

Aus dem Bereich  
Virologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Ansprechwahrscheinlichkeit der primären  
Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-  
Plattenepithelkarzinomen  
in Abhängigkeit von HPV-Status und IRF1-Expression**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**  
2020

vorgelegt von: Maria Kinberger  
geb. am 02.04.1994 in Wolfratshausen

Tag des Kolloquiums: 22.07.2021  
Dekan: Herr Prof. Dr. Michael D. Menger  
Erstberichterstatterin: Frau Prof. Dr. Sigrun Smola  
Zweitberichterstatter: Herr Prof. Dr. Christian Rübe

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten .....	15
2.1.2 Klassifikation, Staging und Differenzierung .....	18
2.1.3 Diagnostik .....	22
2.1.4 Standarttherapie.....	22
2.1.4.1 Grundprinzipien der Radiotherapie .....	23
2.1.4.2 Grundprinzipien der Radiochemotherapie .....	25
<b>2.2 Humane Papillomviren.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Virusaufbau und Genomorganisation .....	28
2.2.2 Viraler Lebenszyklus .....	29
2.2.3 Die frühen viralen Onkoproteine E6 und E7.....	31
<b>2.3 Einfluss von Humanen Papillomviren auf die Kanzerogenese der Kopfhalstumore .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose der HPV assoziierten Kopfhalstumore .....	35
2.3.2 STAT3-IRF1 Signalweg .....	37
2.3.2.1 IRF1-Expression als Prognosemarker .....	38
<b>2.4 Eigene Fragestellung .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Material/Methoden.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Material und Herstellernachweis.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	40
3.1.2 Puffer und Reagenzien.....	40
3.1.3 Chemikalien .....	41
3.1.4 Verwendeter Antikörper.....	41
<b>3.2 Fixierung des Gewebes .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Histologische und Immunhistologische Färbungen.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Versuchsablauf .....	42
3.3.1.1 Erstellung der Gewebeabschnitte.....	42
3.3.1.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	43
3.3.1.3 Immunhistochemische IRF1-Färbung.....	43
<b>3.4 Analytische Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.4.1 Anonymisiertes Patientenkollektiv.....	46
3.4.2 Analyse der Radiochemosensibilität .....	48
3.4.3 Immunreaktive Score.....	49
3.4.4 Analyse des HPV-Status .....	50
3.4.5 Statistische Auswertung .....	51
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Beschreibung der Patientenkollektivs.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung .....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Auswertung der Tumorzellen .....	58
4.2.2 Auswertung der Infiltratzellen .....	76

<b>4.3 Statistische Ergebnisse .....</b>	<b>83</b>
4.3.1 Zusammenhang von IRF1 Expression und dem HPV Status. ....	83
4.3.2 Zusammenhang zwischen IRS-Wert und Ansprechen auf primäre Radiochemotherapie ..	84
4.3.3 Zusammenhang zwischen IRS-Wert und Anzahl der Infiltratzellen .....	89
4.3.4 Zusammenhang zwischen IRS-Wert und IRF1-Positivität der Infiltratzellem.....	90
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>93</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
<b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....</b>	<b>112</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>113</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- 2D zweidimensional
- 3D dreidimensional
- 5-FU 5-Floururacil
- Bcl-2 B-cell-lymphoma-Protein
- BSA Bovine serum albumin
- C2 Alkohol
- CA Karzinom
- Ca circa
- CDK Cyclin dependet kinase
- CIN Cervical intraepithelial neoplasia
- CT Computertomographie
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- EBV Epstein-Barr-Virus
- EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
- e-Region early region
- FFPE formalin-fixed paraffin-embedded
- Gy Grey
- HE Hämatoxylin-Eosin
- HPV human papillom virus
- IFN Interferon
- IL Interleukin
- Inf Infusion
- IRF1 Interferon regulatory factor 1
- IRS Immunreaktiver Score
- kont. Inf. Konstante Infusion
- LCR long control region
- l-Region long region
- m Meter
- mg Milligramm
- min Minute
- mRNA Messanger Ribonukleinacid
- Nm Nanometer

- NTCP Normal Tissue Complication Probability
- p53 Protein p53
- PBS Phosphate buffered saline
- pRb Retinoblastom-Protein
- RCT Radiochemotherapie
- RKI Robert Koch-Institut
- Prof Professor\*in
- RT Radiotherapie
- STAT Signal Transducer and Activator of Transkription
- STIKO Ständige Impfkommission
- TBS Tris-buffered saline
- TCP Tumor Control Probability
- Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- UICC Union for International Cancer Control
- VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
- Wdh Wiederholungen
- WHO World health organisation
- ZNS zentrales Nervensystem

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: 7. TNM-Klassifikation bei Kopf-Hals-Tumoren

Tabelle 2: klinische Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

Tabelle 3: Histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Systematische Darstellung des Reagenz-Trasnferprozesses zur Gewebsfixierung

Tabelle 6: Systematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Tabelle 7: Anonymisiertes Patientenkollektiv

Tabelle 8: Auszählung der positiv gefärbten Zellen nach IRF1-Färbung

Tabelle 9: Erstellung des IRS nach Remmele und Stegner

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der prätherapeutischen IRF1-Expression des Tumorgewebes und des HPV-Status

Tabelle 11: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der Anzahl der prätherapeutischen Infiltratzellen und des HPV-Status

Tabelle 12: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der IRF1-Positivität der Infiltratzellen und des HPV-Status

Tabelle 13: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie

Tabelle 14: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des HPV-Status als Kovariabel

Tabelle 15: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des Patientenalters bei Erstdiagnose als Kovariabel

Tabelle 16: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des Geschlechts als Kovariabel

Tabelle 17: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen der Anzahl der Infiltratzellen und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie

Tabelle 18: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen der IRF1-Positivität der Infiltratzellen und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2018

Abbildung 2: Tumorlokalisationen nach Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016

Abbildung 3. Heilungs-Resultante der Radiotherapie nach Hermann Holthusen

Abbildung 4: Heilungs-Resultante der Radiochemotherapie nach Hermann Holthusen

Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum der Papillomviren

Abbildung 6: Aufbau des HPV-Genoms am Beispiel von HPV 16

Abbildung 7: Lebenszyklus eines high-risk HPV-Typen

Abbildung 8: Inaktivierung von p53 durch E6

Abbildung 9: Deregulierung des Zellzyklus durch E7

Abbildung 10: Zellzyklusderegulation durch E6 und E7

Abbildung 11: Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren

Abbildung 12: Rechenweise des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner

Abbildung 13: Statistische Auswertung der Geschlechterverteilung

Abbildung 14: Statistische Auswertung des mittleren Erkrankungsalters bei Männern und Frauen

Abbildung 15: Statistische Auswertung der Tumorlokalisierung

Abbildung 16: Statistische Auswertung des HPV-Status

Abbildung 17: Statistische Auswertung des HPV-Status abhängig von der Tumorlokalisierung

Abbildung 18: Vollremission vs. Teilremission vs. Tumorwachstum/konstantes Tumorvolumen

Abbildung 19: Ansprechen auf eine primäre Radiochemotherapie in Abhängigkeit des HPV-Status

Abbildung 20: Vollremission vs. keine Vollremission

Abbildungen 20-25: Tumor mit starker IRF1-Expression

Abbildung 26-31: Tumor mit wenig IRF1-Expression

Abbildung 32: Auswertung des IRS nach Remmele und Stegner

Abbildung 33: Gesamtmenge der Infiltratzellen

Abbildung 34: Anteil der IRF1-positiven Infiltratzellen an der Gesamtmenge der Infiltratzellen

Abbildungen 35-36: Viel Infiltratzellen

Abbildungen 37-38: Mäßig viel Infiltratzellen

Abbildungen 39-40: Wenig Infiltratzellen

Abbildungen 41-42: Starke IRF1-Positivität der Infiltratzellen

Abbildungen 43-44: Mäßig starke IRF1-Positivität der Infiltratzellen

Abbildungen 45-46: Geringe IRF1-Positivität der Infiltratzellen

### Zusammenfassung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland ca. 17.500 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren. Während sich die beiden Hauptrisikofaktoren der letzten Jahrzehnte, Nikotin- und Alkoholabusus, in der Gesellschaft rückläufig zeigen, gewinnt ein neuer Risikofaktor der Kopf-Hals-Tumore zunehmend an Bedeutung. Viele Studien belegen inzwischen, dass die Infektion mit dem high-risk Papillomvirus Typ 16 ebenfalls zu einem erhöhten Risiko führt, an einem Kopf-Hals-Tumor zu erkranken. Trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Verfahren weisen Kopf-Hals-Karzinome mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50% eine ungünstige Prognose auf, welche sich in den vergangenen Jahren kaum verbessert hat. Aus diesem Grund muss nach Methoden geforscht werden, die den Patienten neue und individuell angepasste Therapieoptionen ermöglichen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass HPV-positive Kopf-Hals-Tumoren meist eine höhere Radiosensibilität aufweisen als Kopf-Hals-Tumore ohne HPV-Assoziation. Nichtsdestotrotz gibt es unter den Patienten mit HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren eine nicht unerhebliche Anzahl an Patienten, die entweder gar nicht oder nur unzureichend auf eine Radio- oder Radiochemotherapie ansprechen. Dabei gilt es, Merkmale und molekulare Mechanismen der Tumore zu detektieren, die das Malignom sensibel gegenüber dieser Therapie machen, um entsprechend nur diesen Patienten eine Radiochemotherapie anzubieten.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Radiochemosensibilität ist eine erhöhte Expression des proapoptotischen Interferon regulatory Factors 1 (IRF1). Bei HPV-positiven Cervixkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass die durch den Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) aktivierte Expression von IRF1 zu einer erhöhten Chemosensibilität der Tumore führte. Ob dieser Effekt auch bei Kopf-Hals-Tumoren nachweisbar ist und in wieweit das humane Papillomvirus Typ 16 mit der Aktivierung des STAT3-IRF1-Signalwegs in Verbindung gebracht werden kann, soll mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv von 85 Patienten ausgewählt, die an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich erkrankt waren und primär mit einer Radiochemotherapie behandelt wurden. Bei allen Patienten wurde der HPV-Status in den Tumorgewebeproben bestimmt und durch immunhistochemischen Färbungen die Expression von IRF1 in den Tumorzellen und den, um den Tumor umgebenden, Immunzellen untersucht.

## 1. Zusammenfassung

---

Anschließend wurde die IRF1-Expression des Tumorgewebes mit Hilfe des, in der Literatur häufig verwendeten, Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner quantifiziert. Die Werte wurden nachfolgend mit dem Ergebnis der primären Radiochemotherapie verglichen, in der es entweder zu der gewünschten Vollremission des Tumorgewebes kam oder die Radiochemotherapie weniger gut anschlug und sich lediglich eine Teilremissionen oder keine Reduktion des Tumorvolumens darstellte.

In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass Tumore, die mehr IRF1 exprimierten eher dazu neigten, auf eine primäre Radiochemotherapie mit einer Vollremission des Tumorgewebes zu reagieren als Tumore mit wenig IRF1-Expression. Vor allem bei Tumoren, deren IRF1-Expression mit einem IRS-Wert von acht - was den höchsten Werten entspricht, die in dieser Arbeit erreicht wurden - angegeben wurde war die statistische Wahrscheinlichkeit einer Vollremission gegenüber Tumoren mit einem IRS-Wert von null signifikant höher. Bei HPV-positivem Status oder männlichem Geschlecht verstärkt sich dieser Effekt noch. Die Anzahl der infiltrierenden Immunzellen und das Verhältnis der IRF1-positiven Immunzellen gegenüber den IRF1-negativen Immunzellen schien hingegen nicht mit dem Ansprechen auf eine Radiochemotherapie in Verbindung zu stehen. Auch konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der IRF1-Expression nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region mit hoher IRF1-Expression wesentlich sensibler auf eine Radiochemotherapie reagierten als Karzinome mit geringer IRF1-Expression. Bei der Entscheidung, ob ein Patient mit einem prinzipiell noch operablen Kopf-Hals-Tumor primär mit einer Radiochemotherapie behandelt werden sollte, könnte dieser Faktor künftig eine entscheidende Rolle spielen, auch wenn in weiteren Arbeiten der Effekt des STAT3-IRF1-Signalweges und die beeinflussende Rolle der HPV-assoziierten Onkogene noch genauer untersucht werden müssen.

### Summary

Every year approximately 17,500 people are diagnosed with head and neck tumours in Germany. While the main risk factors, tobacco and alcohol abuse are declining the last decades a new risk factor for head and neck cancer becoming more prominent. Now many studies have shown that an infection with the high-risk papillomavirus type 16 also leads to an increased risk of developing a head and neck tumor. Despite improved diagnostic and therapeutic procedures, head and neck carcinomas still have an unfavorable prognosis with a 5-year survival rate of 50%, which has only barely improved in the recent years. For this reason, methods need to be explored to allow patients new and personalized treatment options.

It is known from the previous research that HPV-positive head and neck tumors usually have a higher radiosensitivity than head and neck tumors without HPV association. Nonetheless, among patients with HPV-positive head and neck cancer, there is a considerable number of patients who either do not respond at all or only insufficiently respond to radio- or chemoradiotherapy. It is important to detect the features and molecular mechanisms of the tumors that make the malignancy sensitive to this therapy, in order to offer only these patients a chemoradiation therapy.

An explanation for a high chemosensitivity is an increased expression of the pro-apoptotic interferon regulatory factor 1 (IRF1). It has been shown that in HPV positive cervix carcinomas the expression of IRF1, activated by the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), led to increased chemosensitivity of the tumors. Whether this effect is also detectable in head and neck tumors and to what extent the human papilloma virus type 16 can be linked to the activation of the STAT3-IRF1 signaling pathway will be examined in the present work.

For this purpose, a collective of 85 patients suffering from a squamous cell carcinoma of the head and neck were selected in this study and treated primarily with radiochemotherapy. In all patients, the HPV status was determined in the tumor tissue samples and immunohistochemical staining showed the expression of IRF1 in the tumor cells and the infiltrate cells surrounding the tumor. Subsequently, the IRF1 expression of the tumor tissue was quantified using the in the literature known Immunoreactive Score (IRS) according by Remmeli and Stegner. The values were compared to the result of primary chemoradiotherapy, in which either the desired

## 1. Zusammenfassung

---

complete remission of the tumor tissue occurred or the chemoradiation was not as successful with only a partial remission or no reduction in tumor volume.

Statistical evaluation revealed that tumors expressing more IRF1 tended to be more response to primary chemoradiotherapy with complete remission of the tumor tissue with low IRF1 expression. Especially in tumors whose IRF1 expression was categorized with an IRS score of eight, which was the highest value in this work, the statistical probability of complete remission was significantly higher than tumors with an IRS score of zero. Furthermore with HPV-positive status or male sex, this effect is more pronounced. The number of infiltrating cells and the ratio of IRF1-positive infiltrates to IRF1-negative infiltrates did not seem to be related to the response to chemoradiotherapy. Also, no statistically significant relationship between HPV status and IRF1-expression could be demonstrated.

In summary, the data showed that a squamous cell carcinoma of the head and neck region with high IRF1 expression reacted much more sensitively to chemoradiotherapy than carcinomas with low IRF1 expression. In the future, this factor could play a crucial role in deciding whether a patient with an operable head and neck tumor should be treated primarily with chemoradiotherapy. However in further work the effect of the STAT3-IRF1 signaling pathway and the impact of HPV needs further investigation.

