. Sehr oft werden Primer verwendet, die an die L1-Region binden; diese Region kann in einer signifikanten Anzahl von Proben bei der Integration des Virus in die Zelle verloren gehen, was die Sensitivität beeinträchtigen dürfte. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, stehen Primer zur Verfügung, mit Hilfe derer kleine DNA-Sequenzen amplifiziert werden [15].

1.6 Therapie und Prognose

Die Therapie der Oropharynxkarzinome erfolgt primär chirurgisch. Der Primärtumor wird im Gesunden entfernt, meistens in Kombination mit einer adjuvanten Strahlentherapie. In Abhängigkeit von Größe und Lokalisation wird der Gewebedefekt mit einem freien oder gestielten Transplantat (z.B. Radialislappen) gedeckt. Eine Operation der Halsweichteile (*Neck Dissection*) wird auch – je nach Größe und Lokalisation des Primärtumors – ein- oder beidseitig durchgeführt. Eine *Neck Dissection* beinhaltet die Ausräumung der zervikalen Lymphknoten ipsilateral oder beidseitig. Im Rahmen der radikalen *Neck Dissection* werden zusätzlich *M. sternocleidomastoideus*, *V. jugularis interna* und *N. accessorius* reseziert, mit resultierenden Bewegungseinschränkungen des Kopfes und der Schulter [77].

Tabelle 2: Chirurgische Therapie der Oropharynxkarzinome

T-Stadium	Chirurgische Therapie bei Oropharynxkarzinom
Tis	Exzision
T1	Transorale oder transzervikale Resektion bei Befall des Zungengrundes, primärer Defektschluss ist selten notwendig
T2	Transzervikale laterale Pharyngotomie, mediane oder suprahyoidale Pharyngotomie oder transorale Resektion mit plastischer Rekonstruktion mit reanastomosierten Radialislappen oder anderen Transplantaten
T3	Transzervikale Resektion, laterale Pharyngotomie und temporale Mandibulotomie Bei Befall des Zungengrundes Plastische Rekonstruktion
T4	Nicht unter Erhalt der Organe oder Funktionen zu erhalten. Transzervikale Resektion evtl. Laryngotomie bei Befall des Zungengrundes. Plastische Rekonstruktion.

Einleitung

Postoperativ ist eine Bestrahlung des Tumorgebiets und der Lymphabflusswege indiziert. Alternativ kann bei Primärtumoren mit großer Ausdehnung (Stadium T3 und T4) eine primäre Strahlentherapie ggf. simultane Radiochemotherapie sinnvoll sein [78]. Tabelle 2 enthält die chirurgischen Therapien in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Tabelle 3: Prognostische Stadien [3]

T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	Prognostisches Stadium
Tis	N0	M0	Stadium 0
T1	N0	M0	Stadium I
T1, T0	N1	M0	Stadium II
T2	N0 N1	M0	Stadium II
T1, T0	N2	M0	Stadium III
T2	N2	M0	Stadium III
T3	N0 N1 N2	M0	Stadium III
T1, T2, T3	N2	M0	Stadium IVA
T4a	N0 N1 N2	M0	Stadium IVA
Jedes T	N3	M0	Stadium IVB
Jedes T	Jedes N	M1	Stadium IVC

1.7 Zielsetzung

In dieser retrospektiv angelegten Studie sollte die pathogenetische Bedeutung von HPV-Infektion für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen untersucht werden. Dazu wurde ein Kollektiv aus 96 Patienten gebildet, welche im Zeitraum von 2002 bis 2008 an der Ludwig-Maximilians- Universität München wegen eines Plattenepithelkarzinoms des Oropharynx operativ behandelt wurden. Nach Anonymisierung wurde an dem FFPE-Material folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Anteil der Oropharynxkarzinome mit immunhistochemischem Nachweis einer p16 INK4a Expression als Surrogatmarker für eine high-risk HPV Assoziation der jeweiligen Karzinome
2. Anteil der Oropharynxkarzinome mit molekularpathologischem Nachweis einer HPV-Infektion mit Hilfe von nested-PCR-Verfahren.
3. Charakterisierung der zugrundeliegenden HPV-Typen bei HPV-positiven Karzinomen aus Fragestellung 2.
4. Versuch des Nachweises der HPV E6/E7 Onkogenaktivität an FFPE-Material der HPV-positiven Karzinome aus Fragestellungen 2 und 3.
5. Korrelation der immunhistochemischen (p16 INK4a) und molekularpathologischen (PCR, RT-PCR) Befunde untereinander und mit Tumorlokalisationen und Tumorstadien.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In dieser retrospektiv angelegten Studie wurde ein Kollektiv aus 96 Patienten, die im Zeitraum zwischen 2002 und 2008 an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München wegen eines Oropharynxkarzinoms operiert wurden, zusammengestellt.

2.2 Vorgehensweise

2.2.1 DNA-Isolierung und die RNA-Gewinnung

Nach der operativen Entnahme des Gewebes wurden alle Resektate in Formalin mindestens für 24 Stunden fixiert. Nach der makroskopischen Beurteilung des Exsidsats wurde dieses zugeschnitten, maschinell entwässert und in Paraffin eingebettet. Nach Anonymisierung des Untersuchungsmaterials erfolgte die Anfertigung von Leerschnitten. Für die DNA-Isolierung und die RNA-Gewinnung wurden 3-5µm dicke Schnitte auf nicht beschichteten Objektträgern angefertigt. Das Tumorgewebe wurde unter dem Mikroskop markiert und das markierte Tumorgewebe wurde anschließend vom Objektträger mikrodisektiert. Das gewonnene Material wurde anschließend für die Nukleinsäureextraktion verwendet.

2.2.2 Kontrollen

Für sämtliche DNA-Untersuchungen wurden jeweils eine positive und eine negative Kontrolle mituntersucht. Als Positivkontrolle wurde eine gesicherte HPV-positive Probe eines Zervixkarzinoms verwendet sowohl für die sogenannte housekeeping-PCR, als auch für die MY 09/11- und GP 5+/6+ PCRs verwendet. Für die Multiplex-PCRs zur HPV-Typisierung wurden Plasmide der verschiedenen HR-HPV-Typen verwendet, in welchen die komplette Sequenz des Amplifikationsprodukts enthalten war. Für die RNA-Untersuchung wurde bei der housekeeping-PCR eine kommerziell erhältliche Positivkontrolle der Firma *Roche* (UPL#4, 8nt, cat.no. 04685016001) und bei den HPV RT-PCRs wurde die mRNA der Probe 44 verwendet. Alle Positivkontrollen wurden bei -20 °C gelagert.

Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet.

2.2.3 Histopathologie

Die Histologie wurde nach der pTNM-Klassifikation (UICC 2002) beurteilt. Ab 2017 gilt die überarbeitete pTNM-Klassifikation (UICC 2017) der Oropharynxkarzinome [80-82]. Die pTNM-Klassifikation, das Tumorgrading (G) und die Residualtumorklassifikation (R) wurden nach der histopathologischen Aufarbeitung durch im Rahmen der Routinediagnostik im Pathologischen Instituts der LMU bestimmt. In der pTNM-Klassifikation wird die Größe und die lokale Ausdehnung des Primärtumors bestimmt und als T-Stadium kategorisiert. In der Klassifikation werden die Lymphknotenmetastasen des Tumors erfasst und als N-Stadium kategorisiert. Die N-Klassifikation ist für die oropharyngealen und hypopharyngealen Karzinome einheitlich. Das M-Stadium beschreibt Fernmetastasen, also Metastasen in Organen außerhalb des den Primärtumor enthaltenden Organs.

Die pTNM-Klassifikation erfasst noch weitere Eigenschaften der untersuchten Tumore. Hierzu gehören eine etwaige Blut- und Lymphgefäßinvasion, Perineuralscheideninvasion sowie der Resektionsstatus postoperativ, aber auch das Grading. Das Grading ist ein Maß für die biologische Aggressivität eines Tumors. Ein gut differenzierter Tumor wird als G1 klassifiziert; in diesem ist das Tumorwachstum langsam. Dem Grad G2 werden mäßig differenzierte Tumoren und dem Grad G3 wenig differenziertes Tumoren zugeordnet. Die Einstufung erfolgt mit Hilfe der Kern- und Zellmorphologie. Ein höheres Grading geht mit einem aggressiveren Wachstum einher.

Die exakte pTNM-Klassifikation (UICC 2002) der Oropharynx-Karzinome ist in den Tabellen 4, 5 und 6 dargestellt. Für den anatomischen Bezirk der Seitenwand gibt es folgende Einteilung:

Tabelle 4: Einteilung der Tumorgröße im Bereich des Oropharynx (UICC 2002)

Primärtumor	
Tx	Primärtumor ist nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor größer als 2 cm aber nicht mehr wie 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor größer als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur linguale Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen (Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, <i>Lamina medialis</i> des <i>Processus pterygoideus</i> , harten Gaumen oder Unterkiefer)
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie <i>M. pterygoideus lateralis</i> , <i>Lamina lateralis</i> des <i>Processus pterygoideus</i> , Schädelbasis oder umschließt die <i>A. carotis interna</i>)

In der neuen pTNM-Klassifikation wurden die Stadien T4a und T4b zum T4-Stadium zusammenfasst. Aufgrund der fehlenden Basalmembran im Bereich des Waldeyer'schen Rachenrings wurde die Bezeichnung Tis als *Karzinoma in situ* für die Oropharynxkarzinome abgeschafft.

Um den N-Status als N0 zu bewerten, müssen alle untersuchten Lymphknoten ohne Nachweis von Tumorgewebe sein (pN0) oder die klinische Untersuchung keinen Hinweis auf eine Lymphknotenmetastase geben (cN0). Die weiteren N-Stadien werden analog zu den Tumoren im HNO-Bereich eingestuft.

Bei einer selektiven Lymphadenektomie und histologischen Untersuchung werden üblicherweise 6 oder mehr Lymphknoten bzw. bei einer radikalen oder modifiziert-radikalen Lymphadenektomie und histologischen Untersuchung üblicherweise 10 oder mehr Lymphknoten untersucht.

Tabelle 5: Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen im oro- und hypopharyngealen Bereich (UICC 2002)

Lymphknoten	
Nx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, ≥ 3 cm in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, > 3 cm und < 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen und kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten $>$ in größter Ausdehnung

Aufgrund der Zunahme der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome wurde der HPV-Status in der überarbeiteten Klassifikation von 2017 miteinbezogen. Dafür wurde die Bestimmung des p16-Status als Surrogatmarker für die HPV-Infektion angesehen. Der p16-Status ist dann für die Einteilung der N-Stadien in der aktuellen pTNM-Klassifikation entscheidend. In den Tabellen 7-9 sind die Einteilungen für p16-negative und -positive Karzinome aus pathologischer und klinischer Sicht aufgeführt oder definiert.

Bei p16-positiven Karzinomen gibt es deutliche Unterschiede zwischen der klinischen und histopathologischen Einteilung. Aus einer Studie aus dem Jahr 2015 ergab sich, dass die Anzahl der befallenen Lymphknoten und nicht die Größe oder das kapselüberschreitende Wachstum für die prognostischen Stadien entscheidend ist [83]. Bei p16-negativen Karzinomen hat das kapselüberschreitende Wachstum allerdings einen negativen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung.

Tabelle 6: Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen für p16-negativen im oropharyngealen Bereich (UICC 2017)

Lymphknoten	
Nx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem unilateralem Lymphknoten, ≤3cm in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem unilateralem Lymphknoten, >3cm und ≤6cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤6cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in multiplen bilateralen und kontralateralen Lymphknoten, ≤6cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten >6cm in größter Ausdehnung

Tabelle 7: Pathologische Einteilung der regionalen Lymphknotenmetastasen für p16-positive Oropharynxkarzinome pathologisch (UICC 2017)

Lymphknoten	
pNx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	1-4 Lymphknotenmetastasen
pN2	≥5 Lymphknoten

Tabelle 8: Fernmetastasen pTNM-Klassifikation

Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

2.2.4 Vermeidung von Kontaminationen

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden jeweils die DNA- und RNA-Extraktion sowie die PCR-Vorbereitung, die DNA-Amplifikation und das Arbeiten mit Amplifikationsprodukten räumlich getrennt durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde destilliertes, autoklaviertes Wasser verwendet. Es gab keine PCR-Untersuchung mit Nachweis eines Amplifikats in der Negativkontrolle.

2.3 Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen

2.3.1 DNA-Extraktion

Die zur HPV-Typisierung angefertigten ungefärbten Schnittpräparate wurden zwei Mal für jeweils 15 min zur Entfernung des Paraffins in Xylol eingelegt und zwei Mal für jeweils 10 min in 100 % Ethanol gewaschen. Um bei der Dissektion das Tumorareal vom gesunden Gewebe abgrenzen zu können, wurde der entparaffinierte Leerschnitt mit einem Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Serienschnitt verglichen. Im Vorfeld erfolgte die Beurteilung der HE-gefärbten Schnitte und die Markierung des zu entnehmenden und molekular zu analysierenden Tumorareals unter mikroskopischer Kontrolle mit Sicherheitsabständen zum unauffälligen Plattenepithel. Die Mikrodissektion des Tumorareals diente der Vermeidung potentieller Kontamination durch eine mögliche HPV-Infektion der angrenzenden nicht-neoplastischen plattenepithelialen Schleimhaut. Das entnommene Gewebe wurde mit einer Pipettenspitze abgetragen.

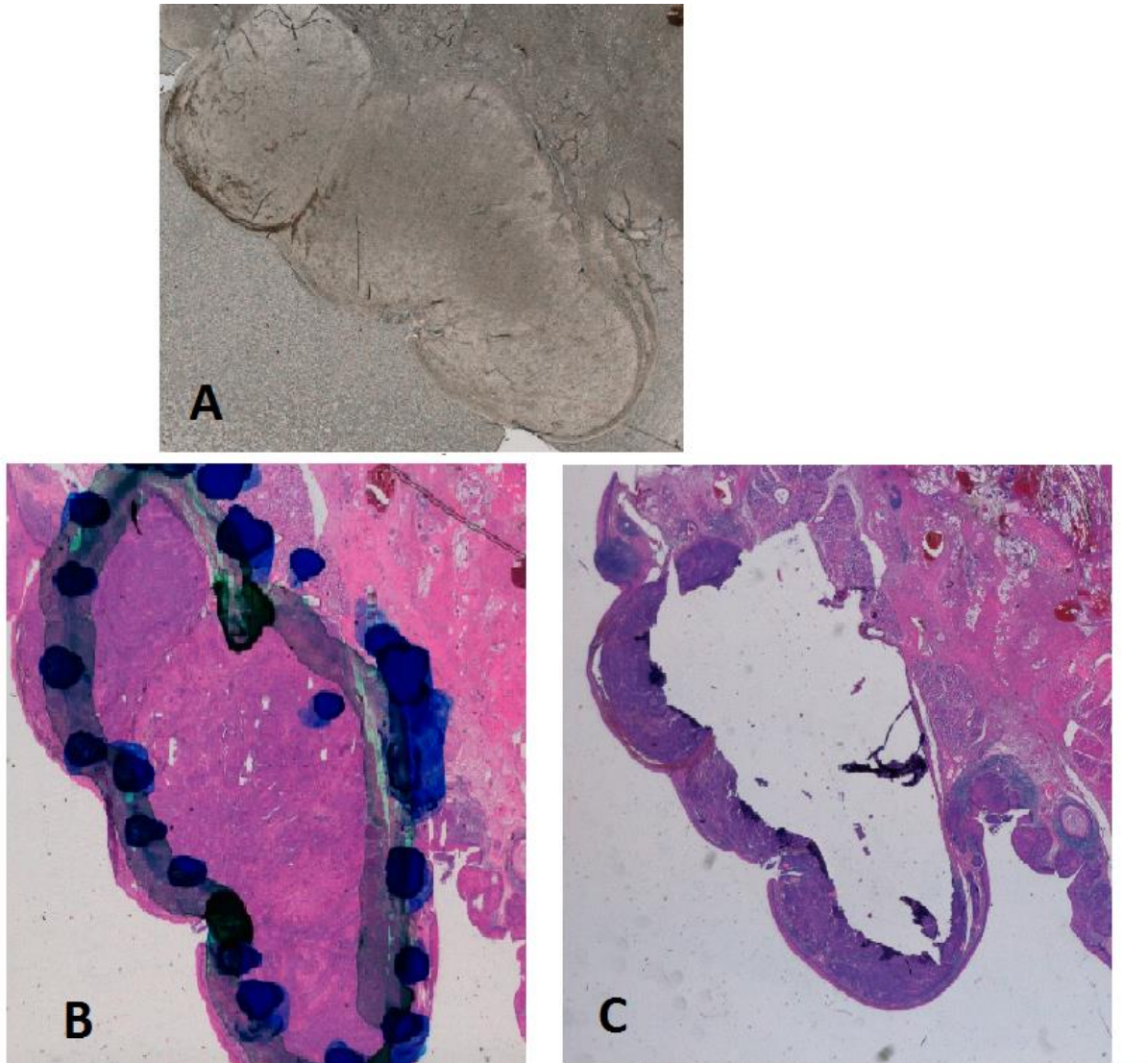


Abbildung 7: (a) zeigt das ungefärbte Schnittpräparat aus Probe 102, (b) den HE-gefärbten Serienschritt. (c) zeigt den HE-gefärbten Serienschritt nach Mikrodissektion des Tumorgewebes.