### 2. Einleitung

#### 2.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

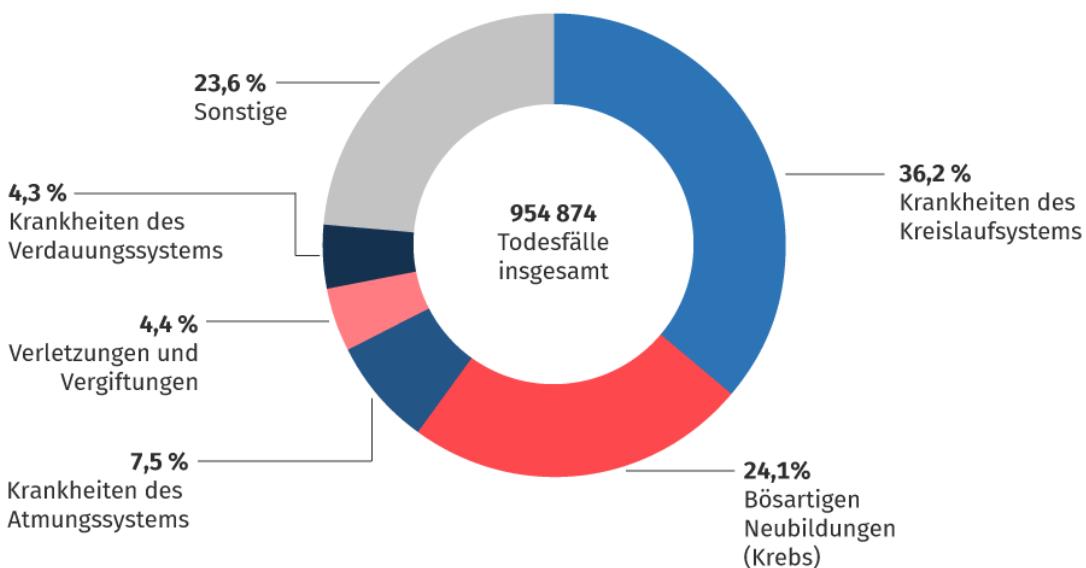
##### 2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten

###### Epidemiologie

Sowohl weltweit, als auch in Deutschland, nehmen jährlich Inzidenz und Prävalenz maligner Erkrankungen zu. So wurde in Deutschland im Jahr 2016 bei insgesamt über 492.000 Menschen eine bösartige Krebserkrankung neu diagnostiziert (Robert-Koch-Institut, 2020). Für das Jahr 2020 schätzt das Robert-Koch-Institut die Malignominzidenz auf 510.000. Daraus ergibt sich eine steigende Bedeutung der Tumorerkrankungen bei den häufigsten Todesursachen. 2016 starben in Deutschland über 229.000 Patienten an malignen Neubildungen und/oder deren Folgen. Somit stehen bösartige Erkrankungen weiterhin direkt hinter Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems an zweiter Stelle bei den häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt, 2018).

**Todesursachen nach Krankheitsarten 2018**

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020

Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2018

An Kopf-Hals-Karzinomen, unter denen Tumore an Lippe, Mundhöhle, Kehlkopf und Rachen zusammengefasst werden, erkranken in Deutschland jährlich ca. 17.500 Personen. Histologisch

## 2. Einleitung

handelt es sich dabei in 95% der Fälle um Plattenepithelkarzinome. Sehr viel seltener sind Adenokarzinome in dieser Lokalisation zu finden. Auffällig ist der deutliche Unterschied in Prävalenz und Inzidenz dieser Tumorerkrankungen zwischen den Geschlechtern. So erkrankten im Jahr 2016 etwa 12.700 Männer an einem Kopf-Hals-Karzinom, woraus sich ein Anteil von 5,0% aller diagnostizierten malignen Neubildungen des männlichen Geschlechts ergibt. Hingegen erkrankten Frauen im selben Jahr in nur ca. 4700 Fällen, was einen prozentualen Anteil von 2,0% an den Gesamtmaignomen entspricht (Robert-Koch-Institut, 2020).

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisierungen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016  
(ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)

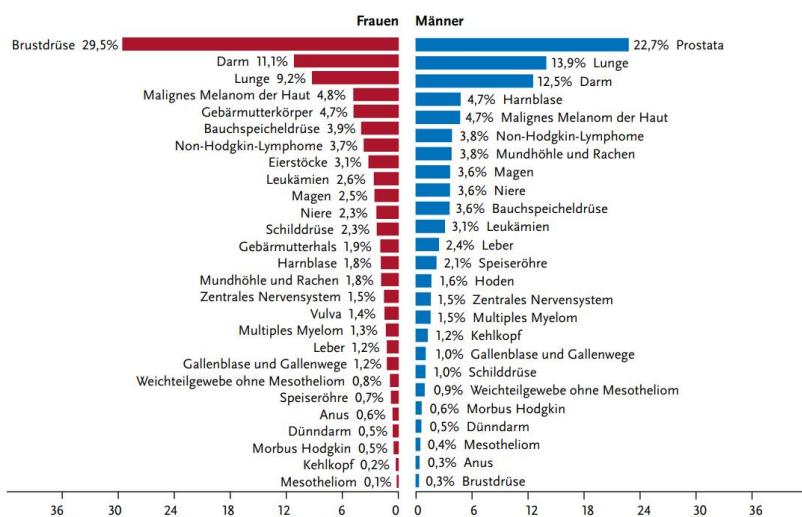


Abbildung 2: Tumorlokalisierungen nach Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016

Zu den Kopf-Hals-Tumoren zählen in dieser Abbildung die Tumore der Mundhöhle und des Rachens, sowie die Tumore des Kehlkopfs. Bei Männern ergibt dies eine Summe von rund 5,0 Prozent aller Krebsneuerkrankungen, bei Frauen entspricht der prozentuale Anteil hingegen nur 2,0 Prozent.

Die stark unterschiedliche Prävalenz der Kopf-Hals-Tumore hängt vermutlich mit Risikofaktoren, wie Tabak- und Alkoholabusus zusammen (Pantel und Guntinas-Lichius, 2011; Robert-Koch-Institut, 2020).

### Ätiologie

Maligne Tumore entstehen durch eine unbegrenzte und unkontrollierte Zellteilung. Am Anfang der Kanzerogenese steht zunächst immer die Schädigung oder Veränderung der Erbinformation einer Zelle (Löffler und Petrides, 2013). Diese Schädigung kann entweder spontan oder durch kanzerogene Einflüsse, wie zum Beispiel durch chemische Substanzen, Strahlung oder Viren, entstehen (Löffler und Petrides, 2013). Meist ist der Körper in der Lage, diesen Defekten entgegenzuwirken. Gelingt dies jedoch durch Ausfall der zelleigenen Reparaturmechanismen nicht, kommt es zur Weitervererbung der Mutationen an die Tochterzellen. Wenn durch Mutationen Onkogene aktiviert und gleichzeitig Tumorsuppressorgene gehemmt werden, teilt

sich die betroffene Zelle unabhängig von Wachstumssignalen und wird unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden und Apoptosesignalen. In Folge dessen kann ein ungehemmtes Teilungspotential der Zellen entstehen, auf dessen Basis es zur Malignomentstehung kommt (Poremba et al., 1999).

Je mehr Faktoren auf den Körper einwirken, die potenziell dazu in der Lage sind, die Erbinformation zu schädigen, desto höher ist das Risiko, an einem Malignom zu erkranken. Je nach Tumorentität gibt es verschiedene Risikofaktoren, welche die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung der jeweiligen Körperzellen erhöhen. Bei den Epithelzellen des Kopf- und Halsbereichs sind dies überwiegend erhöhter Alkohol- und Tabakkonsum, sowie humane Papillomviren (Marur et al., 2010; Voges et al., 1993).

Ca. 70-80% der diagnostizierten Kopf-Hals-Tumore sind mit Alkohol- und/oder Tabakkonsum assoziiert (Hashibe et al., 2007; Hashibe et al., 2009). So ist der Hauptrisikofaktor, an einem Oropharynxkarzinom zu erkranken, bei Nichtrauchern ein erhöhter Alkoholkonsum und bei Menschen, die keinen Alkohol konsumieren, der Nikotinabusus (Galbiatti et al., 2013). Eine Kombination der beiden kanzerogenen Noxen multipliziert das Risiko einer Karzinomentstehung (Meier et al., 1990). Ursächlich könnte hierfür die durch chronischen Alkoholkonsum reduzierte Speichelproduktion sein. Dadurch haben kanzerogene Noxen zum einen eine erheblich längere Kontaktzeit mit der Mund- und Rachenschleimhaut, zum anderen ist der Verdünnungseffekt durch den Speichel wesentlich schwächer und somit die Konzentration der Schadstoffe höher. Dies erleichtert zudem die Penetration der Noxen in die Schleimhaut (Meier et al., 1990). Jedoch unterscheiden sich je nach anatomischer Lokalisation die schädlichen Einflüsse der Genussmittel. Bei isoliertem Tabakkonsum ist das relative Risiko an einem Malignom im Larynxbereich zu erkranken 10,0 mal höher als ohne Tabakkonsum. Im Oro- und Hypopharynxbereich steigt das relative Risiko hingegen nur auf 4,0-5,0 (Maier et al., 1991). Entscheidende Unterschiede gibt es dabei je nach Heimat der Patienten. Besonders hoch ist das Risiko in Europa und Südamerika. In Nordamerika ist es hingegen deutlich geringer (Hashibe et al., 2007). Ein möglicher Erklärungsversuch für diese lokalen Differenzen liegt in den unterschiedlichen gesetzlichen Grundlagen der Inhaltsstoffe von Zigaretten. Nitrosamine und polzyklische aromatische Hydrocarbonate, welche als besonders stark kanzerogen gelten, variieren in ihrer Konzentration von Land zu Land und könnten so einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Karzinomentstehung haben. Alleiniger Alkoholkonsum scheint hingegen nur in hohen Dosen und starken Prozентen kanzerogen zu wirken. Hier ist der toxische Einfluss auf den Pharynx am größten (Hashibe et al., 2007).

Weitere Einflussfaktoren bei der Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome sind Strahlenexposition bei Lippenkarzinomen, Immunsuppression, schlechte Mundhygiene und EBV-Infektionen bei Nasopharynxkarzinomen (Voges et al., 1993; Young et al., 1988).

### Prognose

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei Männern bei etwa 48%, die 10-Jahres-Überlebensrate bei nur 36%. Bei den Frauen liegt die relative Überlebensrate nach 5 Jahren bei etwa 59% und nach 10 Jahren bei etwa 50%. Damit sind Kopf-Hals-Karzinome hinsichtlich der Prognose für die Patienten verglichen mit anderen Tumorentitäten im untersten Drittel einzuordnen (Robert-Koch-Institut 2016).

### **2.1.2 Klassifikation, Staging und Differenzierung**

Kopf-Hals-Tumore werden nach dem weltweit anerkannten TNM-System klassifiziert, welches unterschiedliche Schweregrade hinsichtlich der Ausdehnung des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und Fernmetastasen (M) anzeigt. Mit dem Präfix „c“ wird angegeben, dass die TNM-Einteilung anhand von klinischen Untersuchungen erfolgt ist. Steht hingegen ein „p“ vor der Diagnose, handelt es sich um eine (postoperativ) pathologische Erhebung. Der Zusatz R steht für das Vorhandensein von Resttumorgewebe nach Therapie. Der Zusatz G beschreibt das Grading des Tumors, also den Grad von Atypien und Entdifferenzierung des Tumorgewebes. V- und L-Zusätze können bei Bedarf zudem die Invasion von Venen und Lymphgefäßen anzeigen. Der C-Faktor gab in älteren Versionen der TNM-Klassifikation die Sicherheit der Diagnose, abhängig von den verwendeten Untersuchungsmethoden, an. Seit 2017 wird dieser jedoch nicht mehr verwendet. Je nach Lokalisation des Primärtumors gelten unterschiedliche TNM-Klassifikationen (Brierley et al., 2016). Tabelle 1 zeigt diese auf.

Tabelle 1: 7. Version der TNM-Klassifikation bei Kopf-Hals-Tumoren

Einteilung	Beschreibung
T	Primärtumor
Tx	Keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
<b>Mundhöhle</b>	
T1	Tumor $\leq$ 2cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor $>$ 2 cm, aber $\leq$ 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor $>$ 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie kortikale Knochen, tiefe äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut

## 2. Einleitung

T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Mastikatorraum, Pterygoidplatten oder Schädelbasis; oder umschließt die A. carotis interna
<b>Oropharynx</b>	
T1	Tumor $\leq$ 2cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm, aber $\leq$ 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, hartem Gaumen und Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis; oder umschließt A. carotis interna
<b>Hypopharynx</b>	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und $\leq$ 2 cm in größter Ausdehung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder > 2cm, aber $\leq$ 4cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor oder Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z.B. Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums
<b>Larynx Supraglottis</b>	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert mehr als einen benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis) befallen, ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
<b>Larynx Glottis</b>	
T1	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T1a	Ausdehnung auf eine Stimmlippe begrenzt

## 2. Einleitung

T1b	Befall beider Stimmlippen
T2	Tumor breitet sich auf Supra- und/oder Subglottis aus und/oder mit eingeschränkter Beweglichkeit der Stimmlippen
T3	Tumor auf den Larynx beschränkt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
<b>Larynx Subglottis</b>	
T1	Ausdehnung begrenzt auf die subglottische Region
T2	Ausbreitung auf eine oder beide Stimmlippen, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen (Halslymphknoten)
NX	Keine Beurteilung der regionalen Lymphknoten möglich
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasierung
N1	Metastasierung in einem ipsilateralen Lymphknoten, $\leq 3$ cm in größter Ausdehnung
N2a	Metastasierung in einem ipsilateralen Lymphknoten, $> 3$ cm, aber $\leq 6$ cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasierung in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, $\leq 6$ cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasierung in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, $\leq 6$ cm in größter Ausdehnung
N3	Metastasierung in Lymphknoten $> 6$ cm in größter Ausdehnung
M	Fernmetastasen
MX	Keine Beurteilung der Fernmetastasen möglich
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar - Die betroffenen Organe werden mit einem Affix gekennzeichnet: PUL: Lunge      MAR: Knochenmark      OSS: Knochen HEP: Leber      PER: Peritoneum      PLE: Pleura BRA: ZNS      ADR: Nebenniere      LYM: Lymphknoten SKI: Haut      OTH: Andere

## 2. Einleitung

Seit 2017 gibt es zudem eine neuere, weit kompliziertere Version des TNM-Systems, welche für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome teilweise auch den p16-Status mitberücksichtigt (Hoffmann und Tribius, 2018). Dieser p16-Status dient der Differenzierung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Karzinomen und wird im Folgendem dieser Arbeit noch ausführlich erläutert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die 8. Version des TNM-Systems hier nicht aufgelistet.

Um aus der TNM-Klassifikationen Therapieempfehlungen ableiten zu können, fasst die UICC (Union for International Cancer Control) dieses System zusammen und unterteilt die Tumorerkrankungen in vier Stadien. Tabelle 2 spiegelt dies wider.

Tabelle 2: klinische Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

klinisches Stadium	TNM-Stadium		
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2 T3	N1 N0, N1	M0 M0
IVa	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0 M0
IVb	T4b alle T	alle N N3	M0 M0
IVc	alle T	alle N	M1

Neben der Ausbreitung des Tumors besitzt insbesondere die histologische Differenzierung der einzelnen Tumorzellen eine prognostische Aussagekraft. Je geringer eine Tumorzelle ausdifferenziert ist und je weniger sie dem Ursprungsgewebe ähnelt, umso aggressiver ist das Malignom. Da aggressive Tumore in der Regel wesentlich schneller wachsen, schneller Metastasen bilden und schneller rezidivieren, ist deren Prognose meist deutlich schlechter. Die Unterteilung dieses Differenzierungsgrades nennt man Grading und wird im TNM-System unter dem Zusatz G angegeben (Brierley et al., 2016).

Tabelle 3: Histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

Differenzierungsgrad	Beschreibung
G1	gut differenziert, wenig Mitosen
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert, viele Mitosen
G4	undifferenziert
G9	Grad der Differenzierung nicht beurteilbar

### 2.1.3 Diagnostik

Zum ersten Schritt der Diagnostik von Kopf-Hals-Tumoren gehört eine umfassende Anamnese, in welcher unter anderem die aktuellen Beschwerden, die Vorgeschichte und mögliche Risikofaktoren, wie Nikotinabusus und Alkoholkonsum, erfragt werden. Die anschließende klinische Untersuchung beinhaltet die Inspektion und Spiegeluntersuchung des Mund- und Rachenraums, sowie die Palpation des Halses und der Lymphknoten, bei der raumfordernde Prozesse bereits grob abgeschätzt werden können. Die folgende Panendoskopie, welche eine Naso-/Oro-/Hypopharyngoskopie, Tracheobronchoskopie, Mikrolaryngoskopie und Ösophagogastroskopie umfasst, erlaubt die Sicht auf zuvor nichteinsehbare Bereiche des Mund- und Rachenraums und ermöglicht zudem die Entnahme von Gewebeproben aus verdächtigen Bereichen, welche anschließend histologisch untersucht werden können. Zur weiteren Abklärung können bildgebende Verfahren, wie Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie herangezogen werden, um Tumore zu entdecken und deren Ausdehnung zu erfassen (Pfeiffer et al., 2017).

### 2.1.4 Standardtherapie

Je nach Tumorentität, Ausmaß, Lokalisation und Tumorstadium wird bei Kopf-Hals-Karzinomen auf unterschiedliche Therapiemöglichkeiten zurückgegriffen. Bei kurativen Ansätzen steht meist die vollständig operative Entfernung des Tumors im Vordergrund. Bei N+ oder ab T3 erfolgt zudem in der Regel eine sogenannte Neck-Dissektion zur Entfernung der Lymphabflusswege. Diese kann entweder selektiv mit der Entfernung der Lymphknotenlevel 1-5, radikal mit zusätzlicher Entfernung der Vena jugularis interna, des Nervus accessorius und des Musculus sternocleidomastoideus oder modifiziert stattfinden. Eine adjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie wird meist bei N+, ausgedehnten Primärtumorbefunden oder einem G3-Grading angestrebt. Bei kurativ ausgelegten Radiochemotherapien wird der Tumorbereich mit einer Gesamtdosis von meist 70 Grey bestrahlt und eine Chemotherapie in der Regel mit Cisplatin und 5-Fluorouracil durchgeführt. Bei lokal fortgeschrittenen oder inoperablen Tumoren kann auch eine kurativ primäre Radiochemotherapie durchgeführt werden. Liegt hingegen eine palliative Situation mit Tumorstadium IV vor, erfolgt standartmäßig eine Firstline Chemotherapie nach dem EXTREME-Protokoll mit den enthaltenen platinhaltigen Chemotherapeutika, 5-Fluorouracil und dem monoklonalen Antikörper Cetuximab, der gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet ist. Spricht der Tumor auf diese Therapie nicht an, kann eine

Secondline-Therapie mit Paclitaxel, Carboplatin und Cetuximab durchgeführt werden (Pfeiffer et al., 2017). Außerdem sind die Immuncheckpointinhibitoren Nivolumab seit 2017 (Hartmann, 2018) und Pembrolizumab seit 2018 (Schueler et al., 2018, Hecken J, 2019) als Secondline-Therapie bei Rezidiven und/oder Progress unter platinbasierter Chemotherapie für die Behandlung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen zugelassen.

### 2.1.4.1 Grundprinzipien der Radiotherapie

Neben der chirurgischen Behandlung und der Chemotherapie stellt die Radiotherapie, kurz RT oder auch Strahlentherapie genannt, den dritten großen Therapieansatz in der Behandlung von bösartigen Tumorerkrankungen dar. Dabei kommt es zur Applikation von kurzweligen elektromagnetischen Wellen oder Teilchen auf Gewebe, um Krankheiten zu heilen, deren Fortschreiten zu verzögern oder um krankheitsspezifische Symptome zu lindern. Durch die Energie der elektromagnetischen Wellen oder Teilchen werden beim Durchdringen von Materie Elektronen aus Atomhüllen von Molekülen herausgelöst. Dies führt zu sehr reaktiven hinterbliebenen Atomen, die dann als ionisiert bezeichnet werden (Wannenmacher et al., 2013). Zu Teilchenstrahlung zählen  $\alpha$ -Strahlung (Heliumionen) und  $\beta$ -Strahlung (Elektronen, Positronen), zu elektromagnetischer Strahlung Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung. Letztere entsteht auf natürliche Weise als Nebenprodukt des Kernzerfalls einer radioaktiven Substanz, kann in Linearbeschleunigern aber auch künstlich erzeugt werden (Wannenmacher et al., 2013). Bei der Applikation von Strahlen auf einen Tumor werden am häufigsten Photonen oder Elektronen genutzt, die in fraktionierten Einzeldosen über einen bestimmten Zeitraum appliziert werden. Das gesunde Gewebe erhält durch diese fraktionierte Bestrahlung die Möglichkeit sich zwischen den einzelnen Bestrahlungssequenzen durch Reparationsvorgänge zu regenerieren. Die ionisierende Strahlung wirkt sowohl direkt zerstörerisch, via DNA-Strangbrüche im Zellkern, als auch indirekt über abgespaltene freie Radikale, die ihrerseits die DNA beschädigen können (Wannenmacher et al., 2013). Bereits nach Bestrahlung mit einem Grey Röntgenstrahlung ergeben sich etwa 1000 bis 2000 Basenveränderungen, 500 bis 1000 Einzelstrangbrüche und etwa 50 Doppelstrangbrüche (Kauffmann et al., 2006). Diese Schäden der Erbsubstanz bewirken einen Stopp des Zellzyklus oder die Einleitung der Apoptose und beeinflussen den Prozess der Zellteilung negativ. Hieraus erklärt sich die erhöhte Strahlensensibilität von Tumorzellen, die sich gegenüber gesundem Gewebe wesentlich schneller teilen. Nichtsdestotrotz wird bei jeder Applikation von Strahlung auch gesundes Gewebe beschädigt. So liegt die optimale Strahlendosis bei einer akzeptablen

Wahrscheinlichkeit den Tumor zu vernichten und der noch tolerierbaren iatrogenen Schädigung des gesunden Gewebes. Dies ergibt eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung welche Hermann Holthusen 1936 als Zusammenhang der Wahrscheinlichkeit beschrieb:

- a) den Tumor zu vernichten - Tumor Control Probability (TCP)
- und
- b) das ins Strahlenfeld einbezogene Gewebe zu schädigen – Normal Tissue Complication Probability (NTCP)

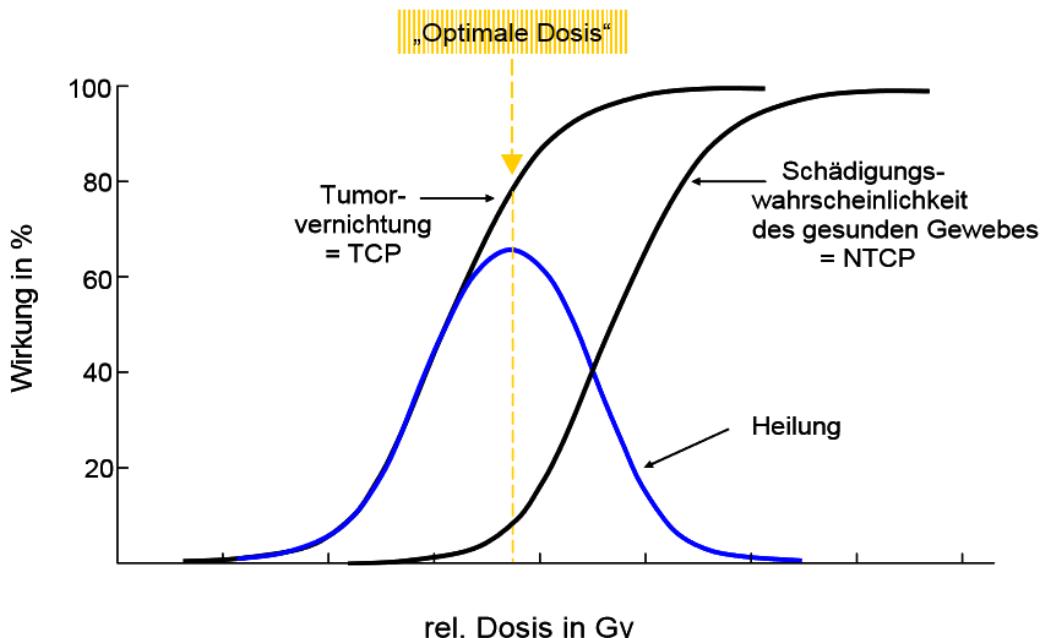


Abbildung 3. Heilungs-Resultante der Radiotherapie nach Hermann Holthusen

Die Heilung, in Abhängigkeit von der Strahlendosis, ist dargestellt als Resultante zwischen der Dosisabhängigkeit der Tumervernichtung (TCP) und der Schädigungswahrscheinlichkeit (NTCP) des gesunden Gewebes. Die Distanz zwischen den beiden Kurven wird als therapeutische Breite bezeichnet (verändert nach Holthusen 1936).

Standartmäßig therapiert man Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich mit einer Gesamtdosis von 70 Grey, die in 35 Fraktionen von jeweils zwei Grey über eine Gesamtzeit von sieben Wochen verabreicht werden (Honecker, Dornoff 2016). Alternativ kann für die bessere Lokalkontrolle des Tumors eine Hyperfraktionierung erwogen werden, bei der die Strahlengesamtdosis durch Aufteilung der Tagesfraktionen in mehrere Unterfraktionen (z.B.  $2 \times 1,15$  Gy pro Tag bis zur Gesamtdosis von 80,5 Grey) erhöht wird (Horiot et al. 1992). Eine Verkürzung der Therapiezeit von sieben auf fünf Wochen kann mit Hilfe einer Akzelerierung der Bestrahlung erfolgen. Dabei erhöht sich die Fraktionsfrequenz bei einer gleichbleibenden Gesamtbestrahlungsdosis. Durch die kürzere Bestrahlungszeit kommt es zu einer Verstärkung

der lokal toxischen Effekte, jedoch auch zu einer drastischen Zunahme der akuten Nebenwirkungen (Ang et al. 2001).

### 2.1.4.2 Grundprinzipien der Radiochemotherapie

Die therapeutische Breite steht in Abhängigkeit der TCP und der NTCP und kann als der Bereich zwischen den beiden Kurven dargestellt werden. Je weiter sich die Kurven voneinander entfernen, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit einer komplikationslosen und nebenwirkungsarmen Heilung. Bei der zusätzlichen Anwendung einer simultanen Chemotherapie können dem Tumor additive Schädigungen zugefügt werden, welche die lokalen Effekte der Strahlentherapie verstärken. Bei supraadditiven Effekten kann sogar ein größerer Effekt erzielt werden, als die Summe der Effekte der Einzelmodalitäten. Außerdem kommt es zu einer räumlichen Kooperation, wobei der Primärtumor durch die Strahlentherapie vernichtet wird und die Chemotherapie Mikrometastasen abtötet (Bubach und Bubach 2001). Bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wird insbesondere durch den Einsatz von DNA-alkylierenden Platinderivaten eine Verbesserung der langfristigen Überlebensrate erzielt (Stromberger 2019). Außerdem können Mitomycin C, 5-Fluorouracil und Taxane in verschiedenen Kombinationen zum Einsatz kommen (Honecker and Dornoff, 2016).

Als weit verbreitet gilt dabei das hochdosierte Therapieregime mit Cisplatin ( $100 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche an den Tagen 1, 22 und 43 der Radiotherapie) als Strahlensensitizer (Honecker and Dornoff, 2016). Cisplatin reagiert aufgrund seiner Elektrophilie bevorzugt mit dem N7-Atom von Guanin und Adenin (Estler and Schmidt, 2006). Auf diese Weise führt das Chemotherapeutikum zu Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Strangs, was als Intrastrang-Quervernetzung bezeichnet wird, oder zu Interstrang-Quervernetzungen zwischen zwei benachbarten DNA-Strängen. Durch die Inhibierung von Reparaturmechanismen, wie die Inaktivierung der Telomerase, führt Cisplatin außerdem dazu, dass die durch die Strahlentherapie verursachten subletalen DNA-Schäden der Zelle nicht mehr repariert werden können und Tumorzellen vermehrt abgetötet werden (Coughlin and Richmond, 1989). Das Chemotherapeutikum wird ausschließlich intravenös verabreicht und diffundiert aufgrund einer hohen Plasmaproteinbindung von über 90 Prozent schnell in die Gewebe. Insbesondere in der Niere, über die das Medikament ausgeschieden wird, finden sich hohe Konzentrationen, die das gesunde Gewebe als Nebenwirkung häufig stark schädigen (Voigt et al., 2006). Bei Patienten mit einer vorgeschädigten Niere wird daher oft auf das ähnlich wirkende Carboplatin zurückgegriffen, das sich weniger nephrotoxisch zeigt (Voigt et al., 2006). Eine Kombination

der platinhaltigen Chemotherapeutika kann vor allem bei fortgeschrittenen Befunden mit dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil (5-FU) erfolgen. Als Pyrimidinanalagon wird 5-FU an der Stelle von Uracil in die RNA eingebaut. Durch die Synthese dieser fehlerhaften RNA, wird die Protein-Biosynthese gehemmt und das Zellwachstum blockiert. Darüber hinaus hemmt 5-Fluorouracil die Thymidilat-Synthase, die das Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese darstellt. Auch auf diese Weise kommt es zu einer Hemmung des Zellwachstums (Estler and Schmidt, 2006). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 5-FU wird dieses Medikament meist als Dauerinfusion über 24 Stunden mit einer Dosis von  $600 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche verabreicht (Honecker et al., 2016). Auch Mitomycin C kann als Kombinationspräparat in der Radiochemotherapie der Kopf-Hals-Tumore dienen. Das als Prodrug verabreichte Medikament wirkt via Quervernetzung der DNA, was zu einer Hemmung der DNA-Synthese führt (Budach et al., 2005; Aktories et al., 2017). Taxane wie zum Beispiel Docetaxel werden vor allem für Induktionstherapien in Kombination mit platinhaltigen Chemotherapeutika verwendet (Semrau et al., 2013).

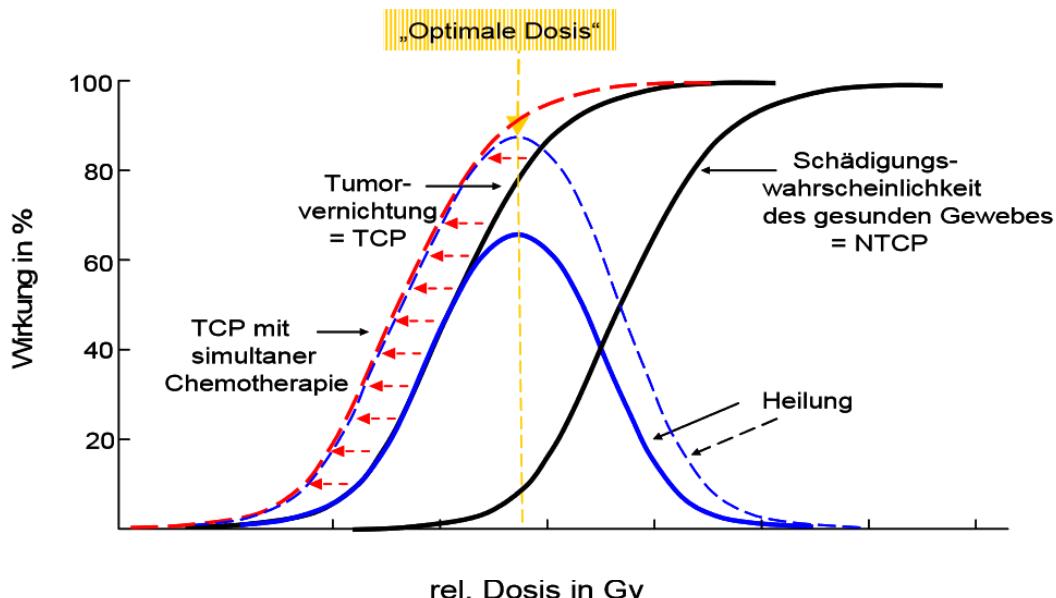


Abbildung 4: Heilungs-Resultante der Radiochemotherapie nach Hermann Holthusen

Linksverschiebung der TCP-Kurve und Erhöhung der therapeutischen Breite durch Anwendung einer simultanen Chemotherapie (verändert nach Holthusen 1936).