Für die DNA-Extraktion wurde das *QIAamp DNA Micro-Kit* (QIAGEN QIAamp DNA Micro Kit, Cat. Nr 56304) verwendet. Um die Tumorzellen vom Objektträger abzutragen, wurden 180 µl ATL-Lysepuffer verwendet und das Material wurde in ein Eppendorfgefäß übertragen. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde die Probe gevortext und im Thermoschüttler (Kisker, SN 430810076) bei 56 °C für 18h zum Verdau von Histonproteinen inkubiert. Nach dem Verdau wurden 200 µl AL-Puffer zur Inaktivierung der Proteinase K dazupipettiert und die Probe wurde für 15s gevortext und 1min bei 16000 rcf(relative centrifugal force) zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 D/ 5415 R, SN 0023629). Anschließend wurde die Probe mit 200 µl Ethanol (100 %, bei 4°C gekühlt) gemischt, gevortext und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Probe für 1min bei 16000rcf zentrifugiert wurde, wurde das Lysat in ein *QIAamp Mini Elute Column* gegeben und bei 6000rcf für 1 min zentrifugiert. Die Probe wurde

anschließend mit 500 µl AW1-Puffer und 500 µl AW2-Puffer gewaschen und bei 6000 rcf für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde jeweils verworfen. Nach 3 min Zentrifugation bei 16000 rcf wurde die DNA mit 15 -20 µl destilliertem, autoklaviertem Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration wurde in einem Aliquot von 1,2 µl bei 260 nm am Spektrophotometer (NanoDrop ND-100, PeqLab) bestimmt. Bei DNA-Konzentrationen über 50 ng/ µl wurde die Probe auf 50 ng/ µl mit destilliertem, autoklaviertem Wasser verdünnt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen

Alle PCR-Reaktionen wurden mit Endvolumina von 15 µl in einer DNA-Workstation Typ UVC/T-M-AR (G. Kisker Biotech, SN 840808004) vorbereitet und in einem Veriti-Thermocycler (Applied Biosystems, SN 299022527) durchgeführt. Zur Untersuchung der extrahierten DNA wurden je 30ng extrahierter Gesamt-DNA als Template und 0,6 µl PCR-Produkt zur Reamplifikation in die nested-PCR eingesetzt.

Der Reaktionseinsatz enthielt 10x konzentriertes PCR-Gold-Puffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, Applied Biosystems), jeweils 25 mM der vier dNTPs (Fermentas), je 5 oder 15 pM PCR-Primer und 0,5 U thermostabile Taq-Polymerase (AmpiTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems). Die verwendeten Primer wurden durch die Firma *TIB Molbiol* (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Primerkonzentration war für die β-globin- und MY09/11-PCR auf 5µM verdünnt und für die GP5+/6+-sowie Multiplex-PCR auf 15 µM.

Der HPV-Nachweis und die Typisierung der extrahierten DNA wurden mittels eines bereits etablierten E6-nested-Multiplex-PCR-Assay durchgeführt [81, 84]. Um die strukturelle Integrität der DNA zu prüfen, wurde zunächst ein Teil des humanen β-Globin-Gens mittels PCR amplifiziert [85]. Nur positive Fälle wurden weiteruntersucht. Zum Nachweis einer HPV-Infektion wurden PCR-Reaktionen mit den beiden in der Literatur am häufigsten benutzten L1-Konsensus-Primern MY09/11 und GP5+/6+ durchgeführt [44, 86]. Diese Konsensus-Primer sind aufgrund der großen Sequenzhomologien der verschiedenen HPV-Typen innerhalb des viralen L1-Gens in der Lage, ein ganzes Spektrum an unterschiedlichen HPV-Typen nachzuweisen. Zur Steigerung der Sensitivität wurde mit dem Amplifikationsprodukt der MY09/11-PCR eine nested-PCR mit GP5+/6+-Primern durchgeführt. Die Fälle, in denen entweder in der single-PCR mit MY09/11-Primern oder in der nested-PCR mit GP5+/6+-PCR ein Amplifikationsprodukt von

ca. 450bp (für die Primer MY09/11) bzw. ca. 150 bp (für die Primer GP5+/6+) nachweisbar waren, wurden als HPV-positiv gewertet und die HPV-Typisierung wurde wie unten beschrieben durchgeführt.

Unter Verwendung von Konsensus-Primern im Bereich der viralen (Onko)-Gene E6 und E7 für eine erste PCR-Amplifikation und typspezifischen internen Primern für nested-PCR-Reaktionen wurden bei den HPV-positiven Proben die zugrundeliegenden HPV-Typen bestimmt. Nach dem Prinzip der Multiplex-PCR [84] wurden in 5 unterschiedlichen Primer-Mixen die HPV-Typen 6/11, 16, 18, 31, 33, 34, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74 erfasst. In jedem Primer-Mix konnten jeweils 6-7 verschiedene HPV-Typen in einer nested-PCR-Reaktion typisiert werden, die aufgrund der unterschiedlichen Länge ihrer Amplifikationsprodukte eindeutig identifiziert werden können. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte jeweils mittels Gelelektrophorese.

2.3.3 Primerliste

Tabelle 9: Beta-Globin-Primer-Paar(DNA-PCR)

Primer	Sequenz	Länge	Position	Tm	Amplicon
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	20nt	(-145)-(-126)	56°C	268bp
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	20nt	124-104	59°C	268bp

Tabelle 10: PPP1CA-Primer-Paar(RT-PCR)

Primer	Sequenz	Länge	Position	Tm	Amplicon
RT-PPP1CA	CAGTTGAAGCAGTCAGTGAA	20nt	596-577	550C	
PPP1CA X3 F	CCTATAAGATCAAGTACCCCGAGA	24nt	449-472	600C	113bp
PPP1CA X4 B	GATGTTGTAGCGTCTCTTGAC	22nt	561-540	600C	113bp

Tabelle 11: Verteilung der HPV-Typen in der nested-Multiplex-PCR

Mix 1(bp)	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
HPV 35(358)	HPV 16(457)	HPV 33(398)	HPV 18(405)	HPV 56(408)
HPV 74(307)	HPV 68(333)	HPV 6/11(334)	HPV 67(319)	HPV 55(315)
HPV 31(263)	HPV 39(280)	HPV 58(274)	HPV 42(277)	HPV 57(270)
HPV 44(208)	HPV 52(224)	HPV 51(223)	HPV 59(215)	HPV 61(216)
HPV 45(151)	HPV 66(172)	HPV 70(160)	HPV 54(154)	HPV 73(164)
HPV 53(96)	HPV 72(106)	HPV 69(98)	HPV 43(100)	HPV 62(101)

In Tabelle 17 ist die Verteilung der HPV-Typen in 5 unterschiedlichen nested-Multiplex-PCR-Mixen angegeben. Die Viren sind nach aufsteigender Länge der Amplifikate angegeben in Basenpaaren (bp).

In Proben mit nachgewiesenen Infektionen wurde aus weiteren ungefärbten Schnittpräparaten die gesamt-RNA extrahiert.

2.3.4 Sequenzierung zur Typisierung

Um den HPV-Typ festzulegen, wurden die Amplifikationsprodukte der GP5+/6+-PCR von der Firma *Sequiseve* sequenziert. Die Amplifikationsprodukte wurden vorher mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) prozessiert, um die doppelstrangige-DNA-Fragmente zu reinigen.

2.4 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene

2.4.1 Extraktion von RNA zum Nachweis der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene

Die Extraktion von RNA erfolgte aus weiteren Leerschnitten auf nicht beschichteten Objektträgern. Die Leerschnitte wurden zuerst 2x für 10min in reinem Xylol entparaffiniert und 2x für 10min in absolutem Ethanol gewaschen. Zunächst wurde das Tumorareal von den entparaffinierten Schnitten mit einer Pipettenspitze abgetragen. Um bei der Dissektion das Tumorareal vom gesunden Gewebe exakt abgrenzen zu können, wurde der entparaffinierte Leerschnitt mit dem passenden Hämatoxylin-Eosin gefärbten Serienschnitt verglichen, auf dem bereits unter Mikroskop das Tumorareal mit ausreichendem Abstand vom gesunden Plattenepithel markiert wurde.

Für die RNA-Extraktion wurde das *High Pure FFPE RNA-Micro-Kit* der Firma *Roche* (SN. 04823125) verwendet. Um das Tumorareal vom Objektträger abzutragen, wurden 60 µl Gewebe-Lysepuffer verwendet und das Material wurde in ein Eppendorf-Gefäß übertragen. Nach der Zugabe von 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, Natriumdodecylsulfat) und 30 µl Proteinase K (in 4,5ml Elutionspuffer gelöst, aliquotiert und bei 20°C gelagert) wurden die Proben kurz gevortext, zentrifugiert und für 3h bei 55°C in den Thermoschüttler zum Verdau gestellt. Nach dem Proteinase K-Verdau wurden 200 µl Bindungspuffer und 200 µl absolutes Ethanol dazu pipettiert. Nachdem die Probe gevortext und bei 16.000rcf für eine Minute zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in einen *High Pure*-Filter gegeben. Die Probe wurde auf 8.000rcf zentrifugiert und das Eluat wurde danach verworfen. Die Probe wurde für 1min bei 19.090rcf (maximale Geschwindigkeit der Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert, um den

Filter zu trocknen. Zu der Probe wurde danach 30 µl DNase-Lösung pipettiert, die aus 3 µl DNase-Inkubationspuffer und 27 µl DNase (in 2ml Elutionspuffer gelöst, aliquotiert und bei 20°C gelagert) hergestellt wurde, und für 15min in Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde danach mit 300 µl Waschpuffer I, 300 µl Waschpuffer II und 200 µl Waschpuffer II gewaschen und für 30s bei 8.000rcf zentrifugiert. Das Eluat wurde nach jedem Schritt verworfen. Um den Filter erneut zu trocknen, wurde die Probe für 2min bei 19 090rcf zentrifugiert. Für die Eluierung der RNA wurden 20 µl Elutionspuffer verwendet. Die RNA-Konzentration wurde aus einem Aliquot von 1,2 µl Probe bei 240nm am Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, PeqLab) gemessen. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 cDNA-Synthese mit typspezifischen Primern

Im Anschluss an die Extraktion wurde die RNA einer Reverse-Transkriptase-Reaktion zugeführt und in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um mittels PCR amplifiziert werden zu können. Dafür wurden jeweils 3 -5 µl Gesamt-RNA in einem Volumen von insgesamt 20 µl verwendet. Zuerst wurde ein Primer-Mix hergestellt. In 50 µl Primer-Mix werden jeweils 2 µl eines für das PPP1CA-Gen (Homo sapiens-Protein Phosphatase 1, katalytische Untereinheit, Alpha-Isoenzym, Transkriptvariante 1) ausgewählten Primers (5^o-CAGTTGAAGCAGTCAGTGAA-3^o, Position 596-577) und 2 µl des Back-Primers für den untersuchten HPV-Typ mit 46 µl H₂O (destilliertes, autoklaviertes Wasser) gemischt.[84] Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde das *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis*-Kit (Roche, SN 04379012001) verwendet.

Für die Reaktion wurden 2 unterschiedliche Mixe zubereitet. Im ersten Mix wurden 3-5 µl Gesamt-RNA mit 5 µl Primer-Mix und 3-5 µl H₂O, so dass das Gesamtvolumen der Reaktion zunächst 13 µl betrug. Das Gemisch wurde dann im Thermocycler für 10min bei 65°C inkubiert, um die RNA zu "entfalten" und die Anlagerung der Primer an die RNA (*annealing*) zu erreichen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Reaktionsprodukt für 5min in einen Kühlständer gestellt und 7 µl von dem zweiten Mix wurden dazu pipettiert. Der zweite Mix wurde aus 4 µl Transcriptor-Reverse-Transkriptase-Reaktionspuffer (5x konzentriert, 250mM Tris-HCL, 150mM KCl, 40mM MgCl₂, pH 8,5), 0,5 µl Protector-RNase-Inhibitor (40 U/µl), 2 µl Desoxyribonukleotide-Mix (10mM jeweils), 0,5 µl Transcriptor-Reverse-Transkriptase (20 U/µl) hergestellt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler bei 55°C für 30s und bei 85° C für 5min inkubiert und für 10min auf 10°C abgekühlt.

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und kann unter diesen Bedingungen mit einer einzelsträngigen RNA als Matrize in 5`-3` Richtung eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisieren. Die strukturelle Integrität der cDNA wurde durch den Nachweis gesplinter Transkripte des PPP1CA-Gens mit einer einfachen PCR überprüft.