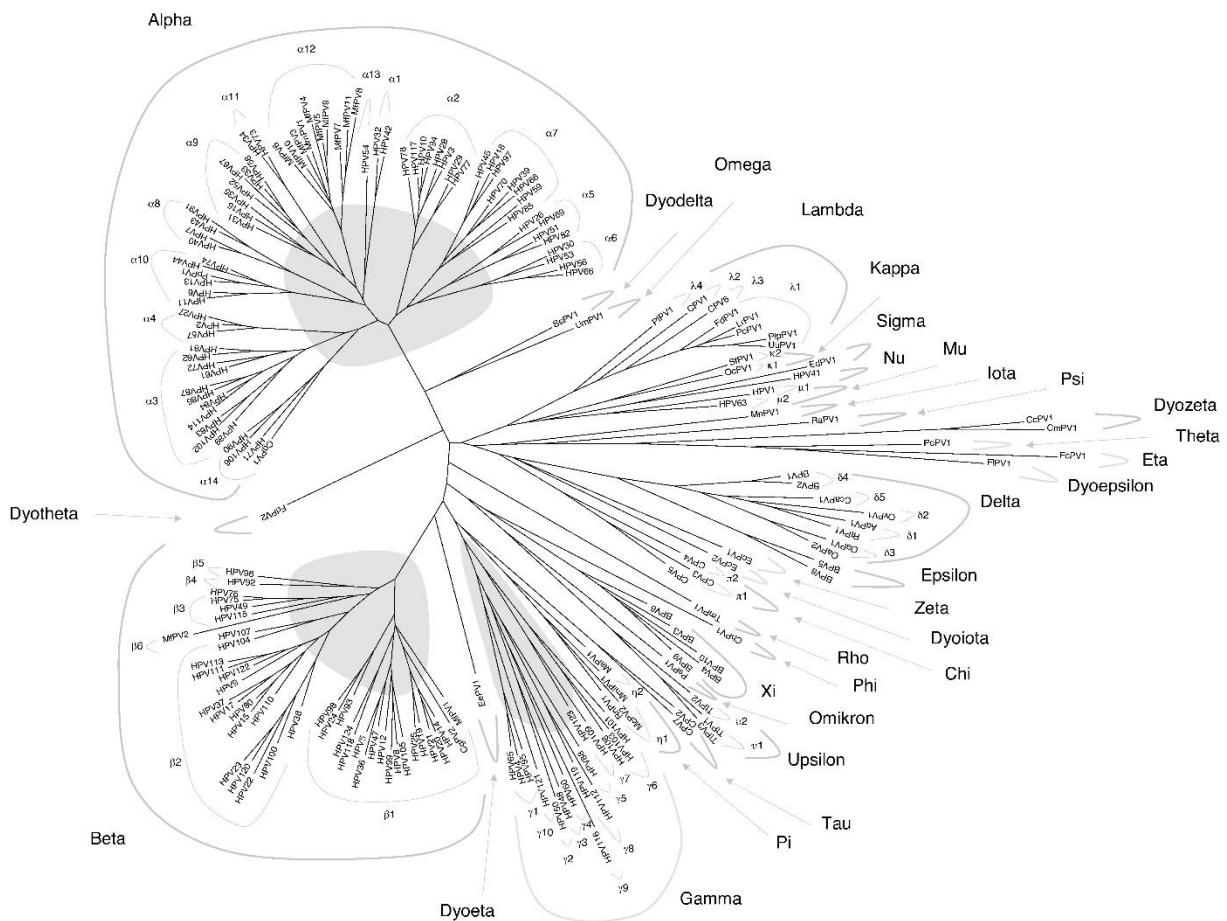
Da die Bestrahlungstherapie vorwiegend lokal wirkt, die Chemotherapeutika aber im gesamten Körper ihre negative Wirkung auf das Zellwachstum auslösen, führt die kombinierte Radiochemotherapie zu vermehrten Nebenwirkungen und verlangt besondere Erfahrung auf dem Gebiet der Supportivtherapie. Prinzipiell lassen sich die unerwünschten Wirkungen als

akute und späte Nebenwirkungen unterteilen. Zu den akuten Nebenwirkungen zählen unter anderem Mukositis, Dysphagie, Heiserkeit und Übelkeit und Erbrechen (Trotti, 2000). Späte oder chronische Komplikationen halten mindestens drei Monate an und können auch Monate nach Therapiebeendigung auftreten. Zu ihnen zählen Xerostomie, Osteonekrose, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Geschmackstörung, Heiserkeit und Ösophagusstrikturen (Cooper et al., 1995). Je nach verwendetem Chemotherapeutikum können insbesondere Nierenschäden, Mittel- und oder Innenohrschädigungen und ZNS-Schäden auftreten.

### 2.2 Humane Papillomviren

Papillomviren sind weltweit verbreitete doppelsträngige DNA-Viren, die sich anhand von Sequenzhomologien des Hauptkapsidproteins L1 in insgesamt 29 Genera untergliedern lassen (Bernard et al., 2010). Die größten Gattungen machen dabei die Alpha-, Beta- und Gammapapillomviren aus, welche zusammen mehr als 180 Virustypen umfassen. Ca. 120 davon gelten aktuell als humanpathogen (Bernard, et al., 2010; de Villiers et al., 2004). Der Name dieser Virusfamilie kommt von der Eigenschaft der Viren, für die Entstehung von Papillomen (Warzen) verantwortlich zu sein.

Abhängig vom Typ des Virus werden Zellen des mukosalen oder des kutanen Epithels befallen. Während Alphapapillomviren hauptsächlich Schleimhäute befallen, infizieren Virustypen der Beta- und Gammagattung eher verhorrende Epithelien der Haut. (Harwood, Proby, 2002; de Villiers et al., 2004). Des Weiteren lassen sich humane Papillomviren nach ihrer Fähigkeit Keratinozyten zu immortalisieren in Hochrisiko- und Niedrigrisikotypen unterteilen, wobei sich erstere dadurch auszeichnen, transformierende Infektionen auslösen zu können. Zu ihnen gehören nach der World Health Organisation (WHO) unter anderem die Typen HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (Doorbar et al., 2012).



**Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum der Papillomviren**

Papillomviren lassen sich anhand ihrer Sequenzhomologien des Kapsidproteins L1 untergliedern. Die Angehörigen eines HPV-Typs unterscheiden sich definitionsgemäß in weniger als 10% der Nukleotide im L1-Gen. Die größten Gattungen machen dabei die Alpha-, Beta- und Gammapapillomviren (Bernard et al. 2010).

### 2.2.1 Virusaufbau und Genomorganisation

Humane Papillomviren sind mit einem Durchmesser von ca. 55 nm im Vergleich zu anderen Viren eher klein und besitzen keine Virushülle. Dies macht sie gegenüber Hitze und organischen Lösungsmitteln unempfindlich. Das Genom der Papillomviren ist aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA aufgebaut, welche aus rund 8000 Basenpaaren besteht (zur Hausen, 1996). Verpackt ist dieses Genom in einem Kapsid, bestehend aus zwei viralen Proteinen, L1 und L2, in einem Verhältnis von 30:1 (Kirnbauer et al., 1993). Das L1, welches maßgeblich für die Immunogenität der verschiedenen HPV-Typen verantwortlich ist, bildet über Disulfidbrücken 72 Pentamere aus, wodurch ein ikosaedrisches Kapsid entsteht. Die größeren L2-Proteine sind in dieses eingelagert (zur Hausen, 1996; Klug und Finsch, 1965).

Die DNA kann in die drei großen Bereiche unterteilt werden: die nicht kodierende long control-region (LCR), auch upstream regulatory region (URR) genannt, die early (E)-region und die late (L)-region. Die LCR reguliert die virale Genom-Replikation und enthält dafür zahlreiche

Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren. Die early region kodiert die sechs frühen viralen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die beiden späten Proteine L1 und L2, welche das Kapsid des Virus bilden, werden in der late region kodiert (zur Hausen, 1996). Abbildung 1 zeigt die Organisation des Genoms am Beispiel von HPV 16.

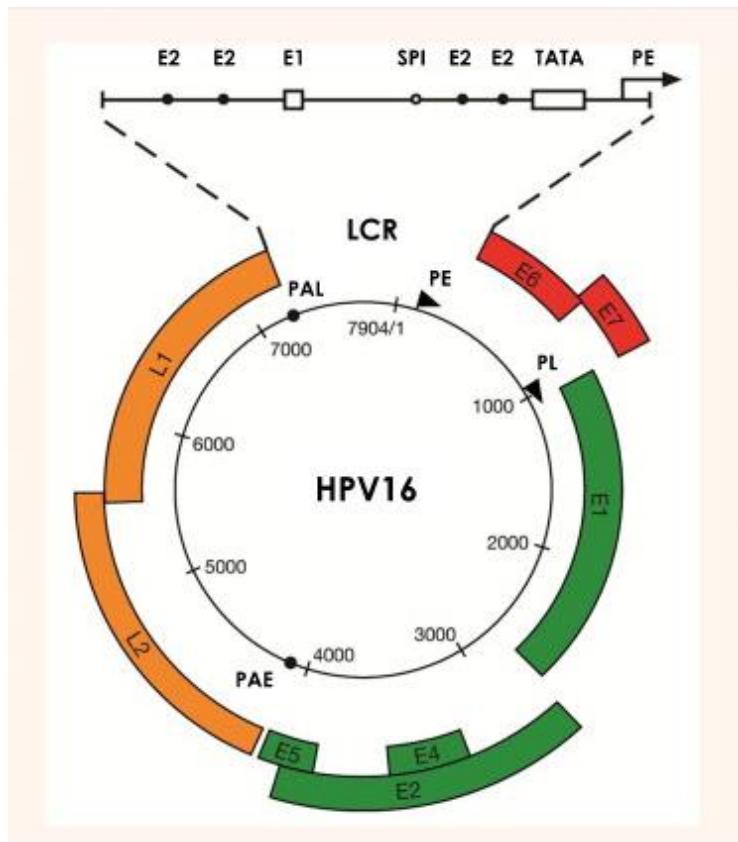


Abbildung 6: Aufbau des HPV-Genoms am Beispiel von HPV 16

Das Genom der Papillomviren ist in drei Regionen unterteilt: Die long control region (LCR) enthält Bindestelle für zelluläre Transkriptionsfaktoren und für virale Proteine; die early region beinhaltet die Gene für die sechs frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7, deren Expression vom Promotor p97 (PE) reguliert wird; die late region umfasst die beiden Kapsidproteine L1 und L2, deren Expression durch den Promotor p670 (PL) reguliert wird. PAE und PAL zeigen Polyadenylierungsstellen innerhalb des viralen Genoms an (verändert nach Doorbar et al., 2012).

### 2.2.2 Viraler Lebenszyklus

Da Papillomviren bis auf eine Helikase keine eignen Transkriptionsenzyme besitzen, sind die Viren auf die Proliferationsmechanismen ihrer Wirtszelle, dem Keratinozyt, angewiesen. Damit es zu einer Infektion mit Humanen Papillomviren kommt, muss das Virus durch Mikroläsionen Zugang zu den Basalzellen erhalten (Doorbar 2004). Dies sind die untersten Keratinozyten der Haut- bzw. Schleimhautschicht, welche noch undifferenziert und teilungsaktiv sind. Das Virus gelangt über rezeptorvermittelte Endozytose in die Basalzelle. Dafür bindet das Virus zunächst an zellulären Oberflächenrezeptoren, was zu einer Veränderung des Kapsidproteins L2 führt und die Internalisierung in die Wirtszelle ermöglicht (Doorbar, et al., 2012; Day et al., 2003).

Durch das reduzierende Milieu der Zelle und die daraus entstehenden Brüche der Disulfidbrücken des Kapsids kommt es zur Entpackung des Virus (Li et al., 1998). Anschließend gelangt die nun freie DNA über Poren in den Zellkern. Nach der Replikation des Genoms, welches zunächst in episomaler Form mit ca. 10-200 Kopien pro Zelle vorliegt, kommt es zur Expression der viralen Gene. Dabei ist das Virus auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie angewiesen. Zuerst werden die frühen Proteine E1, welche die Funktion einer DNA-Helikase besitzt, und E2 synthetisiert. Zusammen binden diese beiden Proteine an den Replikationsursprung ORI in der LCR und entwinden die DNA. Dadurch kann es zur Expression der übrigen frühen Proteine kommen (Wilson et al., 2002). In den basalen undifferenzierten Zellen werden generell nur sehr wenig virale Proteine exprimiert, um dem hier stark aktiven Immunsystem zu entkommen. Zu einer stärkeren Proteinproduktion kommt es erst in den höher gelegenen differenzierten Epithelschichten, da dort das Immunsystem weniger aktiv ist (Frazer, 2009). Verlassen die Keratinozyten die Basalschicht und wandern in die suprabasalen Abschnitte des Epithels, stellt sich normalerweise der aktive Zellzyklus ein und die Keratinozyten beginnen zu differenzieren. Dies wird durch die Expression der beiden frühen Proteine E6 und E7, die beide als Onkogene fungieren, verhindert. Wie E6 und E7 in den Zellzyklus eingreifen und die Virusreifung durch anhaltende Proliferation der Keratinozyten über die Basalschicht hinaus, gewährleisten, wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Auch E5 wird in dieser Phase des Lebenszyklus der Viren exprimiert. Auffällig ist dabei, dass dieses Protein, dem neben E6 und E7 ebenfalls wachstumsstimulierende und transformierende Eigenschaften zugeschrieben werden, in Beta-Papillomviren nicht vorzukommen scheint (Quint et al., 2015). Wenn im weiteren Verlauf die Keratinozyten zu Korneozyten differenzieren, wird der Promoter für die späten Gene aktiv. So kommt es zur Expression der hoch immunogenen viralen Hüllproteine L1 und L2 und zu der Zusammensetzung der Viruspartikel. Da Papillomviren nicht lytisch wirken, verlassen die infektiösen Viren die Korneozyten mit Hilfe von E4 erst, wenn diese im Rahmen ihres normalen Lebenszyklus abgeschilfert werden (Doorbar, 2005). Bei invasivem Krebs liegt das virale Genom meist nicht mehr episomal vor, sondern wird in das Wirtsgenom integriert (Doorbar, 2006). Dabei muss das virale zirkuläre Genom zunächst, durch eine Ringöffnung innerhalb des E2 Leserahmens, in eine lineare Form gebracht werden. In Folge dessen wird der E2 Leserahmen irreversibel zerstört, was zur Überexpression der viralen Onkogene E6 und E7 führt. Durch das onkogene Potential dieser beiden Proteine kommt es zu Anhäufung von Mutationen in der Wirtszell-DNA und zur genetischen Instabilität (zur Hausen, 1996).

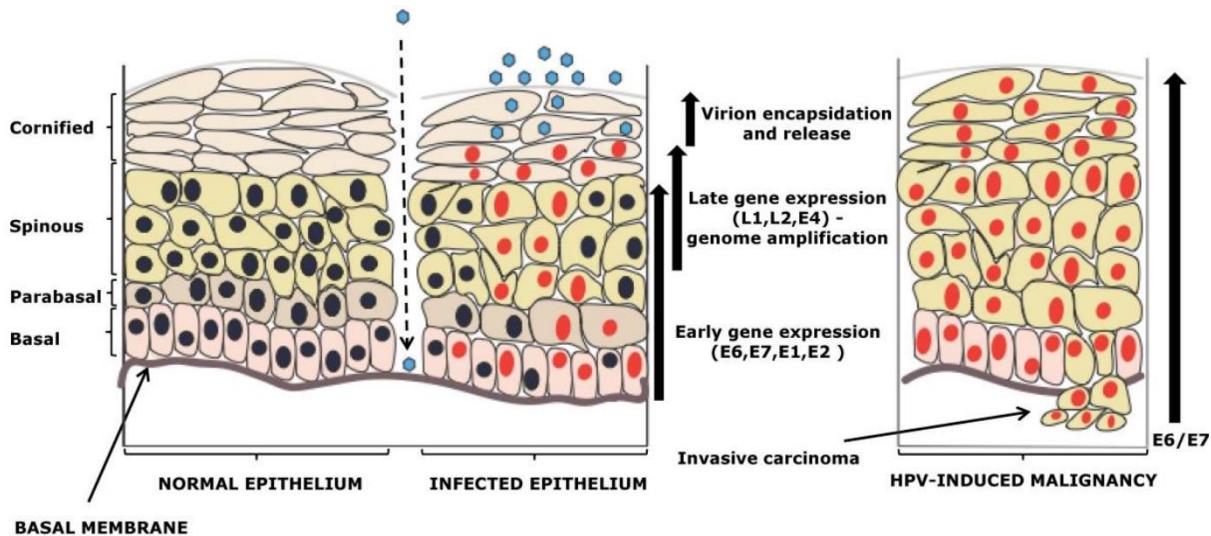


Abbildung 7: Lebenszyklus eines high-risk HPV-Typen von der Infektion bis zur Krebsentwicklung

Zunächst gelangen die Viren durch Mikroläsionen in die Basalzellen des kutanen oder mukosalen Epithels. In Abhängigkeit von der Differenzierung des Wirtsepithels, werden die Viren in Richtung der äußeren Epithelschichten transportiert. Dabei werden zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Proteine exprimiert. In den basalen Schichten wird das virale Genom in den Wirtszellen zunächst in Form von Episomen aufrechterhalten. In den suprabasalen Schichten, mit Beginn der Differenzierung der Keratinozyten, wird das virale Genom amplifiziert. In den darüber liegenden Schichten werden die beiden Kapsidproteine gebildet und neue Viren zusammengesetzt. Mit Erreichen der Korneozytenschicht werden die Viruspartikel schließlich zusammengesetzt und freigesetzt. Bei invasivem Krebs kommt es häufig zur Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom (rote Zellkerne). Durch die Zerstörung des E2 Leserahmens während der Genomintegration kommt es zu einem massiven Anstieg der E6- und E7-Expression, was zu einer genetischen Instabilität der Wirtszelle führt. Dies führt zu einem starken Anstieg der Karzinomentstehungswahrscheinlichkeit (verändert nach Tomaic, 2016).

### 2.2.3 Die frühen viralen Onkoproteine E6 und E7

Durch die Expression der beiden Onkogene E6 und E7 wird die Differenzierung der Keratinozyten verhindert und eine anhaltende Proliferation der Keratinozyten, sowie der Erhalt des Virusgenoms gewährleistet. Die Onkoproteine E6 und E7 der high-risk Papillomviren sorgen für die Transformation und Immortalisierung der befallenen Keratinozyten und legen so die Grundsteine der Karzinomentstehung (zur Hausen, 1996).