2.4.3 Einfache RT-PCR und nested-RT-PCR

Mit einer anschließenden PCR wurde die in cDNA umgeschriebene RNA amplifiziert. Als Primer für die RT-PCR wurden ähnliche E6-Konsensus-Primer verwendet, die auch für die HPV-Typisierung verwendet wurden. Zur Steigerung der Sensitivität wurden jeweils interne Primer für eine nested RT-Reaktion verwendet [84]. Es wurden 1 µl cDNA in die RT-PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 10x konzentriertes PCR-Gold-Puffer II (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, *Applied Biosystems*), 25mM von jedem der vier dNTPs (*Fermentas*), je 15pmol PCR-Primer und 1U thermostabile Taq-Polymerase (AmpiTaq Gold DNA-Polymerase, *Applied Biosystems*). Die verwendeten Primer wurden durch die Firma *TIB Molbiol* (Berlin, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 12: HPV-Typ und RT-PCR-Vorwärts-Primer

HPV Typ	RT-PCR-Vorwärts-Primer	Position (nt)
HPV 16	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	141-164
HPV 18	GCT TTG AGG ATC CAA CAC GG	112-131
HPV 33	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192
HPV 35	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	157-178
HPV 59	TAC ACA ACG ACC ATA CAA ACT G	108-129
HPV 66	GCA GCC TGT TGT GCC TGT AG	76-95

Tabelle 13: HPV-Typ und Rückwärtsprimer

HPV Typ	RT-PCR-Rückwärts-Primer	Position (nt)
HPV 16	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	668-649
HPV 18	CTG AGT CGC TTA ATT GCT CG	692-673
HPV 33	TCA TCC TCA TCT GAG CTG TC	679-660
HPV 35	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	668-649
HPV 59	TCT CGG AGT CGG AGT CAG G	686-668
HPV 66	TCC TCA TCC TCT GAG CTG TC	678-659

Für die nested RT-PCR 1 µl PCR-Produkt aus der typspezifische RT- PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 10x konzentriertes PCR Gold Puffer II (100mM Tris- HCl, pH 8,3,

500mM KCl, 15mM MgCl₂, Applied Biosystems), 25mM von jedem der vier dNTPs (Fermentas), je 15pmol PCR-Primer und 1U thermostabile Taq-Polymerase (AmpiTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems). Die verwendeten Primer wurden durch die Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 14: HPV- Typ nested RT- PCR-Vorwärts-Primer [83]

HPV Typ	nested RT- PCR-Vorwärts-Primer	Position (nt)
HPV 16	GTG TGT ACT GCA AGC AAC AG	192-211
HPV 18	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190
HPV 33	GGA ATG CAA AAA ACC TTT GCA A	201-222
HPV 35	CAA ACA AGA ATT ACA GCG GA	208-227
HPV 59	CTC TGC ATG ATA TTC GCA TC	158-177
HPV 66	CCT GTA GAT ATC CAT GGA TTC C	89-110

Tabelle 15: HPV- Typ nested RT-PCR-Rückwärtsprimer [83]

HPV Typ	nested RT- PCR Rückwärts-Primer	Position (nt)
HPV 16	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	597-573
HPV 18	GTT GTG AAA TGC TGC TTT TTC A	491-470
HPV 33	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549
HPV 35	GGT CAG TTG CCT CGG GTT C	625-607
HPV 59	CAC ACA AGG TCA ACT TCC TC	654-635
HPV 66	AGA TTC TGT AGC TTG TCT ACT C	560-539

2.4.4 Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Amplifikationsprodukte erfolgt mittels Gelelektrophorese. Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung eines 2 % Agarose-Gels wurden 1,4g Agarosepulver (PeqGold Universal Agarose, *PeqLab Biotechnologie*, Ser. Nr. 35 1020) in 70ml 0,5 % TBE-Puffer (450mM Tris Borat, 10mM EDTA, Roth Nr. 3061:2) gemischt. Das Gel wurde für 2min bei 900W in der Mikrowelle unter Sichtkontrolle gekocht und anschließend unter kaltem Leitungswasser auf ungefähr 60°C abgekühlt. Um die Amplifikationsprodukte unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 3 µl Ethidiumbromid (Konzentration von 3 l EtBr in 70ml Gel) in das abgekühlte, flüssige Gel zugegeben und in diesem gleichmäßig verteilt. Als Laufpuffer wurde 0,5 % TBE-Puffer benutzt. Ungefähr 7-8 µl Probe wurden mit 1 µl Ladepuffer (6x Loading Buffer von PeqLab, 10mM Tris-HCl, EDTA, BpB, Xylencyanol, 60 % Glycerin, Ser. Nr. 25 2170) gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Um die

Material und Methoden

Länge der Amplifikationsprodukte abschätzen zu können, wurden jeweils 3 µl Längenmarker (PegGold DNA-Sizer XIII, Ser. Nr. 25 2171) in die Geltasche vor der ersten Probe und in die Geltasche nach der Positivkontrolle aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese wurden alle PCRs sowohl auf DNA-als auch RNA-Ebene ausgewertet. So wurde es möglich, die Amplifikationsprodukte einem bestimmten Splice-Produkt (E6/ E7, E6 bzw. E6 I, E6 II im Fall einer HPV16-Infektion) zuzuordnen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Stichprobe

Das im Folgenden untersuchte Gewebematerial des Pathologischen Instituts stammt aus einem Patientenkollektiv der HNO-Klinik mit folgenden Eigenschaften. (Für eine vollständige Darstellung der Stichprobe inklusive Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisierung und pTNM-Klassifikation, vgl. Anhang 1):

Unter den 96 Patienten befanden sich 69 Männer (71,8 %) und 27 Frauen (28,1 %).

Der allgemeine Altersdurchschnitt für beide Geschlechter lag bei 60 Jahren, der Altersmedian bei 59 Jahren. Geschlechtsbezogen betrachtet lag das Durchschnittsalter bei der operativen Entfernung/Biopsie bei Frauen mit 62 Jahren gering höher als bei Männern, wobei der Median bei 59 Jahren lag. Das Erstdiagnosealter bei den männlichen Patienten lag im Durchschnitt bei 59 Jahren, der Altersmedian ebenfalls bei 59 Jahren. Der älteste männliche Patient war 75 Jahre bei Erstdiagnose und die älteste Patientin 84 bei Erstdiagnose.

Die meisten behandelten Karzinome waren in den Tonsillen lokalisiert. In 6 Proben handelte es sich um bilaterale Tonsillenkarcinome (Proben 38+39; 56+76; 62+63; 69+70; 73+74; 130+131), die separat aufgearbeitet worden waren. Weitere Lokalisationen waren die Glossotonsillarfurche, der Zungengrund und der Gaumenbogen. In Tabelle 4 sind sämtliche eingeschlossenen Patientencharakteristika inklusive Lebensalters, Geschlecht, Tumorlokalisierung und pTNM-Stadium aufgelistet.

Tabelle 16: Tumorlokalisierung

Lokalisation	Anzahl	Prozent
Tonsille	83	86,5 %
Glossotonsillarfurche	4	4,2 %
Oropharynx	2	2,1 %
Zungengrund	3	3,1 %
Gaumenbogen	2	2,1 %
Tonsillenloge	1	1 %

6 Gewebeproben stammten aus bilateralen Tonsillenkarcinomen, also von 3 Patienten. Diese wurden separat aufgearbeitet. In diesen Proben handelt es sich um die Proben 38+39; 56+76; 62+63; 69+70; 73+74; 103+131.

Ergebnisse

In Tabelle 21 sind die Tumorstadien der in der Studie eingeschlossenen Karzinome aufgelistet. Im Stadium pT1 waren 19 Karzinome (19,8 %). Bemerkenswert ist, dass 49 Karzinome (51 %) im Stadium pT2 diagnostiziert wurden, mit einer Primärtumorgröße von 2-4cm. Ein Karzinom (1 %) wurde im Stadium pT2/3 beschrieben. Im Stadium pT3 waren 25 Karzinome (26,0%). Im Stadium pT4 und pT4a waren jeweils 1 Karzinom (1,0%).

Tabelle 17: Tumorausdehnung (n=96)

T-Stadium	Anzahl	Prozent
pT1	19	19,8 %
pT2	49	51,0 %
pT2/3	1	1,0 %
pT3	25	26,0 %
pT4	1	1,0 %
pT4a	1	1,0 %

Das N-Stadium war in 5 Proben (5,2 %) unbekannt. 23 Karzinome (24,0 %) wiesen keine Lymphknotenmetastasen (pN0) auf. 24 Karzinome (25,0 %) waren im pN1-Stadium, wiesen also ipsilaterale Lymphknotenmetastasen kleiner als 3cm auf. 3 Fälle (3,1 %) wurden als pN2-Stadium bei Nachweis von bilateralen Lymphknotenmetastasen eingestuft. Bei Nachweis von ipsilateralen Lymphknotenmetastasen ergibt sich ein pN2a-Stadium, wenn diese zwischen 3 cm und 6cm groß sind; als solche wurden 4 Fälle (4,2 %) eingestuft. Im pN2b-Stadium sind multiple ipsilaterale Lymphknotenmetastasen bis zu 6cm nachweisbar; in dieser Kategorie gehörten 26 Fälle (27,1 %). Als Stadium pN2c wurden 7 Fälle (7,3 %) bei Nachweis von bilateralen Lymphknotenmetastasen bis zu 6cm kategorisiert. 3 Fälle (3,1 %) waren bei Nachweis von Lymphknotenmetastasen über 6cm im Stadium pN3. In einem Fall (1 %) wurde das Stadium pN3a dokumentiert.

Das M-Stadium war für alle Patienten der Studie unbekannt und somit als Mx eingestuft.

Ergebnisse

Tabelle 18: Lymphknotenstatus

N-Stadium	Anzahl	Prozent
pNx	5	5,2 %
pN0	23	24,0 %
pN1	24	25,0 %
pN2	3	3,1 %
pN2a	4	4,2 %
pN2b	26	27,1 %
pN2c	7	7,3 %
pN3	3	3,1 %
pN3a	1	1,0 %

Das Grading wurde in einem Fall (1 %) als G1 bewertet. Als G2 wurden 25 Fälle (26,0 %) eingestuft. 70 Fälle (72,9 %) wurden als gering differenziert bewertet.

Tabelle 19: Grading (n=96)

Grading	Anzahl	Prozent
G1	1	1,0 %
G2	25	26,0 %
G3	70	72,9 %

Der Resektionsstatus der Karzinome war in 82 der insgesamt 96 Fälle (85,4 %) unbekannt. Bei 5 Proben (5,2 %) wurde kein Residualtumor an den Resektionsrändern nachgewiesen und somit als R0 bezeichnet. In 9 Proben (9,4 %) konnte ein mikroskopischer Nachweis von Tumorgewebe an den Resektionsrändern nachgewiesen werden (R1-Status).

Tabelle 20: Resektionsstatus

Resektionsstatus	Anzahl	Prozent
Rx	82	85,4 %
R0	5	5,2 %
R1	9	9,4 %

In 2 Fälle fanden sich eine Lymphangiosis, *Hämangiosis carcinomatosa* und eine Perineuralscheideninfiltration. Im Fall 45 lag ein L1, V1 und Pn1-Status vor. Dies bedeutet, dass mikroskopisch in Lymph- und Blutgefäßen Tumorgewebe sowie eine Perineuralscheideninfiltration nachweisbar waren. Im Fall 65 wurde ein L1, V0, Pn1-Status beschrieben.

3.2 Ergebnisse immunhistologischer Untersuchungen

Von allen Proben wurde eine immunhistologische Untersuchung mit einem anti-p16-Antikörpern durchgeführt. Von 96 Proben reagierten 60 Fälle (62,5 %) positiv auf die p16-Antikörper; 36(36,5 %) reagierten nicht durchgehend kräftig positiv und wurden somit als negativ gewertet.

Mittels Immunhistochemie konnte in 52 von 53 Karzinomen mit Nachweis einer HPV-Infektion (98,1 %; 52/53 Proben) eine p16-Überexpression nachgewiesen werden. Im Fall 103 wurde mittels Sequenzierung eine HPV16-Infektion festgestellt, aber immunhistochemisch keine p16-Überexpression nachgewiesen. In 9 Proben (9,4 %; 9/96) zeigte sich eine p16-Überexpression bei fehlendem Nachweis eines Amplifikats in allen Typisierungsreaktionen, so dass hier eine Diskrepanz zwischen der p16-Überexpression und dem HPV-Status bestand.

3.3 Nachweis und Typisierung von HPV-Infektionen

Die strukturelle Intaktheit der extrahierten DNA wurde durch die Amplifikation des humanen β -Globin-Gens überprüft [39]. In 95 der insgesamt 96 untersuchten Fälle (98,9 %; 95/96) wurde das β -Globin-Gen nachgewiesen (s. Abbildung 8). In einem Fall (Fall Nr. 132) war dieses Amplifikationsprodukt nicht nachweisbar. Trotz des fehlenden Nachweises des β -Globin-Amplifikationsprodukts wurden weitere Typisierungsuntersuchungen durchgeführt. Diese zeigten jeweils ein negatives Ergebnis. Die Abbildung 8 zeigt die Auswertung der housekeeping-PCR mit Hilfe der Gelelektrophorese beispielhaft. Vor und nach den Proben war jeweils eine molekulare Leiter aufgetragen worden, um die Länge der PCR-Produkts korrekt bestimmen zu können. Bei jeder PCR wurde eine negative und eine Positivkontrolle mitanalysiert. So ließ sich eine Kontamination bei positivem Nachweis eines Amplifikats in der Negativprobe ausschließen.

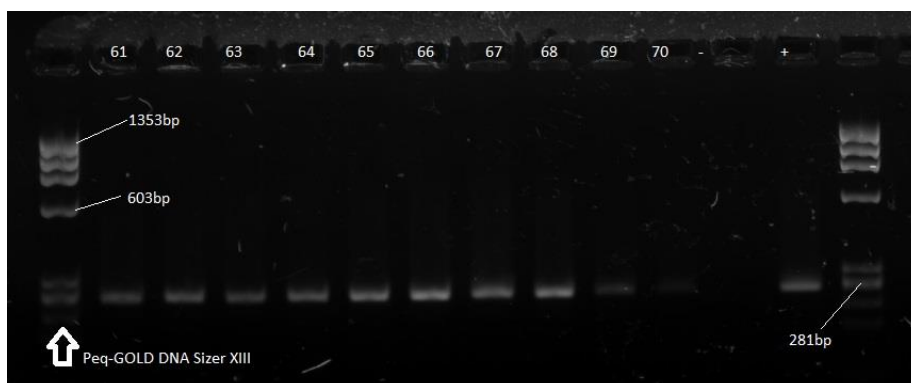


Abbildung 8: Beta-Globin-Nachweis als housekeeping-PCR. Proben 61-69 sind positiv. Die Probe 70 ist schwach positiv und aufgrund der Auflösung nicht gut auf diesem Bild erfasst. Die Negativkontrolle zeigt keinen

Ergebnisse

Amplifikatnachweis und die Positivkontrolle zeigt einen positiven Nachweis. In der ersten und letzten Spalte sind jeweils die verwendeten molekularen Leiter dargestellt. Das Amplifikationsprodukt bei den positiven Proben ist 281bp lang.

Die erste PCR zum Nachweis einer HPV-Infektion ist die MY09/11-PCR. In dieser Reaktion wird ein Teil des L1-Gens amplifiziert. In der MY09/11-PCR waren 48 Fälle (50 %; 48/96) positiv. Anschließend wurde bei allen Proben der MY09/11 das Amplifikationsprodukt für die Durchführungen der GP5+/6+-PCR weiteranalysiert. Die Ergebnisse der nested-GP5+/6+-PCR unterschieden sich leicht von den Ergebnissen der MY09/11-PCR. In der GP5+/6+-PCR wurde in 53 Proben (55,2 %; 53/96) ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen. Im Unterschied zu diesen 53 in der GP5+/6+-PCR positiven Proben wurde mittels NMPCR nur in 50 Proben (52,1 %; 50/96) ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen. Abbildung 9 zeigt beispielhaft einen Vergleich der Ergebnisse beider PCR-Methoden.

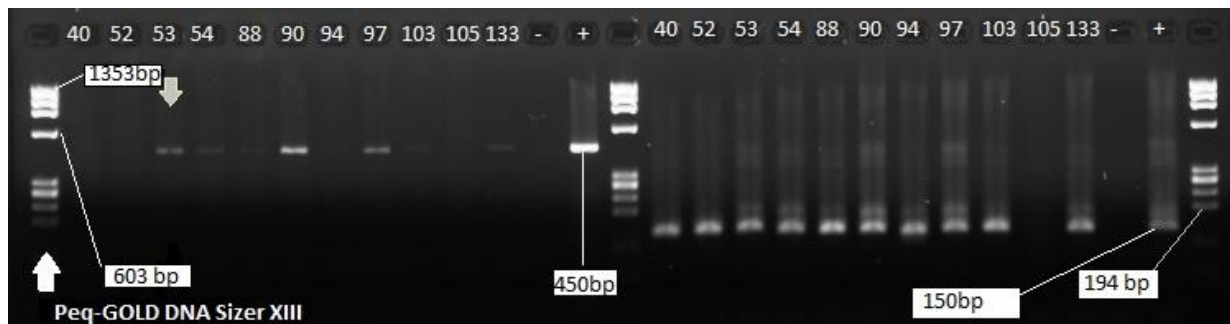


Abbildung 9:MY- und GP-PCRs von den Proben 40, 52, 53, 54, 88, 90, 94, 97, 103, 105, 133. In der MY-09/11-PCR sind die Proben 53, 90, 97 positiv und die Proben 54, 88, 94, 103, 133 schwach positiv. Das Amplifikationsprodukt der MY09/11-PCR ist 450bp lang. In der GP 5+/6+ sind alle Proben bis auf Probe 105 positiv. In der GP5+/6+-PCR ist Amplifikationsprodukt 150bp lang.

Alle nested GP5+/6+-PCR positiven Fälle, die sich mittels NMPCR als negativ erwiesen, wurden sequenziert und in allen Proben wurde dabei die Infektion mit HPV bestätigt. Bei den Proben 40, 94 und 103 wurde eine HPV-Assoziation durch ein positives Ergebnis in der MY09/11- und GP5+/6+-PCR nachgewiesen. In der nested-Multiplex-PCR (NMPCR) konnte kein Amplifikat nachgewiesen werden. In der Sequenzierung konnte für die Proben 40 und 103 eine Infektion mit HPV 16 und für die Probe 94 eine Infektion mit HPV 33 nachgewiesen werden. Die Typisierung ergab folgende HPV-Typen: 16, 18, 35, 59, 66, wobei Typ 66 nur als Koinfektion mit HPV 16 in 2 Proben vorkam. Tabelle 21: Im Gesamtkollektiv nachgewiesene HPV-TypenTabelle 25 listet die im Gesamtkollektiv nachgewiesenen HPV-Typen auf. In 48 Proben (90,6 %; 48/53) wurde HPV-Typ 16 nachgewiesen, wobei in 2 Proben eine Koinfektion mit HPV 66 festgestellt wurde. In 2 Proben (3,7 %; 2/53) wurde HPV 18 nachgewiesen und in einem einzigen Fall (1,8 %;

Ergebnisse

1/53) HPV 35 und HPV 59. Die Infektion mit HPV 33 wurde wie oben bereits beschrieben nur in einem einzigen Fall (1,8 %; 1/53) mittels Sequenzierung festgestellt.

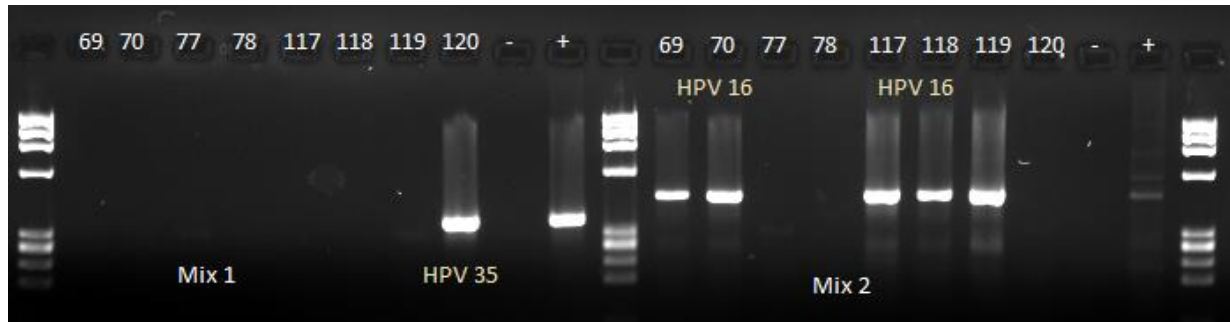


Abbildung 10: Multiplex nested-PCR mit Nachweis von HPV 35, 16. Für HPV 35 ist in der NMPCR ein Amplifikat mit 358bp Länge nachweisbar. Für HPV 16 ist ein Amplifikat mit 457bp Länge nachweisbar.



Abbildung 11: Multiplex nested-PCR mit Nachweis von HPV 18. Die Länge des nachgewiesenen Amplifikats ist 322bp.

Tabelle 21: Im Gesamtkollektiv nachgewiesene HPV-Typen

HPV-Typ	Anzahl	Prozent
16*	48	90,6 %
18	2	3,7 %
33	1	1,8 %
35	1	1,8 %
59	1	1,8 %
66	2	3,7 %

* In 2 Proben konnte eine Koinfektion mit HPV16 und 66 festgestellt werden. Diese Fälle wurden zu den HPV16-Einfachinfektionen hinzugezählt.

Ergebnisse

Im folgenden Flussdiagramm (Abbildung 12) sind die einzelnen Arbeitsschritte und die Ergebnisse der jeweiligen PCRs dargestellt.

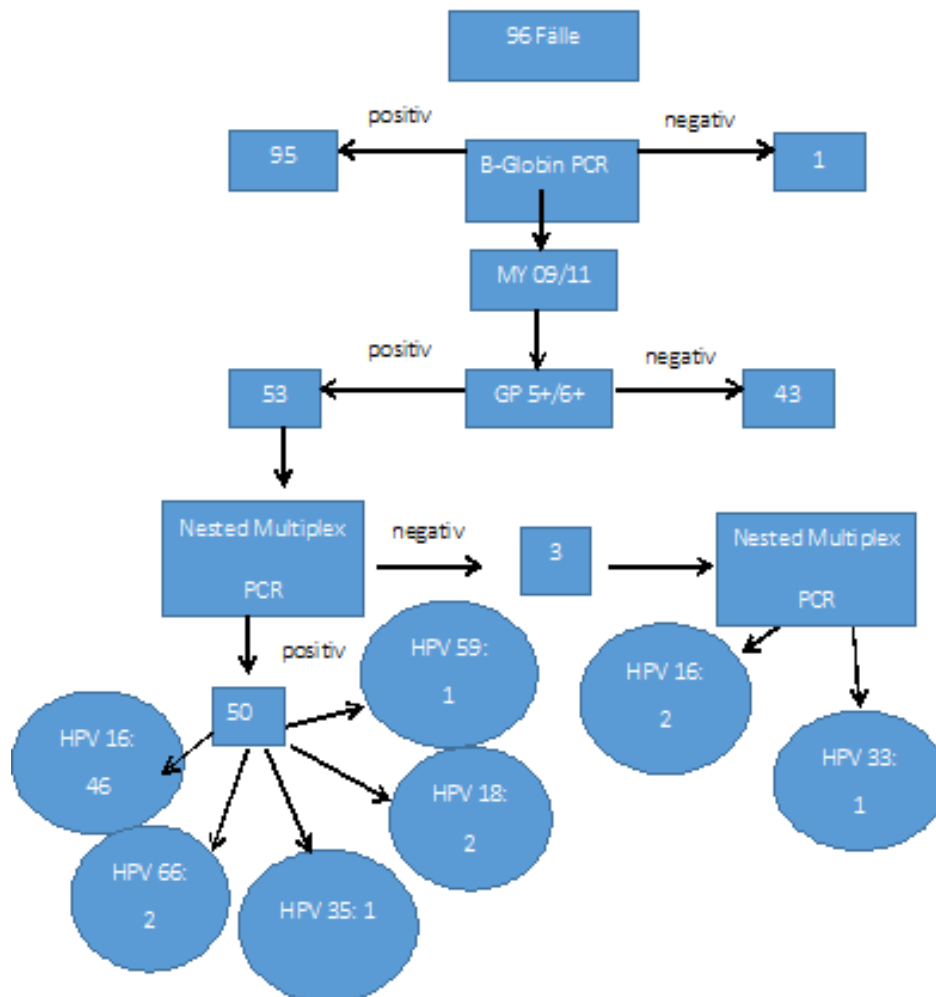


Abbildung 12: Untersuchungsablauf und Ergebnisse auf DNA-Ebene in schematischer Darstellung

Ergebnisse

Tabelle 22: Ergebnisse der HPV-Untersuchungen auf DNA-Ebene(sequenzierte Fälle sind orange markiert)

Fall-Nr	Beta-Globin (0= negativ, 1=positiv)	My09/11 (0= negativ, 1=positiv)	GP5+/6+ (0= negativ, 1=positiv)	Multiplex HPV (0= negativ, 1=positiv)	HPV-Typ(0= keine Infektion nachweisbar)
28	1	0	0	0	0
30	1	1	1	1	16
32	1	0	0	0	0
38	1	0	0	0	0
39	1	0	0	0	0
40	1	1	1	0	16*
41	1	1	1	1	16
42	1	1	1	1	16
44	1	1	1	1	16
45	1	0	0	0	0
46	1	0	0	0	0
47	1	1	1	1	16
48	1	0	0	0	0
49	1	0	0	0	0
50	1	1	1	1	16
51	1	0	0	0	0
52	1	1	1	1	16
53	1	1	1	1	16
54	1	1	1	1	16
55	1	0	0	0	0
56	1	1	1	1	16
57	1	1	1	1	16
58	1	1	1	1	16
59	1	1	1	1	16
60	1	0	0	0	0
61	1	1	1	1	16
62	1	0	0	0	0
63	1	0	0	0	0
65	1	0	0	0	0
66	1	1	1	1	16
68	1	1	1	1	16
69	1	1	1	1	16, 66
70	1	1	1	1	16
71	1	0	0	0	0
72	1	0	0	0	0
73	1	1	1	1	16
75	1	1	1	1	16
76	1	1	1	1	16

Ergebnisse

77	1	0	0	0	0
78	1	1	1	1	18
79	1	0	0	0	0
80	1	1	1	1	16
81	1	0	0	0	0
82	1	0	0	0	0
84	1	1	1	1	16
85	1	1	1	1	16
86	1	0	0	0	0
87	1	0	0	0	0
88	1	1	1	1	16
89	1	1	1	1	16
90	1	1	1	1	16
91	1	1	1	1	16
92	1	0	0	0	0
93	1	0	0	0	0
94	1	1	1	0	33*
95	1	1	1	1	59
96	1	1	1	1	16
97	1	1	1	1	16
98	1	1	1	1	18
99	1	0	1	1	16
100	1	0	0	0	0
101	1	0	0	0	0
102	1	1	1	1	16, 66
103	1	0	1	0	16*
104	1	1	1	1	16
105	1	0	0	0	0
106	1	1	1	1	16
107	1	0	0	0	0
108	1	0	1	1	16
109	1	1	1	1	16
110	1	0	0	0	0
111	1	1	1	1	16
112	1	1	1	1	16
113	1	0	0	0	0
114	1	0	0	0	0
115	1	1	1	1	16

Ergebnisse

116	1	0	0	0	0
117	1	1	1	1	16
118	1	1	1	1	16
119	1	0	1	1	16
120	1	0	1	1	35
121	1	0	0	0	0
122	1	0	0	0	0
123	1	1	1	1	16
124	1	1	1	1	16
125	1	0	0	0	0
126	1	0	0	0	0
127	1	0	0	0	0
129	1	0	0	0	0
130	1	0	0	0	0
132	0	0	0	0	0
133	1	1	1	1	16
134	1	0	0	0	0
135	1	0	0	0	0
136	1	1	1	1	16, 66

3.4 Transkriptionelle Aktivität der E6/E7-Onkogene

Für die Untersuchung der Fälle auf RNA-Ebene wurde zuerst eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Um die strukturelle Intaktheit der synthetisierten cDNA zu überprüfen, wurde das PPP1CA-Gen (Homo-sapiens-Protein-Phosphatase 1, katalytische Untereinheit, alpha-Isoenzym, Transkriptvariante 1) amplifiziert. In 50 von 53 Proben (94,3 %) ließ sich ein Amplifikat nachweisen und in 3 Proben (5,6 %) nicht. Diese 3 Fälle wurden weiterhin mittels einfacher und nested-typspezifischer RT-PCR untersucht, wobei allerdings kein Amplifikat in der nested RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der typspezifischen HPV-nested-RT-PCR waren folgende: In 42 von 53 untersuchten Proben (79,2 %) konnten die Amplifikationsprodukte E6* oder E6/7 nachgewiesen werden.

Aus 48 HPV 16-positiven Proben wiesen 40 (83,3 %) die E6*- und/oder E6/E7-Onkogentranskripte auf; in 8 Proben (16,6 %) konnte kein Onkogentranskript nachgewiesen werden. In beiden Proben, die mit HPV18 infiziert waren, konnte kein Onkogentranskript nachgewiesen werden. Auch die Fälle mit nachgewiesener HPV66-Koinfektion wiesen für den Typ 66 kein Onkogentranskript auf. In Proben, in denen eine Infektion mit Typ 33 und 35 nachgewiesen worden war, wurde ein für diese Typen spezifisches E6/E7-Onkogentranskript nachgewiesen.

Ergebnisse

Die Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der nested-RT-PCR für die Proben 70, 84, 85, 89, 91, 96, 99, 106, 108, 111, 112.

Tabelle 23: PCR Ergebnisse RNA

PCR	PPP1CA	HPV16 nRT-PCR	HPV18 nRT-PCR	HPV66 nRT-PCR	HPV33 nRT-PCR	HPV35 nRT-PCR	HPV59 nRT-PCR
Positiv % (absolut)	94,3 % (50/53)	83,3 % (40/48)	0 % (0/2)	0 % (0/2)	100 % (1/1)	0 % (0/1)	100 % (1/1)

Im unten folgenden Flussdiagramm sind sämtliche PCRs mit den jeweiligen Ergebnissen dargestellt.

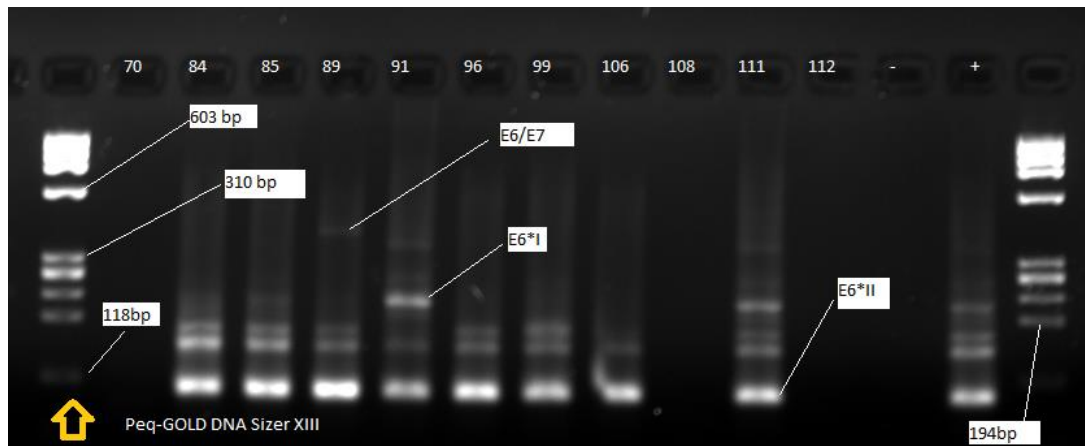
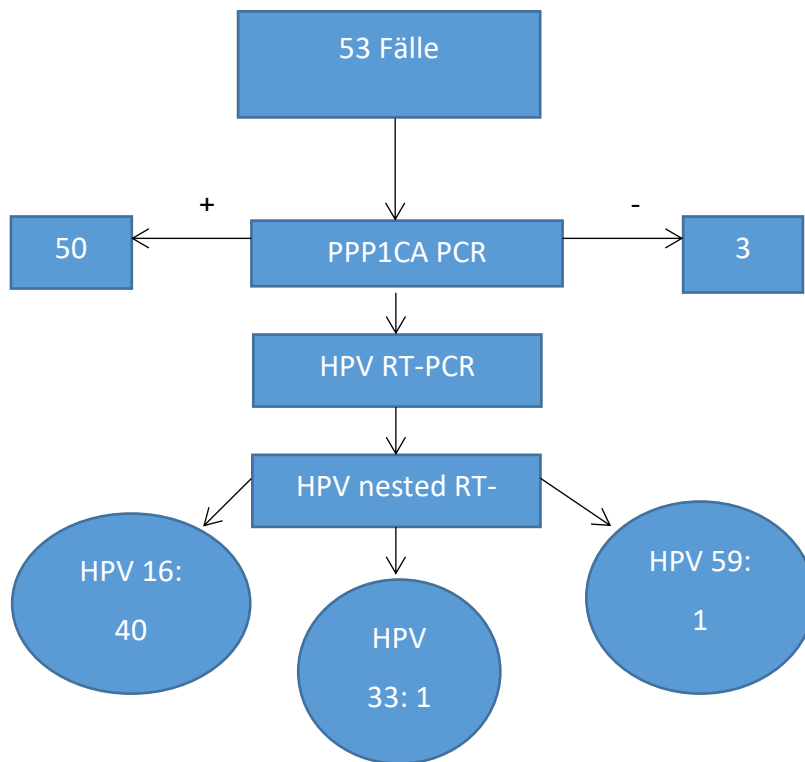