#### E6

E6 besteht aus ca. 150 Aminosäuren und besitzt 2 Zinkfingermotive (Cole und Danos, 1987; Barbosa et al., 1989). Der wichtigste Interaktionspartner des E6 ist das zelluläre p53-Tumorsuppressorgen, welches auch als Wächter des Genoms bekannt ist, da es eine fundamentale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Integrität des zellulären Genoms innehat (Boulet et al., 2007). Aktiviert wird das p53-Protein durch Phosphorylierung durch das Enzym ATM-Kinase, welches bei DNA-schädigenden Reizen induziert wird. Im aktiven

Zustand besitzt p53 die Fähigkeit, den Zellzyklus bei DNA-Schäden in der G1/S- bzw. der G2/M-Phase reversibel zu unterbrechen, um zelleigene Reparaturmechanismen zu aktivieren oder gegebenenfalls die Apoptose zu initiieren (Yonish-Rouach et al., 1993; Deng et al., 1995; Chan et al., 2000). Dies verhindert eine Weitergabe der DNA-Schäden an die Tochterzellen und hält so das Genom stabil. Das E6-Protein von high-risk HPV-Typen besitzt die Fähigkeit an das E6-assoziierte Protein (E6AP) zu binden und dadurch einen trimeren Komplex mit p53 zu bilden. E6AP fungiert dabei als E3-Ubiquitinligase und ubiquitiniert p53, welches dadurch für den proteasomalen Abbau markiert wird (Huibregtse et al., 1991). Durch diese Inaktivierung kann p53 nicht mehr als Transkriptionsfaktor wirken, wodurch die Expression von p21 verringert wird. p21 würde wiederum den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmen. Diese werden benötigt, um einen vom Protein pRB gebundenen weiteren Transkriptionsfaktor (E2F) freizusetzen, der den Zellzyklus weiterführen würde. Durch die E6 induzierte Hemmung von p53, wird der Transkriptionsfaktor E2F sofort freigesetzt und der Zellzyklus bei DNA-Schäden nicht angehalten. Das E6-Protein von low-risk HPV-Typen besitzt nicht die Fähigkeit mit E6AP einen Komplex einzugehen (Huibregtse et al., 1993). Es bindet direkt an p53, jedoch mit geringerer Aktivität als das E6-Protein der high-risk HPV-Typen (Mantovani und Banks, 2001).

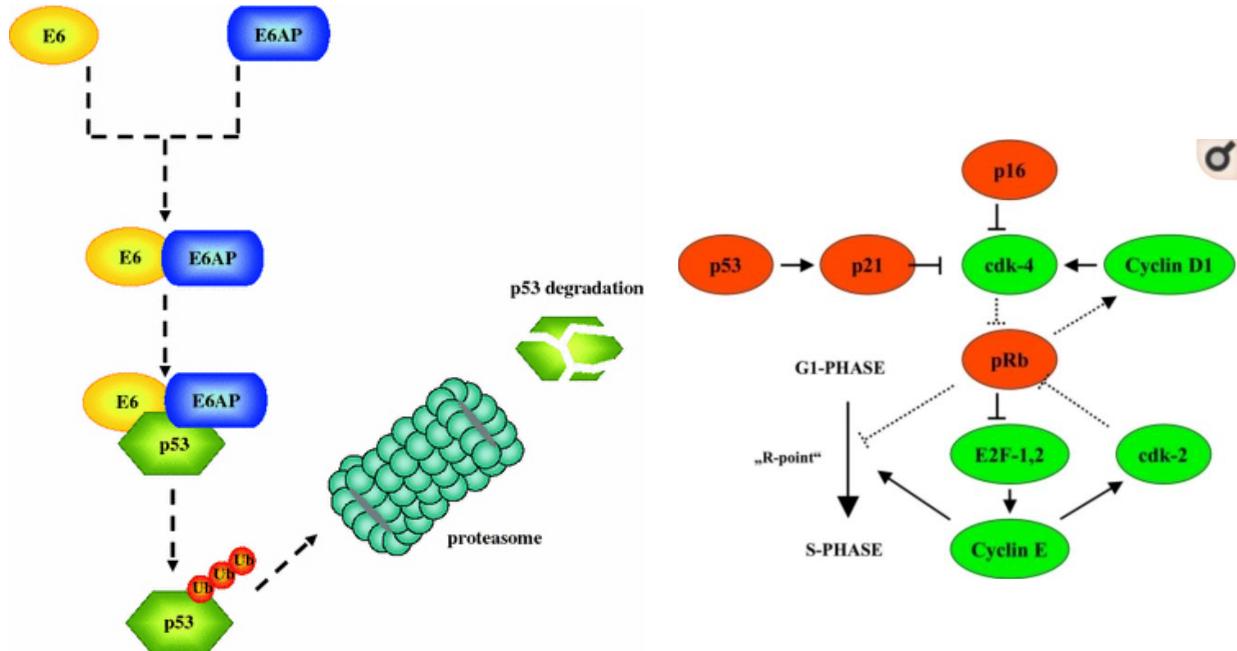


Abbildung 8: Inaktivierung von p53 durch E6

Das E6-Protein der high-risk HPV Typen interagiert mit p53 und leitet dessen Abbau ein, indem E6 an E6AP bindet, welches als Ubiquitin-Ligase eine rasche Ubiquitinierung von p53 einleitet und dessen proteasomalen Abbau induziert (Ghittoni et al., 2010). Durch das fehlende p53 kann anschließend kein p21 mehr produziert werden, was letzten Endes zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt (Auw-Haedrich et al., 2008).

Eine weitere Fähigkeit von E6 besteht in der Aktivierung von Telomerasen (Gewin und Galloway, 2001). Durch diese können, die sich bei jeder Zellteilung kürzenden, Telomerenden verlängert werden und damit das Apoptosesignal bei zu kurzen Telomeren umgangen werden.

### E7

E7 ist mit ca. 100 Aminosäuren etwas kleiner als E6 und kodiert für ein Zinkfingermotiv. Eine für die Immortalisierung wichtige Funktion von E7 ist die Inaktivierung des Retinoblastom Proteins (pRb) (Münger et al. 1989). Ist pRb aktiv, bindet es den Transkriptionsfaktor E2F und blockiert damit den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Will eine gesunde Zelle in die S-Phase eintreten, muss Rb zuerst durch die Proteinkomplexe Cyclin D1/CDK4 und Cyclin E/CDK2 phosphoryliert werden, damit es von dem Transkriptionsfaktor E2F dissoziieren kann. Durch die Freisetzung von E2F, das die Expression der später benötigten Cycline A und E reguliert, kann die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus eintreten. Bindet jedoch E7 an das pRb, ist dieses nicht mehr in der Lage mit E2F zu interagieren und der Transkriptionsfaktor befindet sich in dauerhaft aktivierte Zustand (Boyer et al., 1996, Dyson et al., 1989).

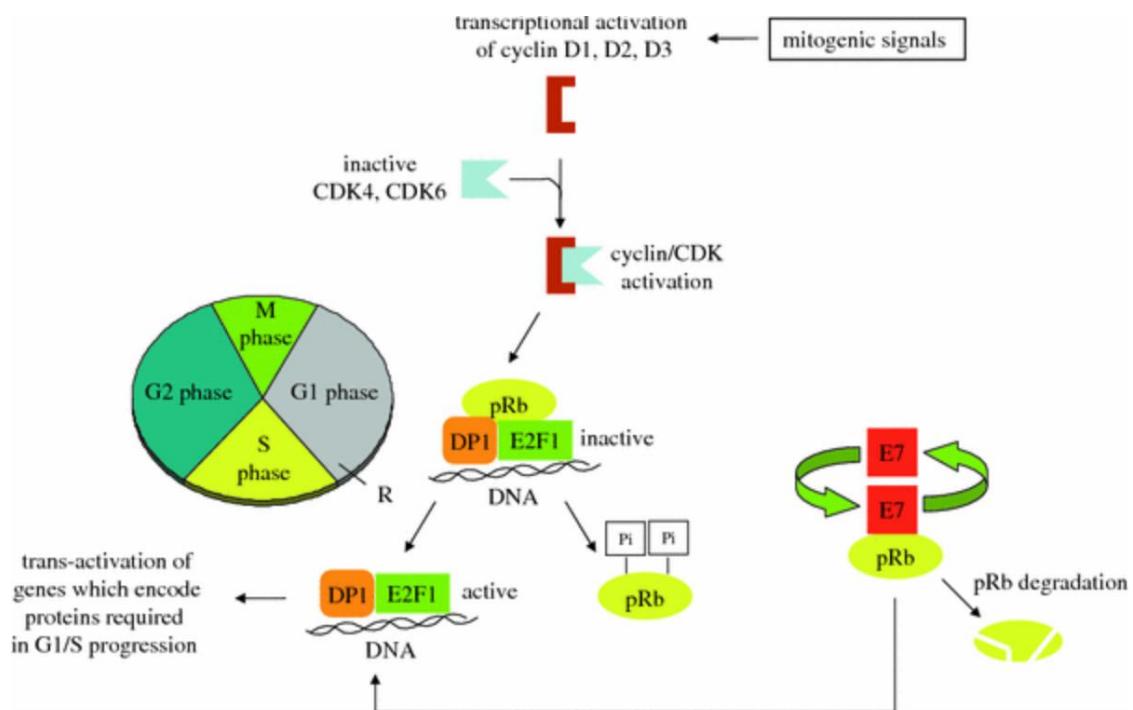


Abbildung 9: Deregulierung des Zellzyklus durch E7

In ruhenden Zellen liegt pRb in hypophosphorylierter Form vor und bildet mit E2F-Molekülen einen festen Komplex, wodurch deren Transkriptionsaktivität gehemmt wird. Wenn ruhende Zellen mitogenen Signalen ausgesetzt werden, kommt es zur Aktivierung von Genen, welche für die G1 - spezifischen D-Typ-Cycline (D1, D2 und D3) codieren. Anschließend fusionieren diese Cycline mit der katalytischen Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kininasen CDK4 oder 6 und werden in den Zellkern transportiert. Dort phosphorylieren die Kinasekomplexe Rb, wodurch die aktiven E2F / DP1-Heterodimerkomplexe freigesetzt werden und den Übergang in die S-Phase bewirken können. Die

Bindung von E7 an pRb ahmt dessen Phosphorylierung nach. Daher können E7-exprimierende Zellen in Abwesenheit von mitogenen Signalen in die S-Phase eintreten (Ghittoni et al., 2010).

Eine vermehrte Freisetzung von E2F führt in nichtinfizierten Keratinozyten zur Expression des Tumorsuppressorproteins p16<sup>INK4a</sup>. Dieses stellt einen übergeordneten Inhibitor der Zellzyklusaktivierenden Cyclin/CDK-Komplexes dar. Eine vermehrte p16-Expression führt demnach normalerweise zu einem Zellzyklusarrest am G1/S Kontrollpunkt. Allerdings kann auch dies durch E7 umgangen werden, indem das E7 der high-risk HPV-Typen die Cycline E und A direkt aktiviert (Boulet et al., 2007).

Das E7 der low-risk HPV-Typen hat eine wesentlich geringere Affinität zu pRb als das der high-risk Typen (Münger et al., 1989).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die viralen Onkogene E6 und E7 mit einer Vielzahl zellulärer Proteine interagieren und den Zellzyklus multipel deregulieren. Dadurch kommt es zur unkontrollierten Proliferation der Zellen, welche optimale Replikationsbedingungen für das Virus schaffen. Durch die Anhäufung genetischer Mutationen kann jedoch auch die genetische Stabilität erheblich gefährdet werden und eine maligne Entartung der Zellen entstehen.

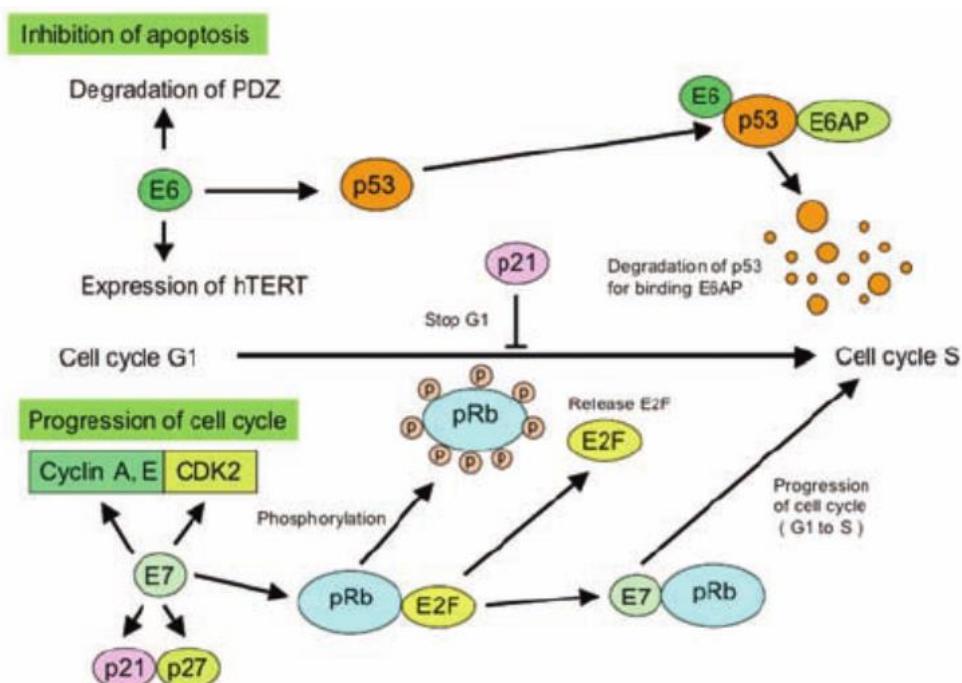


Abbildung 10: Zellzyklusderegulation durch E6 und E7

Durch das Ausschalten der p53-induzierten Apoptose und des gleichzeitig dauerhaft aktivierte Transkriptionsfaktors E2F ermöglichen high-risk HPV-Typen die unkontrollierte Zellproliferation. Auf Dauer führt dies zur Anhäufung genetischer Mutationen und zur Entartung der Zellen (Senba and Mori, 2012).

### 2.3 Einfluss von Humanen Papillomviren auf die Kanzerogenese der Kopf-Hals-Tumore

#### 2.3.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose der HPV assoziierten Kopf-Hals-Tumore

##### Epidemiologie und Ätiologie

Insgesamt zeigt sich die Inzidenzrate der Kopf-Hals-Tumore über die letzten Jahre, genau wie der Alkohol- und Tabakmissbrauch, welche als Hauptrisikofaktoren gelten, deutlich rückläufig (Sturgis und Cinciripini, 2007; Robert-Koch-Institut, 2020). Lediglich bei der Subgruppe der Oropharynxkarzinome ist ein Anstieg der neudiagnostizierten Fälle zu vermerken (Sturgis und Cinciripini, 2007). Dies legt die Vermutung nahe, dass für die Entstehung oropharyngealer Karzinome Risikofaktoren existieren, welche auf die Kanzerogenese der restlichen Kopf-Hals-Tumore weniger Einfluss haben. Eine der Eigenheiten der Oropharynxkarzinome ist die besonders hohe Assoziation mit onkogenen humanen Papillomviren. Ndiaya et al. konnten 2014 in einer 12.163 Patienten umfassenden Metaanalyse zeigen, dass mehr als 45% der getesteten Oropharynxkarzinome HPV-positiv waren. Bei Larynx- und Hypopharynxkarzinomen waren es hingegen nur 22% und bei Karzinomen der Mundhöhle 24%. Eine weitere Unterteilung der Oropharynxkarzinome lässt die Gliederung in Tonsillen- und extratonsilliäre Oropharynxkarzinome zu. Dies scheint sinnvoll, da gerade bei den Tonsillenkarzinomen mit 51-60% eine besonders hohe HPV-Positivität nachzuweisen ist, während diese bei den extratonsilliären Oropharynxkarzinomen gegenüber den sonstigen Halskopftumoren kaum erhöht zu sein scheint (Syrjänen 2004, Paz et al., 2000). Ein Erklärungsversuch für dieses Phänomen könnte im Kryptenepithel der Tonsillen begründet sein. Zum einen bieten die Krypten möglicherweise ein gutes Virusreservoir, zum anderen wird den Viren durch das nur ein- bis zweischichtige Epithel der Tonsillen der Zugang zu der Basalzellschicht besonders leicht gemacht (Klussmann et al., 2009). Zudem passt auch die Tatsache, dass die Inzidenz der Tonsillenkarzinome zunimmt, die der Weichgaumenkarzinome des Oropharynx aber eine eher rückläufige Inzidenz aufweisen (Wagner et al., 2017; Klussmann et al., 2009; Chaturvedi et al., 2008). Am weit häufigsten wurde mit über 93% die DNA des HPV-Typs 16 in Oropharynxkarzinomen nachgewiesen. Darauf folgen die HPV-Typen 33 mit 1,4%, Typ 18 mit 1,3% und HPV 35 mit 0,5%. Andere HPV-Typen wurden in insgesamt 4,2% der Fälle erfasst (Stein et al., 2015).

##### Prognose

Bereits im Jahr 2000 konnten Paz et al. zeigen, dass HPV-positive Tonsillenkarzinome bei Erstdiagnose ein signifikant höheres Tumorstadium aufweisen als Tumore ohne HPV-Assoziation. Dies mag insbesondere an dem schnelleren Wachstumsvermögen der HPV-

positiven Karzinome liegen, welches in der typischen niedrigeren Tumordifferenzierung und dem damit verbundenen höheren Tumorgrading begründet ist (Weinberger et al., 2004). Nichts desto trotz ist die Überlebensrate eines HPV-positiven Oropharynxkarzinoms laut einer umfassenden Metaanalyse von Ragin und Taioli aus dem Jahr 2007 gegenüber einem HPV-negativen Karzinom um 28% besser. Das durchschnittliche jüngere Erkrankungsalter oder der geringere Alkohol- und Nikotinkonsum der Patienten mit HPV-assoziierten Karzinomen könnten hierfür Erklärungsversuche sein. Eine weitere Rolle mag spielen, dass bei HPV-assoziierten Tumoren weniger Genmutationen vorliegen, sondern vielmehr zelleigene intakte Proteine gehemmt werden (Cancer Genome Atlas Network 2015). Dies ist durch Elimination des Virusgenoms grundsätzlich reversibel, während Genmutationen der Nicht-HPV-assoziierten Karzinome irreversibel sind. Auch könnte damit die erhöhte Strahlensensibilität der HPV-Karzinome durch die p53 induzierte Apoptose bei UV-Schäden erklärt werden (Friesland et al., 2001).

Einfluss von HPV auf die zelluläre Wirkung ionisierender Strahlung und Chemotherapeutika  
Eine erhöhte Strahlensensibilität von HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren gegenüber HPV-negativen Tumoren wird in der Literatur schon lange diskutiert. Fakhry et al. zeigten 2008 anhand einer prospektiven Studie mit 96 Patienten, welche unter einem Oropharynxkarzinom im Stadium III oder IV litten, dass HPV-positive Oropharynxkarzinompatienten sowohl eine höhere Ansprechrate auf eine Induktionschemotherapie (82 vs. 55%;  $p = 0,01$ ) als auch auf eine Radiochemotherapie (84 vs. 57%;  $p = 0,007$ ) verglichen mit HPV-negativen Patienten aufwiesen. Die genauen Mechanismen der verstärkten Strahlensensibilität bei HPV-positiven Tumoren sind bis heute noch ungeklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Angenommen wird, dass p53 eine wesentliche Rolle bei der Ansprechwahrscheinlichkeit von Bestrahlungs- und Chemotherapien spielt. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist einer der wichtigsten Regulatoren der zellulären Antwort auf Schäden in der Erbinformation. Kommt es zu zellulären DNA-Schäden in einer Zelle, reagiert diese mit der Aktivierung von p53, wodurch es zu einer Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern kommt. Dort bindet p53 an definierten Regionen an die DNA und gewährleistet durch seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor die Expression von Proliferationsinhibitoren und Apoptosegenen. In HPV-negativen Tumoren ist das p53-Gen meist mutiert und irreversibel geschädigt, so dass es seine Funktion als Tumorsuppressoren nicht mehr ausüben kann. In HPV-positiven Tumoren liegt das p53 hingegen meist in der Wildtyp-Form vor, wird jedoch durch das virale Onkoprotein E6 inhibiert (Huibregtse et al. 1993; Gillison et al. 2000). Obwohl die Expression der HPV E6 und E7-Onkogene die Aktivität bestimmter Tumorsuppressoren, wie p53 und des Retinoblastoma,

deutlich dämpfen, werden diese Suppressorwege bei HPV-negativen Tumoren oft durch genetische oder epigenetische Mechanismen in noch größerem Maße inaktiviert. Dadurch kann eine auf die Zellen toxisch wirkende Radiochemotherapie bei HPV-positiven Tumoren besser anschlagen als bei HPV-negativen Tumoren mit gänzlich zerstörten Tumorsuppressorgenen (Douglas et al., 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass viele HPV-positive Patienten Anti-E6- und Anti-E7-Antikörper besitzen, welche die Tumorgenese über das Immunsystem beeinflussen. Eine Radiochemotherapie könnte die Immunantwort gegen HPV-positive Tumoren stimuliert und daher die bessere Prognose dieser Therapien begründen. Des Weiteren wird gemutmaßt, dass durch eine Chemotherapie die E6- und E7-Expression herunterreguliert wird und dadurch die zellulären Regulationsmechanismen wieder eingreifen können (Douglas et al., 2010).

Nichtsdestotrotz gibt es unter den Patienten mit HPV-positivem Kopf-Hals-Tumor eine nicht unerhebliche Anzahl an Patienten, die entweder gar nicht oder nur unzureichend auf eine Radio- oder Radiochemotherapie ansprechen (Thibodeau et al., 2015). Die molekularen Mechanismen, die hinter diesem Phänomen stehen, sind bis heute kaum untersucht. Eine der wenigen Erklärungsmöglichkeiten könnte der Signal transducer and activator of transcription (STAT3) - Interferon regulatory factor 1 (IRF1) Signalweg bieten, auf den im Folgenden kurz eingegangen wird.

### 2.3.2 STAT3-IRF1 Signalweg

Signal transducer and activator of transcription (STAT) Proteine sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, welche zelluläre Reaktionen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und andere Polypeptid-Liganden vermitteln (Darnell et al., 1994; Darnell, 1997). Die Bindung dieser Liganden führt zu einer Phosphorylierung der STAT-Proteine an spezifischen Tyrosinresten durch intrazelluläre Janus-Kinasen (JAK), Wachstumsfaktorrezeptoren oder zytoplasmatische Tyrosinkinasen (Turkson, 2004). Daraufhin können die STAT-Monomere durch ihre SH2-Domäne dimerisieren und anschließend in den Zellkern transportiert werden, wo sie spezifische Gentranskription initiieren können (Turkson, 2004). Insgesamt umfasst die Familie der STAT-Proteine mit STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 sieben strukturell ähnliche aufgebaute Proteine. Insbesondere STAT3, welches unter anderem von Interleukinen wie IL-6, IL-11 oder über Wachstumsfaktoren, wie FGF (fibroblast growth factor) aktiviert werden kann, ist über den JAK-STAT-Signalweg als Transkriptionsfaktor verschiedener tumorassozierter Proteine wie VEGF (Vascular Endothelial

Growth Factor) und Bcl-2 (B-cell-lymphoma-Protein) bekannt (Grandis et al., 1998, Grivennikov and Karin, 2010). Bei dauerhafter Aktivierung von STAT3 werden die Zellen vor der Apoptose geschützt und die proapoptotischen Effekte von STAT1 blockiert (Shen et al., 2000, Turkson 2004). Grandis et al. konnten 1998 zeigen, dass in einem großen Anteil von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region die Expression und Aktivierung von STAT3 deutlich erhöht ist. Auch bei HPV-infizierten Zervixzellen steigt im Verlauf der Karzinogenese die STAT3-Aktivierung von geringgradigen CIN1 zu hochgradigen CIN3 Läsionen stetig an. Im Übergang von CIN3 Läsionen zum invasiven Zervixkarzinom scheint die Expression hingegen meist abzunehmen. Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Smola konnten unerwarteterweise zeigen, dass die IL-6 induzierte Aktivierung von STAT3 in Zervixkarzinomen für eine Chemotherapie sensibilisiert (Walch-Rückheim, et al., 2016). Die Gruppe zeigte, dass in diesen Karzinomen die Aktivierung von STAT3 durch IL-6 Trans-Signaling zu einer erhöhten Expression von IRF1 führt, wodurch die Gebärmutterhalskrebszellen wesentlich anfälliger für chemotherapeutische Arzneimittel wie Cisplatin oder Etoposid, wurden (Walch-Rückheim et al., 2016).

### 2.3.3 IRF1-Expression als Prognosemarker

Die Arbeitsgruppe Smola zeigte auch, dass diese Chemosensibilisierung STAT3-abhängig war und identifizierten den Interferon-Regulationsfaktor-1 (IRF1) als STAT3-induzierten Mediator, der für die Steigerung des Zelltods erforderlich ist. In Übereinstimmung mit diesen Daten korrelierte pTyr705-STAT3 signifikant mit der Expression von IRF1 im Zellkern bei Gebärmutterhalskrebszellen. Es wurde gezeigt, dass eine hohe IRF1-Expression in Tumorzellen von Biopsien, die vor der Behandlung des Gebärmutterhalskrebs entnommen worden waren, mit einer signifikant besseren Antwort auf neoadjuvante Radio-/ Chemotherapie der Patienten einhergeht. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die prätherapeutische IRF1-Expression als neuartiger prädiktiver Biomarker für neoadjuvante Radio- /Chemotherapien dienen könnten.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Smola waren die ersten, die eine Abnahme der eigentlich antiapoptotischen wirkenden STAT3-Aktivierung während des Fortschreitens der Malignität zeigten. So stellte sich die Frage, ob diese Reaktion eine Folge der viralen Ätiologie der Zervixkarzinogenese ist. Bereits bekannt sind komplexe Wechselwirkungen zwischen humanen Papillomaviren und IRFs. Das E5-Onkoprotein ist in der Lage die IRF1-Expression zu induzieren (Muto et al., 2011). Gegensätzlich kann das E7-Onkoprotein die IFN-induzierte

IRF1-Expression unterdrücken und die Wirksamkeit der Immunreaktion beeinträchtigen (Um et al., 2002). So kommt es zu der Überlegung, ob die Aktivierung von STAT3 die IRF1-Hemmung durch HPV außer Kraft setzen kann. Eine Frage, welche nicht nur Zervixkarzinome betreffen kann, sondern auch bei anderen HPV assoziierten Tumoren von Bedeutung sein kann. Weiter stellt sich die Frage, ob auch bei HPV-assozierten Kopf-Hals-Tumoren die prätherapeutische IRF1-Expression als prädiktiver Biomarker für neoadjuvante Radio-/Chemotherapien gelten kann.

### 2.4 Eigene Fragestellung

Da sich die Überlebensdaten der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen trotz Neuerungen und Verbesserungen von Operationstechniken, Strahlen-, Chemo- und Immuntherapie nicht wesentlich verbessert haben, muss die bisherige Standarttherapie dieser Karzinomentität dringend überarbeitet und weiterentwickelt werden. Es braucht Therapieansätze, welche die Prognose der Patienten verbessern, Rezidive vorbeugen und die Lebensqualität durch möglichst geringe Therapienebenwirkungen erhöhen. In der Vergangenheit lag der Schwerpunkt der Kopf-Hals-Tumortherapie vor allem auf der primär chirurgischen Intervention und Exzision des tumorbefallenen Gewebes. Primäre Radiochemotherapien wurden meist nur in fortgeschrittenem Tumorstadium oder bei Inoperabilität angestrebt. Dabei fiel jedoch auf, dass einige der Patienten sehr gut auf diese Therapie ansprachen und häufig eine komplette Remission des Tumorgewebes festzustellen war, während andere davon nicht oder nur sehr wenig profitierten. Angeknüpft an die Ergebnisse von Walch-Rückheim et al., 2016 bei Zervixkarzinomen, soll das Ziel dieser Arbeit die Beantwortung der Frage sein, ob die prätherapeutische IRF1-Expression auch bei Kopf-Hals-Tumoren als prädiktiver Biomarker für (neoadjuvante) Radiochemotherapien gelten könnte. Weiterhin soll geklärt werden, ob die IRF1-Expression mit dem HPV-Status der Plattenepithelkarzinome korreliert und das IRF1 für die bereits bekannte strahlensensiblere Eigenschaft der HPV-positiven Kopfhalstumore verantwortlich ist. Würde ein prätherapeutischer Marker existieren, welcher die Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Radiochemotherapie vorhersagen würde, könnte man gezielt Patienten auswählen, denen man primär diese Therapie empfiehlt. So könnten diesen Personen die Komplikationsrisiken und das umfassende Nebenwirkungsspektrum der operativen Eingriffe erspart bleiben, ohne dass Einbußen in der Prognose und der Überlebenswahrscheinlichkeit in Kauf genommen werden müssten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<u>Geräte</u>	<u>Firma</u>
Adobe Photoshop CS5 Software	Adobe Systems, USA
Image J Software	ImageJ, Maryland
Abzug	Waldner, Heidelberg
Kühlplatte Tissue TEK Cryo Console	Miles Scientific
Magnetrührer IKAMAG REC-G	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikroskop Leica DMI 6000 B	Leica, Nussloch
Mikrotom RM2235	Leica, Nussloch
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Gilson, USA
Power Pac 300	BioRad, München
Schüttler	GFL, Großburgwedel
Spektrophotometer NanoDrop	Thermo Scientific, USA
Sterilbank FAZ 1	Waldner, Wangen
Taumler-Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifugen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage SI-2002	Denver Instruments, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

Weitere Plastik- und Verbrauchswaren, die im Labor benötigt wurden, kommen von den Unternehmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhausen), TPP (Trasadingen), Eppendorf (Hamburg) und R. Langenbrinck (Emmendingen).

#### 3.1.2 Puffer und Reagenzien

##### Puffer

Citratpuffer

Citronensäure-Monohydrat 2,94 g  
ad 1Liter dH<sub>2</sub>O, pH 7

### 3. Material und Methoden

10x Tris-buffered saline (TBS)

NaCl      80 g  
Tris      24,2 g  
ad 1 Liter dH<sub>2</sub>O, pH 7,6

1x TBS

10% 10x TBS in dH<sub>2</sub>O

IHC-Reagenzien	Firma
2.5% Normal Horse Serum Blocking Solution	Vector Laboratories, USA
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	Vector Laboratories, USA
ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase (AP) Substrate	Vector Laboratories, USA
ImmPRESS™ Anti-Kaninchen IgG (Peroxidase)	Vector Laboratories, USA

#### 3.1.3 Chemikalien

Chemikalie/ Reagenz	Firma
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin	Vector Laboratories, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Caesar & Loretz, Hilden
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Thermo Scientific, USA
2-Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

#### 3.1.4 Verwendeter Antikörper

Tabelle 4: Verwendeter Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
Anti IRF1	Polyklonaler Peptidantikörper	Rabbit Santa Cruz Biotechnology Cat. Sc-497	1:4000

#### 3.2 Fixierung des Gewebes

Nach der operativen Entnahme des Tumorgewebes wurden die Gewebeproben von Mitarbeitern im pathologischen Institut der Universität des Saarlandes in einem PBS-gepuffertem, 4%igen-Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Der Reagenz-Transferprozess fand, wie in Tabelle 4 beschrieben, mit Hilfe des Tissue-Tek®VIPTM5 JR automatisiert statt.

Tabelle 5: Systematische Darstellung des Reagenz-Trasnferprozesses zur Gewebsfixierung

Reagenz	Dauer (h)	Temperatur (C°)
4%-iges Formalin/1xPBS	2,0	45
70%-iges Ethanol	0,5	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
96%-iges Ethanol	0,5	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Paraffin	0,5	60
Paraffin	0,5	60
Paraffin	1,0	60
Paraffin	1,0	60

#### 3.3 Histologische und Immunhistologische Färbungen

##### 3.3.1 Versuchsablauf

###### 3.3.1.1 Erstellung der Gewebeschnitte

Die aus den Patientenproben hergestellten Paraffinblöcke wurden von Juliane Kütten, Mitarbeiterin des virologischen Instituts der Universität des Saarlandes, mithilfe des Leica RM 2235 Rotationsmikrotoms geschnitten. Dazu wurden zunächst drei Schnitte von je 10µm verworfen und im Folgenden 10µm Schnitte angefertigt, die nach kurzer Lagerung im Wasserbad auf Superfrost Ultra Plus Objekträger aufgebracht wurden. Nachdem die Schnitte über Nacht getrocknet waren, wurden sie bei 37°C für 24 Stunden im Wärmeschrank gelagert, um eine optimale Haftung auf den Objektträgern zu gewährleisten.