Abbildung 13: Multiplex-nested-RT-PCR für HPV 16. Erkennbar sind verschiedene Spliceprodukte von HPV16. In Probe 89 am längsten und schwach erkennbar das E6/E7-Amplifikat mit 395 bp Länge. Weiterhin das E6*I-Amplifikat mit 213 bp Länge und das E6*II-Amplifikat mit 95 bp Länge [100]

Abbildung 14: Untersuchungsablauf und Ergebnisse auf RNA-Ebene



Ergebnisse

Tabelle 24: Ergebnisse der HPV-Untersuchung auf RNA-Ebene

Fall-Nr	HPV-Typ	PPP1CA (0=negativ, 1=positiv)	HPV-RT-PCR (0=negativ, 1=positiv)	HPV-nRT-PCR (0=keine Infektion nachweisbar)
30	16	1	0	1
40	16	0		0
41	16	1	0	1
42	16	1	0	1
44	16	1	1	1
47	16	1	1	1
50	16	1	1	1
52	16	1	0	0
53	16	1	0	1
54	16	1	0	1
56	16	1	0	1
57	16	1	0	1
58	16	1	0	1
59	16	1	0	1
61	16	1	0	0
66	16	1	1	1
68	16	1	0	1
69	16, 66	1	0(16), 0(66)	1(16), 0(66)
70	16	1	0	1
73	16	1	0	1
75	16	1	1	1
76	16	1	0	0
78	18	1	0	0
80	16	1	1	1
84	16	1	0	1
85	16	1	1	1
88	16	1	0	1
89	16	1	0	1
90	16	1	0	1
91	16	1	1	1
95	59	1	0	1
94	33	1		1
96	16	1	0	1
97	16	1	0	1
98	18	1	0	0
99	16	1	1	1
102	16, 66	1	0(16), 0(66)	1(16), 0(66)
103	16	1	1	0
104	16	1	0	1
106	16	1	0	1

Ergebnisse

108	16	1	0	0
109	16	1	0	1
111	16	1	1	1
112	16	0	0	0
115	16	1	0	1
117	16	1	0	1
118	16	1	0	1
119	16	1	0	1
120	35	0	0	0
123	16	1	0	1
124	16	1	0	1
133	16	1	0	0
136	16	1	0	1

3.5 Korrelation von HPV-Infektion und Karzinomlokalisierung

Das Tumormaterial sämtlicher im untersuchten Kollektiv verfügbaren 96 Proben wurde in folgenden Geweben lokalisiert: Tonsille, Glossotonsillarfurche, Oropharynx, Zungengrund, Gaumenbogen und Tonsillenloge. Für 83 Proben (86,5 %; 83/96) war im pathologischen Befund als Tumorlokalisierung die Tonsille angegeben. Vier Proben stammten aus der Glossotonsillarfurche (4,2 %; 4/96), 2 Proben aus dem Oropharynx (2 %; 2/96), 3 Proben stammten aus dem Zungengrund (3,1 %; 3/96), 2 Proben aus dem Gaumenbogen (2,1 %; 2/98) und jeweils 1 Probe aus der Tonsillenloge.

In insgesamt 42 (79,2 %; 42/53) Proben konnte ein Amplifikat der E6/E7-Onkogen-Transkripte nachgewiesen werden. In diesen Proben war der Primärtumor meist in den Tonsillen lokalisiert; in einem weiteren Fall in der Pharynxwand/Tonsille und in einem weiteren Fall im Bereich des Mundbodens/Tonsille lokalisiert.

Alle 3 Fälle (5,6 %; 3/53), in denen kein Amplifikat in der housekeeping-PPP1CA erzeugt werden konnte, war der Primärtumor in der Tonsillenregion lokalisiert. In Fall 136 konnte kein Amplifikat in der housekeeping β -Globin-PCR nachgewiesen werden; auch hier war der Primärtumor in der Tonsille lokalisiert.

In 11 Proben konnte in der nested-RT-PCR trotz nachgewiesener HPV-Infektion in der nested-Multiplex-PCR kein Amplifikat für die E6/E7-Onkogen-Transkripte nachgewiesen werden. In 3 dieser Fälle konnte in der housekeeping-PPP1CA-PCR kein Amplifikat nachgewiesen werden. In

5 Proben war der Primärtumor in der Tonsille und in 3 Proben jeweils im Oropharynx, Gaumenbogen und Glossotonsillarfurche lokalisiert.

Von den 83 in der Tonsille lokalisierten Proben zeigte 50(50/83; 60,2%) eine HPV-Assoziation. 34(34/83; 39,8%) Karzinome, die aus Tonsillengewebe stammen zeigten keine HPV-Assoziation. Bei den 4 Proben, die aus Glossotonsillarfurchengewebe stammen, zeigten 3 Karzinome (3/4; 75%) keine HPV –Assoziation. 2 Fälle aus Oropharynxkarzinome zeigten jeweils einen HPV-assozierten Fall und einen HPV-negativen Fall. Die Verteilung war ähnlich bei den 2 Gaumenbogenkarzinomen mit jeweils einen HPV-positiven Fall und einen HPV-negativen Fall. Bei den 3 Proben, die aus Zungengrundgewebe stammen, zeigte sich keine HPV-Assoziation.

Tabelle 25: Korrelation von Lokalisation und HPV-Status

Lokalisation	Tonsille	Glosso- tonsillar furche	Oro- pharynx	Zungen- grund	Gaumen- bogen	Tonsillen loge	Tonsille/ Lymph- knoten
HPV positiv	50	1	1	0	1	0	0
HPV negativ	33	3	1	3	1	1	1
Σ	83	4	2	3	2	1	1
HPV positiv (%)	60,2%	25%	50%	0	50%	0%	0%
HPV negativ (%)	39,8%	75%	50%	100%	50%	100%	100%

3.6 Korrelation von HPV-Infektion und T-Stadium

Nach der TNM-Klassifikation kommen in dem aufgearbeiteten Kollektiv die Tumorstadien pT1-pT4a vor, wie in der Tabelle 17: Tumorausdehnung (n=96) bereits aufgezählt sind. Im pT1-Stadium wurden 19 Karzinome klassifiziert. Davon waren 11(11/19; 57,9%) Karzinome HPV-positiv und 8 Karzinome HPV-negativ. Im pT2-Stadium waren 30 Karzinome HPV-assoziert (30/49; 61,2%). Bei einem Karzinom wurde die Tumorausdehnung als HPV-negativ ausgewertet. Im pT3-Stadium befanden sich 25 Karzinome und davon waren 11(11/25; 44%) HPV-assoziert. Im pT4-Stadium wurde ein Karzinom mit HPV-Assoziation dokumentiert.

Tabelle 26: Korrelation von T-Stadium und HPV-Status

T-Stadium	pT1	pT2	pT2-T3	pT3	pT4	pT4a
HPV positiv	11	30	0	11	1	0
HPV negativ	8	19	1	14	0	1
Σ	19	49	1	25	1	1
HPV positiv (%)	57,9%	61,2%	0	44%	100%	0
HPV negativ (%)	42,1%	38,8%	100%	56%	0	100%

Ergebnisse

In Tabelle 27: HPV-Typ und TumorgroÙe sind die verschiedenen HPV-Typen aufgetrennt nach TumorgroÙen aufgelistet. Im pT1-Stadium konnte in 11 Proben eine Infektion mit HPV16 diagnostiziert werden und einmalig HPV66. Im pT2-Stadium konnte in 24 Proben (24/30; 80%) eine Infektion mit HPV16 festgestellt werden. In weiteren 2 Proben im pT2-Stadium konnte eine Infektion mit HPV 18 festgestellt werden. Weiterhin konnten die HPV-Typen 33, 59, 35 und eine Koinfektion von HPV 16 und 66 bei Karzinomen im pT2-Stadium festgestellt werden. Im pT3-Stadium konnte in 11 Proben (11/11; 100%) eine HPV16-Infektion festgestellt werden. Im pT4-Stadium konnte ebenfalls eine HPV16-Infektion festgestellt werden.

Tabelle 27: HPV-Typ und TumorgroÙe

T-Stadium	pT1	pT2	pT3	pT4
HPV 16	11	24	11	1
HPV 18		2		
HPV 33		1		
HPV 59		1		
HPV 35		1		
HPV 66	1	1		0
Σ	12	30	11	1

3.7 Korrelation von HPV-Infektion und p16-Immunohistochemie

Die p16-Immunhistochemie wird in der Routinediagnostik als Surrogatmarker für die HPV-Infektion angesehen. Insgesamt wurden 60 Karzinome als p16-positiv analysiert. Davon waren 51 Karzinome (51/60; 85%) HPV-assoziiert und bei 9 Karzinomen gelang trotz positiver p16-Reaktion kein HPV-Nachweis. In 2 Proben mit positivem HPV-Nachweises mittels PCR war keine p16-Reaktion in der Immunhistochemie nachweisbar. In beiden Proben konnten keine E6/E7-Onkogentranskripte in der nested RT-PCR amplifiziert werden.

Tabelle 28: Korrelation HPV-Status und p16-Immunhistochemie

	p16 positiv	p16 negativ
HPV positiv	51	2
HPV negativ	9	34
Σ	60	36
HPV positiv (%)	85%	5,6%
HPV negativ (%)	15%	94,4%
Σ	100%	100%

3.8 Korrelation von HPV-Infektion und Geschlecht

Weiterhin ist auch die Geschlechtsverteilung in Bezug auf die HPV-Positivität der Karzinome interessant. Bei insgesamt 69 männlichen Patienten kamen 37(37/69; 53,6%) HPV-assoziierte Karzinome vor. In 27 weiblichen Patientinnen kamen 16(16/27; 59,3%) HPV-assoziierte Karzinome vor.

Tabelle 29: Korrelation HPV-Infektion und Geschlechtsverteilung

Geschlecht	männlich	weiblich
HPV positiv	37	16
HPV negativ	32	11
Σ	69	27
HPV positiv (%)	53,6%	59,3%
HPV negativ (%)	46,4%	40,7%
Σ	100%	100%

4 Diskussion

Die pathogenetische Rolle einer Infektion mit humanen Papillomaviren in der Entstehung von Oropharynxkarzinomen wird seit vielen Jahren diskutiert. Derartige Tumoren unterscheiden sich von alkohol- und nikotin-assoziierten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx durch ihre oft basaloide Morphologie [16]. Im klinischen Alltag zeigt eine HPV-Assoziation ebenfalls Relevanz, da sich die Therapie dieser Karzinome durch ihre Strahlensensibilität von den noxenassozierten Plattenepithelkarzinomen unterscheidet [87]. Analog zu den Zervixkarzinomen zeigen die meisten Plattenepithelkarzinome eine Infektion mit dem HPV-Typ 16. Seltener sind Koinfektionen oder Infektionen mit den Typen 18, 31 und 33 [15, 38].

Der eindeutige Beweis für ein HPV-assoziiertes Oropharynxkarzinom ist erst durch Nachweis der Virus-DNA in den Tumorzellen möglich geworden. Im klinischen Alltag basiert die Diagnose eines HPV-assoziierten Tonsillenkarzinoms jedoch vor allem auf immunhistochemischen Untersuchungen, speziell dem Nachweis des Surrogatmarkers p16. Aufgrund der hohen Übereinstimmung immunhistochemischer und molekularer Befunde orientiert sich auch das Therapiekonzept daran. HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome sind strahlenempfindlicher und haben eine bessere Prognose als die alkohol- und nikotinassozierten Plattenepithelkarzinome [12, 14].

Ein direkter Nachweis von HPV kann auch durch eine HPV-in situ-Hybridisierung erfolgen. Unter dem Mikroskop wird dann beurteilt, ob sich die Virus-DNA im Zellkern befindet. Die HPV-in situ-Hybridisierung zählt aufgrund des hohen technischen Aufwands und der relativ geringen Sensitivität noch nicht zu den Nachweismethoden, die als Routinediagnostik im Klinikbetrieb angewendet werden. Durch die Einführung von kommerziellen Kits zur HPV-in situ-Hybridisierung sind die diagnostischen Schritte allerdings mittlerweile standardisiert und somit nicht wesentlich zeitaufwändiger als die Immunhistochemie. Die HPV-in situ-Hybridisierung ist damit als Methode zum direkten Virusnachweis geeignet, zumal damit die Infektion spezifisch bestimmten Gewebsebenen zuordnen lässt.

Über die immunhistochemische Untersuchung oder die HPV-in situ-Hybridisierung kann zwar eine Assoziation dieser Karzinome mit dem Virus gezeigt werden, eine Aussage über den Virustyp ist allerdings nicht möglich. Zudem ist auch mit den kommerziellen Kits nur eine sehr begrenzte Anzahl von HPV-Typen mittels HPV-in situ-Hybridisierung nachweisbar [13].

Die genaue Bestimmung des jeweils vorliegenden HPV-Typs zum Nachweis von Mehrfachinfektionen ist sinnvoll, um zwischen Infektionen mit einem high-risk- und einem low-risk-Typ zu unterscheiden. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Methode ist eine Amplifikation der E6/E7-Onkogene und somit die Identifizierung des vorliegenden HPV-Typs, aber auch der transkriptionellen Aktivität des Virus im Tumorgewebe möglich.

4.1 Methodendiskussion

Das für die in Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen verwendete Gewebe wurde aus operativ entfernten oropharyngealen Karzinomen vorwiegend aus Tonsillengewebe gewonnen. Weitere Entnahmelokalisationen waren die Glossotonsillarfurche, der Zungengrund und der Gaumenbogen. In einzelnen Proben stand auch Material aus Lymphknotenmetastasen zur Verfügung. Die Untersuchung des Primärtumorgewebes wurde bevorzugt durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial stammte aus den Jahren 2002 bis 2008.

Untersucht wurden Nukleinsäuren (DNA und mRNA), die aus FFPE-Material extrahiert wurden. Durch die chemische Konservierung des Tumormaterials mittels Formalin ist die Integrität der gewonnenen DNA und insbesondere mRNA gestört [88]. So konnte in einer Untersuchung von Ben-Ezra et al. belegt werden, dass eine Formalinfixierung und der Fixierungszeitraum die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen negativ beeinflussen können [79].

Entsprechende Untersuchungen aus unfixiertem nativem Tumormaterial hätte möglicherweise mehr Informationen, besonders über die transkriptionelle Aktivität der E6/E7-Onkogene in den untersuchten Tumoren geliefert, waren aber für die geplanten Untersuchungen nicht verfügbar.

Zur besseren Einschätzung des zu untersuchenden Materials wurde die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren photometrisch bei 260 nm gemessen [88].

Um sicherzustellen, dass ein positives HPV-Ergebnis nicht von einer HPV-Infektion der umgebenden Schleimhaut, bei eigentlich negativem Tumor, herrührt, wurden die zu untersuchenden Tumoreale unter mikroskopischer Sicht mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Aus der markierten Zone und mit einem gewissen Sicherheitsabstand zum tumorfreien Gewebe wurde das Material zur Nukleinsäureextraktion und weiteren HPV-Analyse entnommen.

4.2 Korrelation zwischen p16-Immunhistochemie und HPV-PCR-Nachweis

Unsere Daten zeigten in 9,4 % der Fälle (9/96) keine Übereinstimmung der Ergebnisse von HPV-PCR und anti-p16-Immunhistologie. So wurde in der Immunhistologie eine Überexpression des Proteins p16 nachgewiesen, obwohl in den HPV-PCRs kein Amplifikat nachweisbar war.

In einer Wiederholung der Untersuchung der 9 diskrepanten Proben zeigte sich eine davon positiv; hier war in der PCR HPV-DNA nachweisbar. Bei der RNA-Untersuchung derselben Probe konnte allerdings erneut kein Amplifikat von der E6-RNA nachgewiesen werden. Da von diesen Proben kein Nativmaterial, sondern formalinfixiertes Gewebe untersucht wurde, könnte eine Degradation der Nukleinsäuren dafür verantwortlich sein, dass die HPV-DNA fragmentiert oder teilweise degradiert war, so dass aufgrund der in diesen PCRs eingesetzten Primern kein Amplifikat nachgewiesen werden konnte.