#### 3.3.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Kontrolle wurde von jeder Gewebeprobe zunächst eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Bei dieser handelt es sich um ein gängiges Verfahren, mit dem unterschiedliche Strukturen in feingeweblichen Schnitten angefärbt werden können. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der alle sauren Bestandteile der Zelle, wie unter anderem den Zellkern und die darin enthaltene DNA, blau anfärbt. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff, der vor allem die basischen Bestandteile der Zelle, wie das Zytosol, rot färbt. Die Kombination dieser beiden Einzelfärbungen ermöglicht, die verschiedenen Gewebestrukturen zu unterscheiden und krankhafte Veränderungen des Gewebes zu erkennen. Für die HE-Färbung wurden die FFPE-Gewebeschnitte jeweils fünf Minuten in einer absteigenden Xylol-Reihe entparaffiniert, anschließend je zwei Minuten in 99%-igem, 90%-igem, 80%-igem, 70%-igem und 50%-igem Ethanol von dem Xylol gereinigt und rehydriert und danach in destilliertem Wasser auf einem Schüttler gewaschen. Es folgte die zwei-minütige Inkubation in Hämatoxylin und das Bläuen der Schnitte unter laufendem Leitungswasser für fünf Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte in einer 1%-igen Eosinlösung für zehn Minuten inkubiert und gegengefärbt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff abgeklopft und die Schnitte in aufsteigender Ethanol- (50%, 70%, 80%, 90%, 99%) und Xylolreihe dehydriert. Eingedekkt wurden die Schnitte, indem 2-3 Tropfen VectaMount Permanent Mounting Medium auf ein Deckgläschen gegeben wurden und dieses anschließend auf die gefärbten Gewebeschnitte gesetzt wurde. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mithilfe des Mikroskops DMI 6000 B von Leica in fünf- zehn- und zwanzigfacher Vergrößerung begutachtet und fotografiert. Es folgte die Aussortierung der Schnitte, auf welchen kein Tumorgewebe zu erkennen war und die anschließend nicht immunhistochemisch gefärbt wurden.

#### 3.3.1.3 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen den Nachweis einzelner Proteine mit Hilfe von an Antikörper gekoppelten Farbstoffen. Das Prinzip der Anfärbbarkeit beruht dabei auf der Affinität der Antikörper zu bestimmten Eiweißen, welche als Epitop bezeichnet werden. Die spezifische und starke Bindung zwischen Antikörper und Epitop wird als Antikörper-Antigen-Reaktion bezeichnet. Der Antikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, welches das Vorhandensein des Epitops im Präparat sichtbar macht. Auch für die immunhistochemische Färbung wurden die FFPE-Gewebeschnitte jeweils 10 min. in einer absteigenden Xylol-Reihe

### 3. Material und Methoden

---

entparaffiniert und anschließend je zwei Minuten in 99%-igem, 90%-igem, 80%-igem, 70%-igem und 50%-igem Ethanol von dem Xylol gereinigt und rehydriert, um abschließend fünf Minuten in destilliertem Wasser auf einem Schüttler gewaschen zu werden. Darauf folgte ein zehn-minütiger Kochvorgang bei 100°C in einem Citratpuffer zur Demaskierung des Antigens, auf welchen sich eine Abkühlungsphase von 15 min bei Raumtemperatur anschloss. Anschließend wurde die gewebseigenen Peroxidase-Aktivität mittels zehn-minütiger Inkubation mit 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Dunkelkammer inhibiert, um eine unerwünschte Hintergrundfärbung der Präparate zu vermeiden. Darauf folgte ein fünf Minuten andauernder Waschvorgang in TBS. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und 20 Minuten lang mit einer Blockierlösung (2.5% Normal Horse Serum, Vector Laboratories) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Anschließend wurde der IRF1-Primärantikörper in 0,5% BSA/TBS 1:4000 verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Am zweiten Tag folgte ein fünf-minütiger Waschvorgang in TBS und die 30-minütige Inkubation mit dem anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper. Nach zwei, jeweils fünf Minuten andauernden Waschvorgängen in TBS wurden die Präparate mit Chromogen-Substrat entwickelt. Dafür wurde ein Milliliter des DAB-Puffers mit einem Tropfen des DAB-Chromogens vermischt und für eine Minute auf die Schnitte gegeben. Ein weiterer Waschvorgang über zwei Minuten in Leitungswasser folgte. Für die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte danach zehn Sekunden in Hämatoxylin inkubiert. Anschließend folgte das Bläuen unter laufendem Leitungswasser für fünf Minuten. Für die darauffolgende Dehydrierung wurden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%) geschwenkt und zwei min. in 99%-igem Ethanol und aufsteigender Xylolreihe gereinigt. Auch hier wurden die Schnitte eingedeckt, indem 2-3 Tropfen VectaMount Permanent Mounting Medium auf ein Deckgläschen geben wurden und dieses anschließend auf den gefärbten Gewebeschnitt gesetzt wurde. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mithilfe des Mikroskops DMI 6000 B von Leica fotografisch dokumentiert. Zur Anfertigung von Bildübersichten wurden zunächst Aufnahmen in 5-facher Vergrößerung aufgenommen. Genaue Details wurden dann in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur statistischen Auswertung der Immunhistochemie wurden je drei Aufnahmen der Karzinomfärbungen, sowie je zwei Bilder der infiltrierenden Immunzellen gemacht und die positiv gefärbten Zellen ausgezählt. Mithilfe des Computerprogrammes SPSS folgte die statistische Auswertung.

Zur besseren Übersicht ist der Versuchsablauf in Tabelle 6 nochmal dargestellt.

### 3. Material und Methoden

Tabelle 6: Systematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung

<b>Zeitangabe</b>	<b>Durchgeführte Maßnahme</b>
24h	Wärmeschrank 37C°
10 min	Xylol 1
10 min	Xylol 2
10 min	Xylol 3
2 min	99% Ethanol
2 min	90% Ethanol
2 min	80% Ethanol
2 min	70% Ethanol
2 min	50% Ethanol
5 min	Destilliertes H2O
10 min	Kochen in Citratpuffer
15 min	Abkühlen in Citratpuffer
10 min	Blocken mit 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Dunkelkammer
5 min	Waschen in TBS
	Schnitte mit Fettstift umranden
20 min	Inkubation mit 2,5% Normal Horse Serum
	IRF1 Antikörper 1:4000 in 0,5% BSA/TBS verdünnt
24 h	Inkubation mit verdünntem Antikörper in Feuchtkammer bei 4°C
5 min	Waschen in TBS
30 min	Inkubation mit anti-rabbit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper
5 min	Waschen in TBS
5 min	Waschen in TBS
1 min	Färben mit Chromogen
2 min	Waschen mit Leitungswasser
10 sec	Färben in Hämatoxylin
5 min	Bläuen unter fließendem Wasser
2-3 auf- und abschwenken	50% Ethanol
2-3 auf- und abschwenken	70% Ethanol
2-3 auf- und abschwenken	80% Ethanol
2-3 auf- und abschwenken	90% Ethanol
2 min	99% Ethanol
5 min	Xylol 1
5 min	Xylol 2
	Abtropfen
	Eindecken mit Deckgläschchen
24 h	Trocknen

### 3.4 Analytische Methoden

#### 3.4.1 Anonymisiertes Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte von HNSCC-Patienten untersucht. Alle Patientenproben wurden im Vorfeld anhand von histopathologischen Gutachten von ärztlichen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts untersucht und als Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert. Nach dem eigenständigen Aussortieren des Patientenmaterials, von welchem entweder kein Paraffinblock mehr vorhanden oder in dem der HE-Färbung kein Tumorgewebe zu erkennen war, blieben von ursprünglich 150 Patienten noch 85 übrig, die in die Arbeit eingeschlossen wurden. Alle Patienten wurden im Vorfeld darüber aufgeklärt, dass das entnommene Gewebe nach der klinischen Untersuchung zu Forschungszwecken genutzt werden kann und haben hierfür eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Sämtliche Versuche wurden in einem Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (280/10) genehmigt.

Tabelle 7: Anonymisiertes Patientenkollektiv

	Geschlecht	Erkrankungsalter	Entität
Patient 1	m	50	Larynx-CA
Patient 2	m	54	Mehretagentumor
Patient 3	m	62	Mundboden-CA
Patient 4	m	62	Zungengrund-CA
Patient 5	m	73	Hypopharynx-CA
Patient 6	m	64	Mehretagentumor
Patient 7	w	57	Larynx-CA
Patient 8	w	72	Larynx-CA
Patient 9	m	47	Larynx-CA
Patient 10	m	55	Mehretagentumor
Patient 11	m	51	Hypopharynx-CA
Patient 12	w	57	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 13	m	54	Mundboden-CA
Patient 14	m	56	Mehretagentumor
Patient 15	m	64	Larynx-CA-Rezidiv
Patient 16	m	55	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 17	m	53	Mundboden-CA
Patient 18	w	67	Larynx-CA
Patient 19	m	60	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 20	m	71	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 21	m	70	Larynx-CA
Patient 22	m	63	Larynx-CA
Patient 23	m	54	Hypopharynx-CA
Patient 24	m	56	Mundboden-CA
Patient 25	w	49	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 26	m	59	Hypopharynx-CA

### 3. Material und Methoden

Patient 27	w	66	Tonsillen-CA
Patient 28	w	68	Larynx-CA
Patient 29	m	57	Hypopharynx-CA
Patient 30	m	51	Mehretagentumor
Patient 31	w	70	Larynx-CA
Patient 32	m	57	Hypopharynx-CA
Patient 33	m	51	Larynx-CA
Patient 34	m	57	Mehretagentumor
Patient 35	m	56	Mehretagentumor
Patient 36	m	51	Mehretagentumor
Patient 37	m	68	Larynx-CA
Patient 38	m	61	Tonsillen-CA
Patient 39	m	68	Larynx-CA
Patient 40	m	47	Hypopharynx-CA
Patient 41	m	56	Hypopharynx
Patient 42	w	72	Larynx-CA
Patient 43	m	62	Hypopharynx-CA
Patient 44	m	71	Mehretagentumor
Patient 45	m	59	Mehretagentumor
Patient 46	m	66	Hypopharynx-CA
Patient 47	m	78	Larynx-CA
Patient 48	m	73	Hypopharynx-CA
Patient 49	m	67	Tonsillen-Ca
Patient 50	m	75	Larynx-CA
Patient 51	m	55	Zungengrund-CA
Patient 52	m	64	Mehretagentumor
Patient 53	m	54	Larynx-CA
Patient 54	w	77	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 55	m	56	Mehretagentumor
Patient 56	w	69	Hypopharynx-CA
Patient 57	m	64	Oropharynx-CA
Patient 58	m	69	Mehretagentumor
Patient 59	w	64	Hypopharynx-CA
Patient 60	m	63	Mehretagentumor
Patient 61	m	52	Mehretagentumor
Patient 62	m	64	Hypopharynx-CA
Patient 63	m	44	Tonsillen-CA
Patient 64	m	60	Rezidiv-Oropharynx-CA
Patient 65	m	56	Larynx-CA
Patient 66	m	64	Larynx-CA
Patient 67	w	62	Zungengrund-CA
Patient 68	m	56	Mehretagentumor
Patient 69	m	58	Tonsillen-Ca
Patient 70	m	60	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 71	m	57	Oropharynx-CA (nicht Tonsillen- oder Mundboden-CA)
Patient 72	m	50	Mehretagentumor
Patient 73	w	47	Rezidiv-Oropharynx-CA
Patient 74	m	63	Zungen-CA

### 3. Material und Methoden

Patient 75	m	61	Larynx-CA
Patient 76	m	76	Tonsillen-CA
Patient 77	m	53	Mehretagentumor
Patient 78	m	54	Hypopharynx-CA
Patient 79	m	68	Tonsillen-CA
Patient 80	m	71	Tonsillen-CA
Patient 81	m	65	Zungengrund-CA
Patient 82	m	61	Hypopharynx-CA
Patient 83	m	80	Tonsillen-CA
Patient 84	m	73	Tonsillen-CA-Rezidiv
Patient 85	m	56	Mehretagentumor

#### 3.4.2 Analyse der Radiochemosensibilität

Alle in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten erhielten zu diagnostischen Zwecken und zur Bestimmung der Tumorausdehnung und -infiltrationstiefe eine Computertomographie des Halses, des Thorax und des Abdomens vor Therapiebeginn. Die Computertomographie stellt dabei eine spezielle Form der Röntgenuntersuchung dar, bei der sich eine Röntgenröhre spiralförmig um den Körper dreht und detailgetreue Querschnittsbilder erzeugt. Durch diese fortlaufende Darstellung der zu untersuchenden Körperregion können dreidimensionale Bilder aufgebaut werden und die Lage, Größe sowie die Ausdehnung eines Tumors genau bestimmt werden. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde sich anschließend aufgrund der inoperablen Tumorlage und -ausdehnung, des reduzierten Allgemeinzustandes der Patienten oder aufgrund des Patientenwunsches gegen eine primär chirurgische, sondern für eine kurativ angestrebte primäre Radiochemotherapie entschieden. Individuell fallbezogen und interdisziplinär in den Tumorkonferenzen abgestimmt erhielten die Patienten als Standardfraktionierung Einzeldosen von zwei Grey in 35 Fraktionen über eine Gesamtzeit von sieben Wochen angesehen. Alternativ wurde in einigen Fällen eine Hyperfraktionierung mit erhöhter Strahlengesamtdosis oder eine akzelerierte Fraktionierung mit verkürzter Therapiedauer angestrebt. Als Chemotherapeutika wurde standartmäßig eine Kombination aus Cisplatin oder Carboplatin mit 5-Floururacil eingesetzt. Bei Kontraindikationen gegen platinhaltige Chemotherapeutika kann alternativ auch Mitomycin gegeben werden. Bei Patienten mit Mukositis wurde auf 5-Floururacil verzichtet (Honecker, Dornoff 2016). Die Schemata der Verabreichungsform sind in Tabelle 43 dargestellt.

1	Cisplatin mono	100 mg/m <sup>2</sup>	Inf. (1 h)	Tag 1; Wdh Tag 22 o. 29
2	Cisplatin 5-Floururacil	20 mg/m <sup>2</sup> 600 mg/m <sup>2</sup>	Inf. (1 h) kont. Inf. (24 h)	Tag 1-5; Wdh Tag 29 Tag 1-5; Wdh Tag 29

### 3. Material und Methoden

3	Carboplatin 5-Floururacil	AUC 5 600 mg/m <sup>2</sup>	Inf. (30') kont. Inf. (24 h)	Tag 1; Wdh Tag 29 Tag 1-5; Wdh Tag 29
4	Mitomycin 5-Floururacil	10 mg/m <sup>2</sup> 600 mg/m <sup>2</sup>	Inf. kont. Inf. (24 h)	Tag 1; Wdh Tag 29 Tag 1-5; Wdh Tag 29

Abbildung 11: Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren

Schemata der kurativ angesetzten primären Radiochemotherapie bei HNSCC mit simultaner RTx mit einer Gesamtdosis über 70 Gy mit Einzeldosen von jeweils 2 Gy.

Als nach ca. zwölf Wochen nach Abschluss der Radiochemotherapie die therapiebedingte Ödem- und Entzündungsreaktion abgeklungen war, erhielten alle Patienten eine weitere CT-Untersuchung zum Restaging. Anhand dieser Bildgebung konnte die Tumormasse nach der Therapie mit dem Ausgangsbefund verglichen werden und so das Ansprechen auf die Radiochemotherapie beurteilt werden. Für das Therapieansprechen wurde eine semiquantitative Skala von eins bis drei bestimmt. Eins steht dabei für die Patienten, bei denen es zu keinem Ansprechen auf die Therapie kam und sich die Tumormasse nach Radiochemotherapie genauso groß oder progressiv im Vergleich zu dem Vorbefund darstellte. Zwei steht für Patienten, bei denen es zu einer Teilremission gekommen war und drei für Patienten, bei denen nach Radiochemotherapie kein Tumor mehr auf dem CT-Bild zu erkennen war.

#### 3.4.3 Immunoreactive Score

Der „immunoreactive score“, kurz IRS, wurde ursprünglich von Remmele und Stegner 1987 für die Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts von malignen Brusttumoren entwickelt (Remmele und Stegner, 1987). Dabei werden die Werte der Färbeintensität (0-3) und des Prozentsatzes positiver Zellen (0-4) aus immunhistochemischen Färbungen miteinander multipliziert, wobei für die Färbeintensität der vorherrschende Intensitätsgrad ausschlaggebend ist. So kann der IRS die Werte 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 oder 12 annehmen. Inzwischen wird der IRS für Versuchs- und Forschungszwecke auch außerhalb der Gynäkologie verwendet, um immunhistochemische Färbungen quantitativ auszuwerten. Abbildung 11 veranschaulicht die Rechnungsweise des IRS.

A (% of positive cells)	B (Staining intensity)	A x B = IRS
4 = >80% positive cells		

### 3. Material und Methoden

3 = 51-80% of positive cells	3 = strong colour reaction	9-12 = strong
2 = 10-50% of positive cells	2 = moderate colour reaction	6-8 = moderate
1 = <10% of positive cells	1 = weak colour reaction	3-4 = weak
0 = no positive cells	0 = no colour reaction	0-2 = negative

Abbildung 12: Rechenweise des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner, 1987

Für die Auswertung wurden von jeder immunhistochemischen IRF1-Färbung drei Stellen mit sichtbaren Tumorgewebe ausgewählt und jeweils in 20-facher Vergrößerung abfotografiert. Anschließend wurden mithilfe der Adobe Photoshop CS5 Software alle Tumorzellen eines Bildes den Farbintensitätsgruppen null bis drei (0 = keine Anfärbbarkeit, 1 = schwache Anfärbbarkeit, 2 = mäßige Anfärbbarkeit, 3 = starke Anfärbbarkeit) zugeordnet und deren jeweiliger prozentualer Anteil ausgerechnet. Die Prozentsätze der Gruppen wurden anschließend über alle drei Bilder gemittelt. Die Gruppe mit dem höchsten prozentualen Wert der drei Bilder wurde mit ihrem Faktor je nach Anteil der insgesamt positiv dargestellten Zellen mit der Größe 0 bis 4 multipliziert.

#### 3.4.4 Analyse des HPV-Status

Aktuell werden verschiedene Methoden für die HPV-Erkennung in HNSCC eingesetzt. Derzeit verwendete Methoden umfassen den Nachweis von HPV-DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), DNA-In-situ-Hybridisierung, E6- und E7-mRNA-Nachweis mittels Echtzeit-PCR, Hybrid Capture 2-Tests, Cervista HPV16/18-Assays, sowie die immunhistochemischen Nachweismethoden von Proteinbiomarkern, welche mit Highrisk-HPV-Typen assoziiert sind, wie zum Beispiel p16INK4a, pRb, p53 und Cyclin D1. Es ist jedoch immer noch schwierig, zwischen latenten HPV-Infektionen, von denen sich der Körper selbst erholen kann und transformierenden Infektionen, die zur Entwicklung von Neoplasien führen, zu unterscheiden. In verschiedenen Studien wurde daher der gleichzeitige immunhistochemische Nachweis von p16INK4a als Biomarker für Highrisk-HPV-Infektion und Ki67 als Marker für eine hohe Zellproliferationsrate vorgeschlagen. Da p16INK4a als Tumorsuppressor fungiert, ist die gleichzeitige Expression von p16INK4a und Ki67 bei gesunden Zellen ausgeschlossen. Liegt diese Kombination dennoch vor, gilt dies als sicherer Hinweis eines deregulierten Zellzyklus und legt die transformierende Infektion mit Highrisk-HPV-Typen nahe. Deshalb wurde der gleichzeitige immunhistochemische Nachweis von

p16INK4a und Ki67 bereits zur Gebärmutterhalskrebspräventionen in nationalen Leitlinien etabliert und wird weltweit in der Gynäkologie routinemäßig eingesetzt. Zusätzliche Tests, welche die Anwesenheit von HPV-DNA detektieren, erhöhen die diagnostische Sicherheit (Linxweiler et al., 2015). Der HPV-Status wurde daher in der vorliegenden Arbeit mit dem immunhistochemischen Nachweis von p16INK4a und Ki67, sowie mit dem gleichzeitigen Nachweis von HPV-DNA durch eine spezifische PCR durch Barbara Best bestimmt.

#### **3.4.5 Statistische Analyse**

Die statistischen Analysen wurden mithilfe von Chi-Quadrat-Tests und binär logistische Regressionsanalyseverfahren nach Wald unter Verwendung der IBM SPSS Statistics 24.0 Software durchgeführt. P-Werte  $< 0,05$  wurden bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Von den 85 eingeschlossenen HNSCC-Patienten waren 71 männlich und 14 weiblich. Das mittlere Erkrankungsalter betrug bei den Frauen 64,1 Jahre und bei den Männern 60,4 Jahre. Die Plattenepithelkarzinome, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gliedern sich in Mundboden-, Zungengrund-, Tonsillen-, andere Oropharynx- Hypopharynx-, Larynx- und Mehretagenkarzinome. Nach UICC sind Zungengrund- und Tonsillenkarzinome Unterkategorien des Oropharynxkarzinoms. Da aber bei diesen beiden Entitäten die Prävalenz der HPV-Assoziation, wie oben beschrieben, deutlich höher ist als bei anderen Oropharynxkarzinomen werden diese beiden Untergruppen in der vorliegenden Arbeit einzeln aufgeführt.

Am häufigsten vertreten war das Larynxkarzinom mit 20 Fällen, gefolgt von dem Hypopharynxkarzinom mit 19 Fällen und 16 Fällen von Mehretagentumoren. Am seltensten kamen Mundboden- und Zungengrundkarzinome mit vier, beziehungsweise fünf Fällen vor.

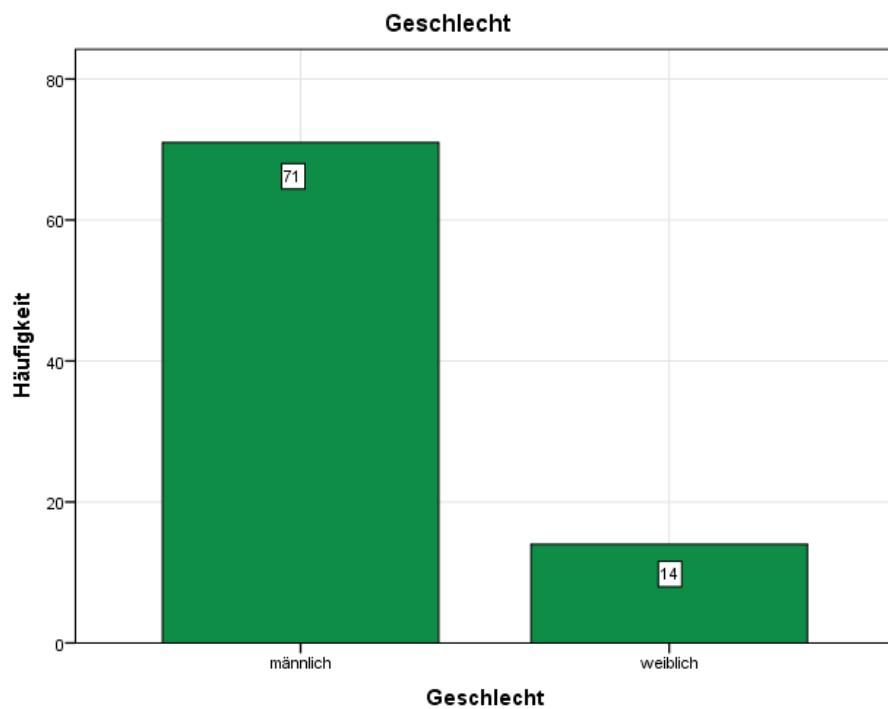


Abbildung 13: Statistische Auswertung der Geschlechterverteilung

Die Daten werden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. 71 der 85 Patienten waren männlich, 14 Patienten waren weiblich.

#### 4. Ergebnisse

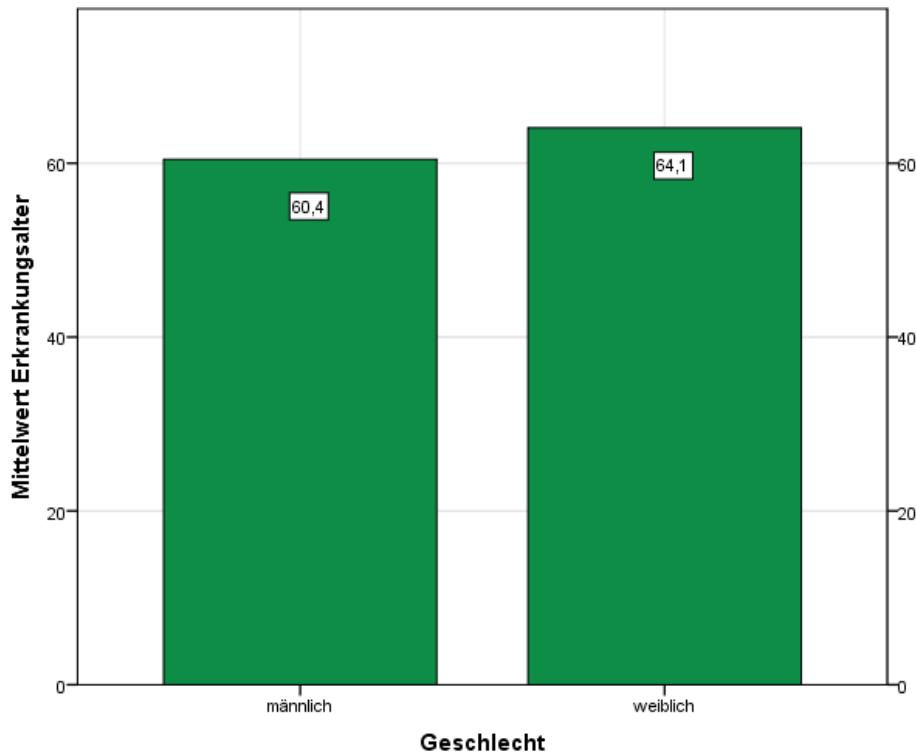
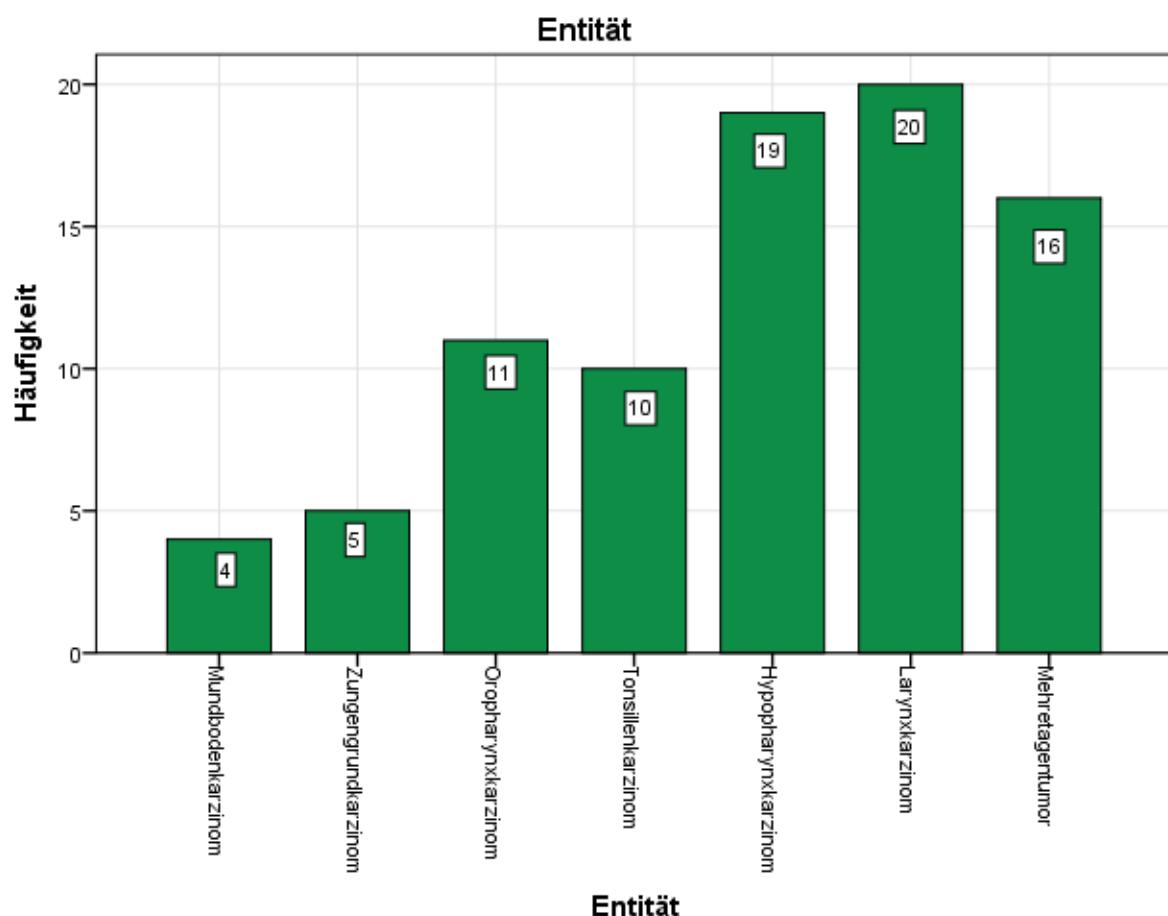


Abbildung 14: Statistische Auswertung des mittleren Erkrankungsalters bei Männern und Frauen  
Die Daten werden mithilfe eines Histogramms dargestellt. Bei Frauen betrug das durchschnittliche Erkrankungsalter 64,1, Männer waren bei Diagnosestellung im Mittel 60,4 Jahre alt.



#### 4. Ergebnisse

Abbildung 15: Statistische Auswertung der Tumorlokalisierung

Die Daten wurden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. In absteigender Reihenfolge war das Larynxkarzinom die häufigste Tumorentität ( $n=20$ ) gefolgt von Hypopharynx- ( $n=19$ ), Mehretagen- ( $n=16$ ), Oropharynx- (ausgenommen Tonsillen- und Zungengrundkarzinome) ( $n=11$ ), Tonsillen- ( $n=10$ ), Zungengrund- ( $n=5$ ), und Mundbodenkarzinomen ( $n=4$ ).

Der HPV-Status wurde mit dem immunhistochemischen Nachweis von p16INK4a und Ki67, sowie mit dem gleichzeitigen Nachweis von HPV-DNA durch eine spezifische PCR bestimmt. Daraus ergaben sich 59 Patienten, deren Tumor HPV negativ war, 18 Patienten mit einem HPV-positiven Tumor und 8 Patienten, bei denen der HPV-Status aufgrund widersprüchlicher Testergebnisse nicht genau bestimmbar war. Der höchste Anteil an HPV-positiven Karzinomen lag bei den Patienten mit Tonsillenkarzinomen mit 4 von 10 Fällen, gefolgt von Hypopharynxkarzinomen mit 6 von 19 Fällen und den Zungengrundkarzinomen mit einem Anteil von 1 von 4 Fällen.

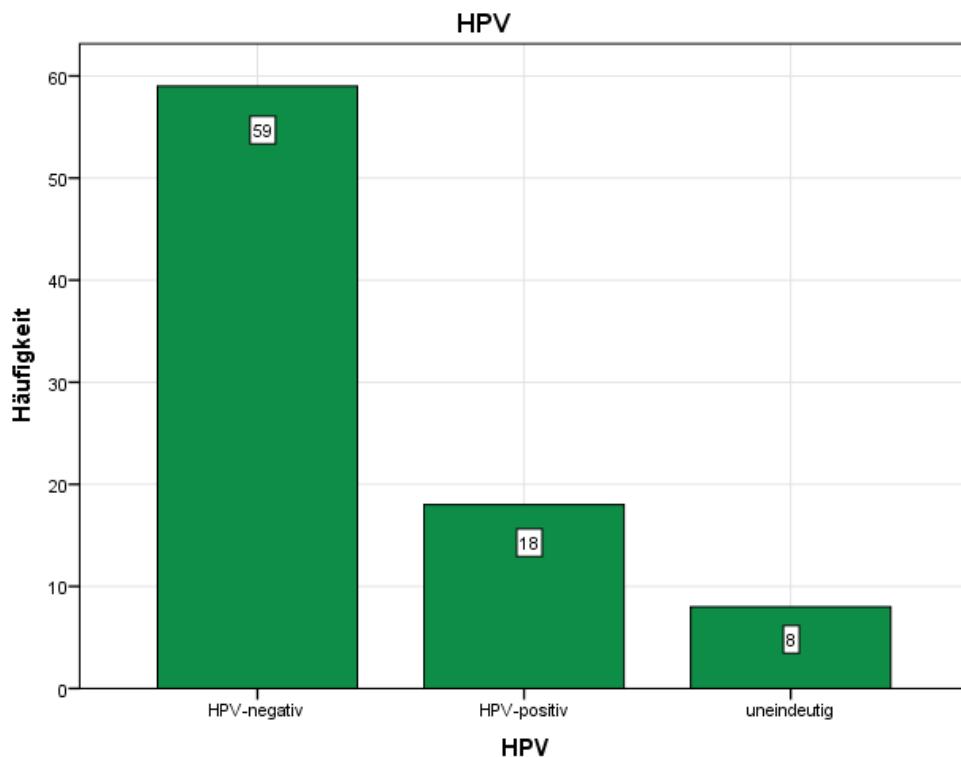


Abbildung 16: Statistische Auswertung des HPV-Status

Die Daten werden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. 59 der 85 Patienten waren HPV-negativ, 18 Patienten HPV-positiv und bei 8 Patienten war der HPV-Status uneindeutig.

#### 4. Ergebnisse