Die p16-Immunhistochemie wird in der heutigen Routinediagnostik als Surrogatmarker für die HPV-Infektion eingesetzt. Es gibt einen kleinen Anteil an Karzinomen, die zwar eine p16-positive Immunhistochemie zeigen, aber für die HPV-DNA oder E6/E7-Onkogentranskripte nicht nachweisbar sind. Für etwa 15 % der Patienten mit p16-positiver Immunhistochemie gelingt laut Literatur kein molekularer Nachweis einer HPV-Infektion [96]. Im vorliegenden Kollektiv ist der Anteil dieser diskrepanten Fälle lediglich 9,2 %. Diese Ergebnisse zeigen auch eine klinische Relevanz. Karzinome mit HPV-negativem Status und p16-Überexpression haben eine schlechtere Prognose, ähnlich wie HPV-negative Fälle [4, 96].

Rietbergen et al. [97] testeten 34 von insgesamt 195 (17 %) p16-positiven Karzinomen negativ auf HPV, wobei sie für die DNA- und RNA-Analysen FFPE-Material verwendeten [98]. In dieser Studie wurden die Untersuchung des genetischen Profils der Tumoren über LOH-Patterns (Loss of heterozygosity analysis) durchgeführt. Nach Untersuchung der HPV-positiven und -negativen HNSCC zeigten sich Übereinstimmungen zwischen diskrepanten, nur p16-positiven Proben und den HPV-negativen HNSCC.

In 2 Proben konnte in der Studie von Rietbergen et al. durch Untersuchung der mRNA doch eine HPV-Assoziation bewiesen werden. Die Autoren begründeten dieses mit der DNA-Degradierung durch Formalinfixierung, da FFPE-Material untersucht wurde. In unserem Kollektiv wurden keine Untersuchungen auf RNA-Ebene bei den diskrepanten Proben durchgeführt. In diesen Proben erfolgte eine erneute DNA-Extraktion und GP5+/6+-PCR mit

negativem Ergebnis. Der Nachweis von p16-positiven Karzinomen mittels Immunhistochemie zeigte eine gute Sensitivität (98 %), aber nur moderate Spezifität (84 %). Durch eine Kombination der p16-Immunhistochemie mit einer HPV-DNA-PCR kann die Spezifität bis auf 96 % gesteigert werden [99].

Im Fall 103 konnte mittels Sequenzierung des GP5+/6+ PCR-Produkts eine HPV16-Infektion festgestellt werden, obwohl sowohl die p16-Immunhistochemie negativ, als auch keine E6/E7-Onkogentranskripte nachweisbar waren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Fall eine nicht transkriptionell aktive HPV-Infektion vorlag, die keine Rolle in der Karzinogenese spielte.

4.3 Korrelation von Tumorgröße/Geschlecht/Lokalisation

Nach Analyse unserer Daten zeigten sich deutlich mehr HPV-positive Karzinome mit Tumorgröße im Stadium pT2. Die Verteilung der HPV-Typen in den verschiedenen T-Stadien zeigte keine relevanten Unterschiede.

Im Kollektiv waren deutlich mehr männliche Patienten eingeschlossen. Die Verteilung der HPV-positiven und negativen Fälle, zeigte keinen relevanten Unterschied zwischen den Geschlechtern.

In Bezug auf die Lokalisation waren die meisten im Kollektiv eingeschlossenen Karzinome in der Tonsille lokalisiert.

4.4 Nachweis der HPV-Infektion mittels PCR

Der Nachweis von HPV-Infektionen mittels PCR ist eine bereits gut etablierte Methode, die viele Vorteile bietet, aber auch Limitierungen hat. Mit speziell ausgewählten Primern sind der Nachweis und die Typisierung mit guten Ergebnissen möglich. Allerdings ist die Qualität des zur Verfügung stehenden Materials entscheidend. In der Arbeit von Rietbergen et al. [95] wurden im Rahmen einer Panendoskopie von den Patienten jeweils sowohl FFPE-als auch schockgefrorenes Biopsie-Gewebe entnommen und auf eine HPV-Infektion untersucht. Die Übereinstimmungsrate der Ergebnisse aus FFPE- und schockgefrorenem Gewebe war 98 %. Von 24 untersuchten Proben wurden bei der Untersuchung des FFPE-Gewebes 22 Fälle als HPV-16-positiv und bei Untersuchung des schockgefrorenen Gewebes entsprechend 23 Fälle als

HPV-positiv erkannt. In diesem Kollektiv wurden ausschließlich Infektionen mit HPV16 und HPV33 nachgewiesen.

4.5 Einfach- und Mehrfachinfektionen

In den meisten untersuchten Proben konnte eine einfache Infektion mit HPV festgestellt werden. Der Typ 16 wurde in über 50 % (48/96) der Fälle diagnostiziert (vgl. Tabelle17). Mehrfachinfektionen sind deutlich seltener und kamen im untersuchten Kollektiv nur in 2,1 % (2/96) der Fälle vor. In der RNA-Untersuchung ließ sich für HPV66 kein Amplifikat der Onkogentranskripte E6/E7 nachweisen, obwohl in denselben Proben ein Amplifikat für den Typ HPV16 nachzuweisen war. Bei diesen Proben ist somit davon auszugehen, dass die HPV16-Infektion ursächlich für die Onkogenese dieser Fälle ist. Die Infektion mit HPV66 als Koinfektion mit einem HPV-Typ mit intermediärem Risiko ist damit für die maligne Transformation entscheidend.

Unsere Quote von HPV16-positiven Proben im Gesamtkollektiv stimmt mit der anderer Kollektive überein. In der Studie von Holzinger et al. wurde in 49 % der Fälle eine HPV16-Infektion festgestellt [91]. Zusätzlich konnten ebenfalls Infektionen mit HPV 18, 33, 35 aus schockgefrorenen Biopsien, allerdings keine Koinfektionen nachgewiesen werden. In einer weiteren Arbeit wurde in einem thailandändischen Kollektiv von 96 Proben eine Koinfektion mit HPV16/18 nachgewiesen. HPV 16 und HPV 18 konnten im restlichen Kollektiv nachgewiesen werden [92].

Im Fall von HNSCC kommen Koinfektionen sowohl mit high-risk-Typen als auch mit low-risk-Typen vor. Eine Infektion mit mehreren HPV-Typen erhöht das Risiko eines HNSCC [93].

In einer größeren Studie im asiatischen Raum wurden insgesamt 3.710 HNSC-Patienten auf ihren HPV-Status untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass HPV16 mit 10,1 % die größte Prävalenz in dieser Region besaß. In 5,5 % wurden Koinfektionen dokumentiert. In 1,5 % der Fälle wurde eine Koinfektion mit HPV16/18 nachgewiesen. In diesem Kollektiv wurden die Typen 68, 72, 57 und 39 am seltensten detektiert [94].

4.6 Nachweis der transkriptionellen Aktivität der E6/E7-Onkogene aus FFPE-Material

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Onkogenprodukte E6 und E7 aus FFPE-Material nachzuweisen und damit die Aktivität und pathogenetische Bedeutung der viralen Onkogene E6 und E7 zu belegen. Der Nachweis von mRNA nach Formalinfixierung ist allgemein erschwert, da diese deutlich eher als DNA degradiert wird [88]. Aus den hier untersuchten Proben konnte im Schnitt eine DNA-Konzentration von 235,1ng/ μ l (Median 171,4ng/ μ l) isoliert werden. Die RNA-Konzentration in den extrahierten Proben zeigte eine mittlere Konzentration von 38,4ng/ μ l (Median 37,1 ng/ μ l).

Um die Eignung der ausgewählten Proben für die Untersuchung von mRNA zu belegen, wurde eine housekeeping-PCR für das Gen PPP1CA durchgeführt. Dabei zeigten sich allgemein gute Ergebnisse mit der aus Plattenepithelkarzinomen isolierten mRNA. Eine PPP1CA-mRNA konnte in 94,3 % (50/53) der high-risk-HPV-positiven Proben nachgewiesen werden.

In Probe 131 konnte bereits in der DNA-Untersuchung bei der β -Globin-Untersuchung kein Amplifikat nachgewiesen werden. Trotz hoher Konzentration von extrahiertem DNA in der Photometrie (76,7ng/ μ l) zeigte keine der durchgeführten PCRs ein Ergebnis. In weiteren 3 Proben (40, 112, 120) konnte kein Amplifikat in der housekeeping-PPP1CA-PCR nachgewiesen werden. Trotz des negativen Ergebnisses wurde eine RT-PCT und eine nested-RT-PCR mit typspezifischen Primern durchgeführt. In diesen Proben konnte ebenfalls kein Onkogen-transkript nachgewiesen werden.

In 3 Proben konnte eine HPV-Assoziation durch ein positives Ergebnis in der GP5+/6+-PCR nachgewiesen werden, aber eine direkte Typisierung durch die nested-Multiplex-PCR war nicht möglich, so dass in diesen Proben durch eine Sequenzierung eine Typisierung erfolgte. In einem dieser Fälle konnte HPV 33 (Fall 94) und in weiteren 2 Proben (40, 103) HPV 16 nachgewiesen werden. In den Proben 40 und 103 konnte kein Onkogentranskript in der E6/E7-nested-RT-PCR nachgewiesen werden, allerdings konnte im Fall 94 ein Amplifikat des E6/E7-Onkogentranskripts von HPV 33 nachgewiesen werden.

Bei diesen Proben ist davon auszugehen, dass die Formalinfixierung und lange Lagerung im Archiv bei Raumtemperatur zu einer Degradierung der DNA und mRNA geführt hat. In einer Untersuchung von v. Ahlfen et al. [89] zeigte sich allerdings, dass die Isolierung von mRNA in formalinfixierten Proben mit guten Ergebnissen durchgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu

zeigt sich die cDNA-Synthese von spezifischen Sequenzen eingeschränkt. Eine wichtige Rolle spielt dabei offensichtlich die Reaktion von Formaldehyd in Nukleinsäurebasen und Proteinen, wie die Arbeit von Masuda et al. zeigte [90].

Trotz erschwelter Bedingungen durch lange Lagerungszeit und Formalinfixierung konnte durch den Einsatz von nested-PCR-Methoden und den Nachweis kleinerer Amplifikationsprodukte in 42/53 (79,2 %) der HPV-positiven Proben, E6/E7-Onkogentranskripte nachgewiesen werden. Durch die nested-RT-PCR konnte eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden. In der MY09/11 Reaktion waren 47 Proben positiv und durch die nested GP5+/6+-PCR konnten 53 als positiv quantifiziert werden. In der typspezifischen HPV-RT-PCR waren nur 11 Proben positiv und in Vergleich dazu gab es in der typspezifischen nested HPV-RT-PCR 44 Proben positiv.

Der HPV-Status ist ein prognostischer Indikator für die Patienten mit HNSCC, aber auch ein positiver Prädiktor für das Gesamt- und das erkrankungsspezifische Überleben. In der aktuellen Leitlinie aus dem Jahr 2018 wird vom *College of American Pathologists* dringend empfohlen, alle Patienten mit einem neu diagnostizierten HNSCC auf HR-HPV zu screenen. Als primäres Screeningverfahren ist die p16-Immunhistochemie beschrieben. Es gibt keine Empfehlung für eine Kombination mehrerer Methoden zum Nachweis einer HR-HPV-Infektion [4]. Da der direkte Nachweis von E6-/E7-Onkogentranskripten auf eine aktive Infektion zurückgeführt werden kann, sind weitere Methoden notwendig, um eine klinisch relevante HPV-Infektion von einer latenten unterscheiden zu können.

4.7 Aussagekraft des Onkogentranskriptnachweises an FFPE-Material

Alle Untersuchungen mittels PCR wurden in diesem retrospektiv ausgewählten Kollektiv an FFPE-Material durchgeführt. Die Untersuchung von und der Vergleich mit nativem (nicht formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem FFPE-Material aus Biopsien oder Tumorexisdaten war nicht Ziel und Inhalt dieser Arbeit. Es ist allgemein bekannt, dass die Qualität extrahierter Nukleinsäuren (DNA und mRNA) deutlich schlechter ist als aus nativen Präparaten. Die Extraktion von mRNA aus FFPE-Material gestaltet sich aufgrund der leichten Degradierbarkeit von mRNA dabei besonders anspruchsvoll. In diese Versuchsreihe ist es durch die spezifische Auswahl von RT-PCR-Primern gelungen, E6/E7-Onkogentranskripte in einem großen Teil der untersuchten high-risk-HPV-positiven Fälle nachzuweisen. Zur Qualitätssicherung der verwendeten mRNA-Proben wurde eine housekeeping-RT-PCR durchgeführt. Amplifiziert wurde eine Sequenz aus dem PPP1CA-Gen. Lediglich in 3 Proben von

insgesamt 53 (5,6 %; 3/53) untersuchten Proben konnte kein Amplifikat in der housekeeping-PCR nachgewiesen werden. In der Spektrophotometrie wurde jeweils vorher die Konzentration und somit die Menge an extrahierter RNA gemessen. In diesen negativ ausfallenden Proben lag die RNA-Konzentration bei jeweils 10,7ng/l; 11,3ng/l und 12,4ng/l, was im Vergleich zu den übrigen Proben sehr niedrig ist. Zum Vergleich lag die mRNA-Konzentration in den restlichen 51 Proben zwischen 11ng/l und 108ng/l (im Mittel bei 38,4ng/l). Die geringen mRNA-Konzentrationen wurden als Zeichen einer starken Degradierung gewertet. Eine weitere Theorie wäre, dass die E6/E7-Onkogen transcripts bei Karzinomen mit geringeren mRNA-Konzentrationen in geringeren Mengen exprimiert worden sind. Durch die Auswahl der angewendeten Primer und den Einsatz von nested-PCR konnte die Sensitivität der Untersuchung gesteigert werden. In 42 von 53 Proben (79,2 %) konnte ein Onkogen transcript nachgewiesen werden. In 11 Proben konnten kein Amplifikat in der nested-RT-PCR nachgewiesen werden. In 3 dieser Fälle (Fälle 40, 112, 120) war trotz ausreichender Primärtumorgröße kein Amplifikat in der housekeeping-PCR nachweisbar. Alle diese Karzinome waren in den Tonsillen lokalisiert. In diesen Proben ist von einer starken Degradierung der mRNA durch die Formalinfixierung, in den restlichen 8 Proben von einer latenten HPV-Infektion auszugehen.

In der Arbeit von Smeets et al. [76] wurden 48 native HNSCC-Proben auf ihren HPV-Status untersucht. Die Karzinome wurden auf DNA- und RNA-Ebene untersucht und in 3 Kategorien eingeteilt, je nach Untersuchungsergebnis mittels GP5+/6+-PCR oder E6/E7-Onkogen transcript nachweises. Zwölf der 48 (25 %) Karzinome waren auf DNA- und RNA-Ebene HPV-positiv und 10 dieser 12 (83,3 %) Karzinome waren mit HPV 16 infiziert. Der Anteil an HPV-assoziierten Karzinomen war in unserem Kollektiv deutlich höher. Hier war in 42 der insgesamt 96 (43,7 %) Fälle eine transkriptionell aktive HPV-Infektion nachweisbar und für 40 dieser 42 Fälle (95,2 %) wurde eine HPV16-Infektion festgestellt. Die Autoren kombinierten die PCR-Diagnostik mit der p16-Immunohistochemie und konnten somit belegen, dass durch p16-Testung und in Folge GP5+/6+ 100 % Sensitivität und 100 % Spezifität erzielt werden kann. Allerdings wurden Proben, die in der DNA-Untersuchung ein positives Ergebnis zeigten ohne Nachweis von E6/E7-Onkogen transcripts, von den Autoren als HPV-negativ angesehen, und zwar mit der Begründung, dass das Virus biologisch inaktiv sei.

4.8 Anwendung der Methode in der Praxis

Die PCR ist eine mittlerweile standardisierte Methode, die im Laboralltag bereits seit vielen Jahren eingesetzt wird. Sie bietet den Vorteil, dass mittels spezifischer Primer bestimmte Sequenzen des untersuchten Genoms amplifiziert werden können. So kann beim Nachweis einer Zielstruktur eine wesentlich bessere Sensitivität erreicht werden. Nachteilig ist, dass die eingesetzte Methode zeitlich und technisch aufwendig ist. Mittlerweile sind kommerzielle KITS zum Nachweis von HPV-DNA und mRNA im Einsatz, die gute Ergebnisse bei der Anwendung sowohl an nativem Material als auch FFPE-Material liefern.

Nach der aktuellen amerikanischen Leitlinie von 2018 [4] wird bei der Neudiagnose eines Oropharynxkarzinoms stark empfohlen, eine HPV-Diagnostik durchzuführen. Des Weiteren wird eine p16-immunhistochemische Untersuchung empfohlen. Bei stark positiver p16-Expression (>70 % Reaktion im Nukleus und Zellplasma) wird zudem eine weitere HR-HPV-Diagnostik empfohlen. Allerdings gibt es aktuell keine offizielle Empfehlung, welche Methode bevorzugt angewendet werden soll. Folgende Methoden werden vorgeschlagen: HPV-DNA-PCR, HR-HPV-ISH, HPV-RT-PCR, HR-HPV-mRNA-ISH. Außer bei Oropharynxkarzinomen wird bei Halslymphknotenmetastasen empfohlen, auf den HPV-Status zu testen.

In der deutschen Leitlinie von 2012 zur Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen wird die Assoziation der Oropharynxkarzinome mit HPV zwar erwähnt, aber nicht genauer auf die weitere Aufarbeitung und HR-HPV-Diagnostik der histologischen Proben eingegangen.

Literaturverzeichnis

1. Sturgis, E.M. and K.K. Ang, The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? *J Natl Compr Canc Netw*, 2011. **9**(6): p. 665-73.
2. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Sankaranarayanan R, M.E., Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S, *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. Anticancer Research, 1998. **18**(6 B): p. 4779-86.
4. Lewis, J.S., Jr., et al., Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 2018. **142**(5): p. 559-597.
5. Agoston, E.S., et al., Polymerase chain reaction detection of HPV in squamous carcinoma of the oropharynx. *Am J Clin Pathol*, 2010. **134**(1): p. 36-41.
6. Pfeifer RM, C.A., Engels EA, Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the united states. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. **29**: p. 4294.
7. ICD-10 C00-C14, C30-C32 HNO-Tumoren Inzidenz und Mortalität in 1998-2016. München.
8. Saulnier P., L.L., Vielh P., Casiraghi O., Msakni I., Drusch F., Temam S., Melkane A., Auperin A., *Human papillomavirus prevalence and prognostic implication in oropharyngeal squamous cell carcinomas*. . *Head and Neck*, 2014. **36**: p. 257-265.
9. Agoston E, R.S., Mehra K, Birch C, Semmel D, Mirkovic J, Haddad R, Posner M, Kindelberger D, Krane J, et al. , *Polymerase chain reaction detection of hpv in squamous carcinoma of the oropharynx*. *American journal of clinical pathology*, 2010. **134**(1): p. 36-41.
10. O'Sullivan, B., et al., 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. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(4): p. 440-451.
11. Gregor RT, H.F., Balm AJ, van der Laan BF, Baris G, *Radiation induced tumors of the head and neck*. . *The Journal of Laryncology and Otology*, 1995. **109**: p. 346.
12. Gillison, M.L., et al., Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(9): p. 709-20.
13. Shi, W., et al., Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(36): p. 6213-21.
14. Vokes, E.E., N. Agrawal, and T.Y. Seiwert, *HPV-Associated Head and Neck Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(12): p. djv344.
15. Gillison, M.L., et al., Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(6): p. 407-20.
16. Schlecht, N.F., et al., A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol*, 2011. **24**(10): p. 1295-305.
17. Sankaranarayanan, R., et al., *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. Anticancer Res, 1998. **18**(6b): p. 4779-86.
18. Raghupathy, R., E.P. Hui, and A.T. Chan, *Epstein-Barr virus as a paradigm in nasopharyngeal cancer: from lab to clinic*. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2014: p. 149-53.

Literatur

19. L. Barnes, J.E., P. Reichart, D. Sidransky Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours., in World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press: Lyon.
20. Deeken, J.F., et al., The rising challenge of non-AIDS-defining cancers in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(9): p. 1228-35.
21. Vaughan, T.L., et al., Formaldehyde and cancers of the pharynx, sinus and nasal cavity: I. Occupational exposures. *Int J Cancer*, 1986. **38**(5): p. 677-83.
22. Maier, H., N. De Vries, and G.B. Snow, *Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer*. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1991. **16**(4): p. 406-12.
23. Vaughan, T.L., et al., Work in dry cleaning and the incidence of cancer of the oral cavity, larynx, and oesophagus. *Occup Environ Med*, 1997. **54**(9): p. 692-5.
24. Gordon, I., P. Boffetta, and P.A. Demers, A case study comparing a meta-analysis and a pooled analysis of studies of sinonasal cancer among wood workers. *Epidemiology*, 1998. **9**(5): p. 518-24.
25. Dietz, A., et al., Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study. *Int J Cancer*, 2004. **108**(6): p. 907-11.
26. Hauptmann, M., et al., *Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries*. *Am J Epidemiol*, 2004. **159**(12): p. 1117-30.
27. Becher, H., et al., Occupation, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and laryngeal cancer risk. *Int J Cancer*, 2005. **116**(3): p. 451-7.
28. Kutler, D.I., et al., A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1249-56.
29. Rosenberg, P.S., B.P. Alter, and W. Ebell, *Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry*. *Haematologica*, 2008. **93**(4): p. 511-7.
30. Hashim, D., et al., The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Ann Oncol*, 2016. **27**(8): p. 1619-25.
31. Hennessey, P.T., W.H. Westra, and J.A. Califano, Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*, 2009. **88**(4): p. 300-6.
32. Herrero, R., et al., Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(23): p. 1772-83.
33. Rivera, C. and B. Venegas, Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*, 2014. **8**(1): p. 7-11.
34. P. Zengel O. Guntinas-Lichius S. Ihrler M. Mollenhauer, G.A., *Hpv-assoziierte oropharyngeale Karzinome*. *Der Pathologe*. **35**: p. 127-142.
35. Hammarstedt L, N.A., Attner P Incidence of human papillomavirus (hvp) positive tonsillar carcinoma in stockholm, sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *International Journal of Cancer*, 2009. **125**: p. 362.
36. Rath, T.J., et al., Solid Lymph Nodes as an Imaging Biomarker for Risk Stratification in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2017. **38**(7): p. 1405-1410.
37. Kian Ang K, H.J., Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RH, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP and Gillison ML *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2010. **363**(1): p. 24-35.

38. Ang, K.K., et al., *Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(1): p. 24-35.
39. Huang, S.H., et al., Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012. **82**(1): p. 276-83.
40. Satterwhite, C.L., et al., Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis*, 2013. **40**(3): p. 187-93.
41. De Vuyst, H., et al., *HPV infection in Europe*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(15): p. 2632-9.
42. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
43. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
44. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. *Virology*, 2004. **324**(1): p. 17-27.
45. Ajila, V., et al., Human Papilloma Virus Associated Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Sex Transm Dis*, 2015. **2015**: p. 791024.
46. Papillomaviruses, H., IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
47. Talis, A.L., J.M. Huibregtse, and P.M. Howley, The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem*, 1998. **273**(11): p. 6439-45.
48. Aguilar-Martinez, E., C. Morrisroe, and A.D. Sharrocks, *The ubiquitin ligase UBE3A dampens ERK pathway signalling in HPV E6 transformed HeLa cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119366.
49. Alp Avci, G., [Genomic organization and proteins of human papillomavirus]. *Mikrobiyol Bul*, 2012. **46**(3): p. 507-15.
50. Lace, M.J., et al., The E8--E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J Virol*, 2008. **82**(21): p. 10841-53.
51. Rautava, J. and S. Syrjanen, *Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis*. *Head Neck Pathol*, 2012. **6 Suppl 1**: p. S3-15.
52. zur Hausen, H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(5): p. 342-50.
53. Thatte, J., et al., The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif Links DNA Damage Response Signaling to E6 Inhibition of p53 Transcriptional Activity. *J Virol*, 2018. **92**(16).
54. Thierry, F., Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 375-9.
55. Assmann G, S.K., *Hpv-assoziierte Plattenepithelkarzinogenese*. *Der Pathologe*, 2011. **32**(5): p. 391-398.
56. Sapp, M. and M. Bienkowska-Haba, Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *Febs j*, 2009. **276**(24): p. 7206-16.
57. Schwartz, S., Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 2013. **445**(1-2): p. 187-96.
58. Kadaja, M., et al., Papillomavirus DNA replication -from initiation to genomic instability. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 360-8.
59. Wu, C., N. Kajitani, and S. Schwartz, *Splicing and Polyadenylation of Human Papillomavirus Type 16 mRNAs*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(2).

Literatur

60. Vaeteewoottacharn, K., et al., Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology Journal*, 2005. **2**(1): p. 50.
61. Olmedo-Nieva, L., et al., The Role of E6 Spliced Isoforms (E6*) in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Viruses*, 2018. **10**(1).
62. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 2286-302.
63. Ajiro, M., et al., Intron definition and a branch site adenosine at nt 385 control RNA splicing of HPV16 E6*I and E7 expression. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46412.
64. Ajiro, M. and Z.M. Zheng, E6^ΔE7, a novel splice isoform protein of human papillomavirus 16, stabilizes viral E6 and E7 oncoproteins via HSP90 and GRP78. *mBio*, 2015. **6**(1): p. e02068-14.
65. Islam, S., et al., Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. *PLoS One*, 2017. **12**(2): p. e0172760.
66. Doorbar, J., et al., Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*, 1990. **178**(1): p. 254-62.
67. Schneider-Gädicke, A. and E. Schwarz, Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *Embo j*, 1986. **5**(9): p. 2285-92.
68. Smotkin, D., H. Prokoph, and F.O. Wettstein, Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol*, 1989. **63**(3): p. 1441-7.
69. Walline, H.M., et al., Integration of high-risk human papillomavirus into cellular cancer-related genes in head and neck cancer cell lines. *Head Neck*, 2017. **39**(5): p. 840-852.
70. Sotlar, K., *Die Infektion mit humanen Papillomaviren*. *Der Pathologe*, 2008. **29**(2): p. 153-156.
71. Netzkler R., D., J. Rassow, K. Hauser *Biochemie*. 2006: Thieme.
72. Sartor, M., et al., Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 1999. **80**(1): p. 79-86.
73. McConnell, B.B., et al., Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4-and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(3): p. 1981-9.
74. El-Naggar, A.K. and W.H. Westra, p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head & Neck*, 2012. **34**(4): p. 459-461.
75. Nuovo, G.J., In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol Biol*, 2011. **688**: p. 35-46.
76. Smeets, S.J., et al., A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p. 2465-72.
77. de Roda Husman, A.M., et al., The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, 1995. **76 (Pt 4)**: p. 1057-62.
78. Heinrich Iro, R.P., Gerhard Gervers in *Hald-Nasen-Ohren Heilkunde*. Thieme.
79. Ben-Ezra, J., et al., Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem*, 1991. **39**(3): p. 351-4.
80. Rinaldo A, D.K., Ferlito A, The language of surgical pathology-a precis for the head and neck surgeon. *Oral Oncology*, 2004. **40**: p. 233-5.

Literatur

81. Resnick, R.M., et al., Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(18): p. 1477-84.
82. Becker, C., et al., Die 8. Version der TNM-Klassifikation – Fluch oder Segen für das Oropharynxkarzinom? *HNO*, 2020.
83. Sinha, P., et al., High metastatic node number, not extracapsular spread or N-classification is a node-related prognosticator in transorally-resected, neck-dissected p16-positive oropharynx cancer. *Oral Oncol*, 2015. **51**(5): p. 514-20.
84. Diemer, S.M., Dietz, D., Wallwiener, R., Kandolf, K., Sotlar, A., Stubner, B., Bultmann, B., Detection of high-risk human papillomavirus e6 and e7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested rt-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 2004. **74**: p. 107-116.
85. Saiki, R.K., et al., Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 1986. **324**(6093): p. 163-6.
86. Manos, Y.T., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R., Wolinsky, S.M., et al., *Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papilloma-viruses*. *Cancer cells*, 1989. **7**(17): p. 209-14.
87. Boero, I.J., et al., Importance of Radiation Oncologist Experience Among Patients With Head-and-Neck Cancer Treated With Intensity-Modulated Radiation Therapy. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(7): p. 684-90.
88. Ferrer, I., et al., Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol*, 2007. **17**(3): p. 297-303.
89. Ahlfen, S., et al., *Determinants of RNA quality from FFPE samples*. *PLoS One*, 2007. **2**(12): p. e1261.
90. Masuda, N., et al., Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(22): p. 4436-43.
91. Holzinger, D., et al., Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res*, 2012. **72**(19): p. 4993-5003.
92. Argirion, I., et al., Increasing prevalence of HPV in oropharyngeal carcinoma suggests adaptation of p16 screening in Southeast Asia. *J Clin Virol*, 2020. **132**: p. 104637.
93. Trottier, H., et al., *Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(7): p. 1274-80.
94. Bukhari, N., et al., Prevalence of Human Papilloma Virus Sub Genotypes following Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in Asian Continent, A Systematic Review Article. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019. **20**(11): p. 3269-3277.
95. Rietbergen, M.M., et al., Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 2013. **132**(7): p. 1565-71.
96. Rietbergen, M.M., et al., Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol*, 2013. **24**(11): p. 2740-5.
97. Rietbergen, M.M., et al., Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*, 2014. **134**(10): p. 2366-72.
98. Braakhuis, B.J., et al., Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(13): p. 998-1006.

Literatur

99. Prigge, E.S., et al., Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 2017. **140**(5): p. 1186-1198.
100. Sotlar, K., et al., Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol*, 1998. **69**(2): p. 114-21.

Appendix

Tabelle 30: Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisation und pTNM-Klassifikation des Kollektivs

Fall -Nr	Geschlecht	Alter	Lokalisation	pTNM-Klassifikation
28	m	49	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3
30	w	48	Tonsille	pT1, pN1 (1/20), Mx; G3
31	w	48	Tonsille	pT1, pN1 (1/20), Mx; G3
32	m	47	Tonsille	pT2, pN1 (1/12), Mx; G3
33	m	47	Tonsille	pT2, pN1 (1/12), Mx; G3
34	m	47	Tonsille	pT2, pN1 (1/12), Mx; G3
37	m	58	Tonsille	pT3, pN2b (2/30), Mx; G2, Rx
38	m	58	Tonsille	pT3, pN2b (2/30), Mx; G2, Rx
39	m	58	Tonsille	pT3, pN2b (2/30), Mx; G2, Rx
40	m	67	Tonsille	pT3 (>4,0cm), pN2a (1/18), Mx; G2, R1
41	w	55	Tonsille	pT2, pN2b (3/24), Mx; G3
42	w	65	Tonsille	pT1, pN2a (1/31), Mx; G2
43	m	67	Tonsille	pT3 (>4,0cm), pN2a (1/18), Mx; G2, R1
44	w	67	Tonsille	pT3, pN1 (1/19), Mx, L0, V0; G3, R1
45	w	59	Zungengrund	ypT3, ypN2 (2/3), Mx, L1, V1, Pn1; G3
46	m	49	Tonsille	pT2, pN1 (1/35), Mx; G2
47	w	76	Tonsille	pT1, pN1 (1/19), Mx; G3, R0
48	w	43	Tonsille	pT1, pN1, Mx; G3
49	m	65	Tonsille	pT2, pN2b (8/26), Mx; G3
50	m	74	Tonsille	pT2, pN2b (4/33), Mx; G2, R1
51	w	58	Tonsille	pT1, pN3 (5/9), Mx; G3
52	m	61	Oropharynx	pT2, pN2b (3/10), Mx; G3
53	m	71	Tonsille	pT2, pN2c (7/17), Mx; G3
54	m	63	Tonsille	pT2, pN2b (6/18), Mx; G2
55	m	67	Tonsille	pT2, pN2b (5/43), Mx; G3 (abschnittsweise)
56	m	59	Tonsille	pT3, pN3 (5/28), Mx; G3
57	m	56	Tonsille	pT2, pN2b (3/15), pMx; G3
58	m	55	Tonsille	pT3, pN0 (0/12), Mx; G2
59	m	60	Tonsille/ Mundboden	pT4, pN2b (5/27), Mx; G3
60	m	75	Tonsille	pT3, pN2c (16/28), Mx; G2-3
61	w	58	Tonsille	pT3, pN2b (3/32), Mx; G3
62	m	59	Tonsille	pT2, pNx, Mx; G3
63	m	59	Tonsille	pT1, pNx, Mx; G3
64	m	61	Zungengrund	pT2, pN2c (9/24), Mx, L1, V0, Pn1; G3, R0
65	m	61	Zungengrund	pT2, pN2c (9/24), Mx, L1, V0, Pn1; G3, R0
66	m	60	Tonsille	pT2, pN2a (1/39), Mx; G3, R1
67	m	74	Tonsille	pT2, pN2b (4/33), Mx; G2, R1
68	m	64	Tonsille	pT2, pN1 (1/14), Mx; G3
69	m	55	Tonsille	pT2, pN3a (2/26), Mx; G3

70	m	55	Tonsille	pT1, pN1 (3/9), Mx; G3
71	w	57	Tonsille	pT2, pNx, Mx; G3
72	m	52	Tonsille	pT2, pN1 (1/23), Mx; G2
73	m	55	Tonsille	pT1, pN1 (1/42), Mx; G3
74	m	55	Tonsille	pT1, pN1 (1/42), Mx; G3
75	m	51	Tonsille	pT2, pN0, Mx; G3
76	m	59	Tonsille	pT3, pN3 (5/28), Mx; G3
77	m	67	Tonsillenloge	pT2, pN2b (5/18), Mx; G3
78	m	64	Tonsille	pT2, pN2b (3/17), Mx; G3
79	m	66	Oropharynx	pT3, pN1 (1/34), Mx; G2
80	m	65	Tonsille	pT2, pN1 (1/17), Mx; G2
81	w	46	Glossotonsillarfurche	pT2, pN0 (0/15), Mx; G2
82	m	57	Tonsille	pT3, pN0 (0/19), Mx; G2
84	w	46	Tonsille	pT2, pN2b (3/12), Mx; G3, R0
85	w	55	Tonsille	pT1, pN2b (4/12), Mx; G3, R0
86	m	59	Glossotonsillarfurche	pT3, pN1 (3/53), Mx; G3
87	w	62	Tonsille	pT1, pN2 (3/25), Mx; G3
88	m	57	Tonsille	pT2, pN2b (4/17), Mx; G3
89	m	52	Tonsille	pT2, pN2b (5/29), Mx; G3
90	m	52	Tonsille	pT3, pN0 (0/5), Mx; G2, R0
91	m	75	Tonsille	pT2, pN2 (2/42), Mx; G3
92	m	61	Tonsille	pT2, pN0 (0/18), Mx; G3, R1
93	w	62	Tonsille	pT3, pN0 (0/22), Mx; G2, R1
94	m	55	Tonsille	pT2, pN0 (0/10), Mx; G3
95	m	64	Tonsille	pT2, pN0 (0/45), Mx; G3
96	w	84	Tonsille	pT3, pN2c (8/19), Mx; G3
97	m	48	Tonsille	pT2, pN2 (2/13), Mx; G3, R1
98	m	68	Tonsille	pT2, pN1 (1/31), Mx; G3
99	m	54	Tonsille	pT1, pN2a (1/1), Mx; G3
100	m	65	Tonsille	pT1, pNx, Mx; G3
101	m	71	Zungengrund	pT3, pN0 (0/30), Mx; G1
102	m	50	Tonsille	pT1, pN2b (26/45), Mx; G3
103	m	52	Gaumenbogen	pT2, pN2c (4/19), Mx; G2-3
104	w	46	Tonsille	pT2, pN1 (1/18), Mx; G3
105	w	64	Tonsille	pT3, pN0 (0/12), Mx; G3
106	w	71	Tonsille/ Pharynxwand	pT3, pN0 (0/34), Mx; G2
107	m	56	Tonsille	pT2, pN0 (0/19), Mx; G2
108	w	49	Tonsille	pT1, pN0 (0/12), Mx; G3
109	w	81	Tonsille	pT2, pN2b (2/22), Mx; G3
110	w	76	Tonsille	pT2, pN2b (7/29), Mx, G2
111	m	56	Tonsille	pT2, pN1 (1/11), Mx; G3
112	m	59	Tonsille	pT2, pN0 (0/17), Mx; G3
113	w	83	Tonsille	pT2, pN1 (1/6), Mx; G2-3
114	m	56	Tonsille	pT2/3, pN2b (6/26), Mx; G3
115	w	56	Tonsille	pT1, pN2b (3/34), Mx; G3
116	m	66	Glossotonsillarfurche	pT3, pN1 (1/29), Mx; G3

117	m	61	Tonsille	pT2, pNx, Mx; G2, R1
118	m	53	Tonsille	pT2, pN0 (0/8), Mx; G3
119	m	71	Tonsille	pT3, pN0 (0/25), Mx; G3
120	w	53	Tonsille	pT2, pN0 (0/3), Mx; G2
121	m	67	Tonsille	pT3, pN0 (0/33), Mx; G2-3
122	m	62	Tonsille	pT2, pN0 (0/28), Mx; G3
123	m	57	Tonsille	pT1, pN2b (2/40) Mx; G3
124	w	66	Tonsille	pT2, pN1 (1/13), Mx; G2
125	m	47	Tonsille	pT1, pN2c (2/20), Mx; G2
126	w	61	Gaumenbogen	pT1, pN1 (1/22), Mx; G2
127	m	58	Tonsille	pT2, pN0 (0/24), Mx; G2
129	m	49	Tonsille	pT2, pN1 (1/29), Mx; G2
130	m	46	Tonsille	pT1, pN1 (1/20), Mx; G3
132	m	61	Tonsille	pT3, pN2b (5/24), Mx; G3
133	m	56	Glossotonsillarfurche	pT2, pN0 (0/17), Mx; G3
134	m	55	Tonsille	pT4a, pN2b (4/30), Mx; G2-3
135	m	56	Tonsille	pT3, pN1 (2/20), Mx; G3
136	m	61	Tonsille	pT3, pN0 (0/18), Mx; G3

Tabelle 31: Gesamtkollektiv. 0 steht für negatives Ergebnis in der PCR oder Immunhistochemie, 1 steht für positives Ergebnis in der PCR oder Immunhistochemie.

Fall- Nr.	Alter	Geschl	Material echt	pTNM-Klassifikation	Prognose-stadium	p16	Multiplex HPV-PCR	HPV-Typ	RNA-Ergebnisse HPV-nRT-PCR
28	49	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	0	0	
30	48	w	Tonsille	pT1, pN1, pMx; G3	III	1	1	16	1
32	47	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G3	III	1	0	0	
38	58	m	Tonsille	pT3, pN2b, pMx; G2, Rx	IVA	0	0	0	
39	58	m	Tonsille	pT3, pN2b, pMx; G2, Rx	IVA	0	0	0	
40	67	m	Tonsille	pT3, pN2a, pMx; G2, R1	IVA	1	0	16	0
41	55	w	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
42	65	w	Tonsille	pT1, pN2a, pMx; G2	IVA	1	1	16	1
44	67	w	Tonsille	pT3, pN1, pMx, L0, V0; G3, R1	III	1	1	16	1
45	59	w	Zungengrund	pT3, pN2, pMx, L1, V1, Pn1; G3	IVA	0	0	0	
46	49	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G2	IVA	0	0	0	
47	76	w	Tonsille	pT1, pN1, pMx; G3, R0	III	1	1	16	1
48	43	w	Tonsille	pT1, pN1, pMx; G3	III	1	0	0	
49	65	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	0	0	0	
50	74	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G2, R1	III	1	1	16	1
51	58	w	Tonsille	pT1, pN3, pMx; G3	IVB	1	0	0	
52	61	m	Oropharynx	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	0

53	71	m	Tonsille	pT2, pN2c, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
54	63	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G2	IVA	1	1	16	1
55	67	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	0	0	0	
56	59	m	Tonsille	pT3, pN3, pMx; G3	IVB	1	1	16	1
57	56	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
58	55	m	Tonsille	pT3, pN0, pMx; G2	III	1	1	16	1
59	60	m	Tonsille/ Mundboden	pT4, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
60	75	m	Tonsille	pT3, pN2c, pMx; G2-3	IVA	0	0	0	
61	58	w	Tonsille	pT3, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	0
62	59	m	Tonsille	pT2, pNx, pMx; G3		0	0	0	
63	59	m	Tonsille	pT1, pNx, pMx; G3		0	0	0	
65	61	m	Zungengrund	pT2, pN2c, pMx, L1, V0, Pn1; G3, R0	IVA	0	0	0	
66	60	m	Tonsille	pT2, pN2a, pMx; G3, R1	IVA	1	1	16	1
68	64	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G3	III	1	1	16	1
69	55	m	Tonsille	pT2, pN3a, pMx; G3	IVB	1	1	16, 66	1(16), 0(66)
70	55	m	Tonsille	pT1, pN1, pMx; G3	III	1	1	16	1
71	57	w	Tonsille	pT2, pNx, pMx; G3		0	0	0	
72	52	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G2	III	0	0	0	
73	55	m	Tonsille	pT1, pN1, pMx; G3	III	1	1	16	1
75	51	m	Tonsille	pT2, pN0, pMx; G3	II	1	1	16	1
76	59	m	Tonsille	pT3, pN3, pMx; G3	IVB	1	1	16	0
77	67	m	Tonsillenloge	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	0	0	0	

78	64	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	18	0
79	66	m	Oropharynx	pT3, pN1, pMx; G2	III	0	0	0	
80	65	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G2	III	1	1	16	1
81	46	w	Glossotonsillarfurche	pT2, pN0, pMx; G2	II	0	0	0	
82	57	m	Tonsille	pT3, pN0, pMx; G2	III	0	0	0	
84	46	w	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3, R0	IVA	1	1	16	1
85	55	w	Tonsille	pT1, pN2b, pMx; G3, R0	IVA	1	1	16	1
86	59	m	Glossotonsillarfurche	pT3, pN1, pMx; G3	III	0	0	0	
87	62	w	Tonsille	pT1, pN2, pMx; G3	IVA	1	0	0	
88	57	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
89	52	m	Tonsille	pT2, pN2b, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
90	52	m	Tonsille	pT3, pN0, pMx; G2, R0	III	1	1	16	1
91	75	m	Tonsille	pT2, pN2, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
92	61	m	Tonsille	pT2, pN0, pMx; G3, R1	II	0	0	0	
93	62	w	Tonsille	pT3, pN0, pMx; G2, R1	III	0	0	0	
94	55	m	Tonsille	pT2, pN0, pMx; G3	II	1	0	33	1
95	64	m	Tonsille	pT2, pN0, pMx; G3	II	1	1	59	1
96	84	w	Tonsille	pT3, pN2c, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
97	48	m	Tonsille	pT2, pN2, pMx; G3, R1	IVA	1	1	16	1
98	68	m	Tonsille	pT2, pN1, pMx; G3	III	1	1	18	0
99	54	m	Tonsille	pT1, pN2a, pMx; G3	IVA	1	1	16	1
100	65	m	Tonsille	pT1, pNx, pMx; G3		1	0	0	

101	71	m	Zungengrund	pT3, pN0, pMx; G1	III	0	0	0	
102	50	m	Tonsille	pT1, pN2b (26/45), pMx; G3	IVA	1	1	16, 66	1(16), 0(66)
103	52	m	Gaumenbogen	pT2, pN2c (4/19), pMx; G2-3	IVA	0	0	16	0
104	46	w	Tonsille	pT2, pN1 (1/18), pMx; G3	III	1	1	16	1
105	64	w	Tonsille	pT3, pN0 (0/12), pMx; G3	III	0	0	0	
106	71	w	Tonsille/ Pharynxwand	pT3, pN0 (0/34), pMx; G2	III	1	1	16	1
107	56	m	Tonsille	pT2, pN0 (0/19), pMx; G2	II	0	0	0	
108	49	w	Tonsille	pT1, pN0 (0/12), pMx; G3	I	0	0	16	0
109	81	w	Tonsille	pT2, pN2b (2/22), pMx; G3	IVA	1	1	16	1
110	76	w	Tonsille	pT2, pN2b (7/29), pMx, G2	IVA	1	0	0	
111	56	m	Tonsille	pT2, pN1 (1/11), pMx; G3	III	1	1	16	1
112	59	m	Tonsille	pT2, pN0 (0/17), pMx; G3	II	1	1	16	0
113	83	w	Tonsille	pT2, pN1 (1/6), pMx; G2-3	III	0	0	0	
114	56	m	Tonsille	pT2/3, pN2b (6/26), pMx; G3	IVA	0	0	0	
115	56	w	Tonsille	pT1, pN2b (3/34), pMx; G3	IVA	1	1	16	1
116	66	m	Glossotonsillarfurche	pT3, pN1 (1/29), pMx; G3	III	1	0	0	
117	61	m	Tonsille	pT2, pNx, pMx; G2, R1		1	1	16	1
118	53	m	Tonsille	pT2, pN0 (0/8), pMx; G3	II	1	1	16	1
119	71	m	Tonsille	pT3, pN0 (0/25), pMx; G3	III	1	1	16	1
120	53	w	Tonsille	pT2, pN0 (0/3), pMx; G2	II	1	1	35	0
121	67	m	Tonsille	pT3, pN0 (0/33), pMx; G2-3	III	0	0	0	
122	62	m	Tonsille	pT2, pN0 (0/28), pMx; G3	II	0	0	0	

123	57	m	Tonsille	pT1, pN2b (2/40) pMx; G3	IVA	1	1	16	1
124	66	w	Tonsille	pT2, pN1 (1/13), pMx; G2	III	1	1	16	1
125	47	m	Tonsille	pT1, pN2c (2/20), pMx; G2	IVA	0	0	0	
126	61	w	Gaumenbogen	pT1, pN1 (1/22), pMx; G2	III	0	0	0	
127	58	m	Tonsille	pT2, pN0 (0/24), pMx; G2	II	0	0	0	
129	49	m	Tonsille	pT2, pN1 (1/29), pMx; G2	III	0	0	0	
130	46	m	Tonsille	pT1, pN1 (1/20), pMx; G3	III	0	0	0	
131	46	m	Tonsille	pT2, pN1 (2/23), pMx; G3	III	0	0	0	
132	61	m	Tonsille	pT3, pN2b (5/24), pMx; G3	IVA	1	0	0	
133	56	m	Glossotonsillarfurche	pT2, pN0 (0/17), pMx; G3	II	1	1	16	0
134	55	m	Tonsille	pT4a, pN2b (4/30), pMx; G2-3	IVA	0	0	0	
135	56	m	Tonsille	pT3, pN1 (2/20), pMx; G3	III	0	0	0	
136	61	m	Tonsille	pT3, pN0 (0/18), pMx; G3	III	1	1	16	1

Danksagung

Herrn Prof. K. Sotlar danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Assmann und Herrn Prof. S. Ihrler danke ich für die Konzeption des Themas und Zusammensetzung der Fälle.




Einen herzlichen Dank Frau Rosi Kerler, Karina Petat-Dutter und Elena Born für die intensive Betreuung während der Laborarbeit.

Vielen Dank an Herrn Prof. Juchem, der mich in den letzten Jahren motiviert hat, diese Arbeit zu Ende zu schreiben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Hagl für die Unterstützung.

Weiterhin möchte ich meiner Schwester Marina und meinen Eltern für die Unterstützung in den letzten Jahren herzlich danken.

Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Vlachea, Polyxeni

~

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Etablierung eines RT-PCR-Assays zum Nachweis von
E6/E7-Onkogen-Transkripten aus archiviertem Paraffingewebe von Plattenepithelkarzinomen
der Kopf-Hals-Region

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.11.2021

Polyxeni Vlachea

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand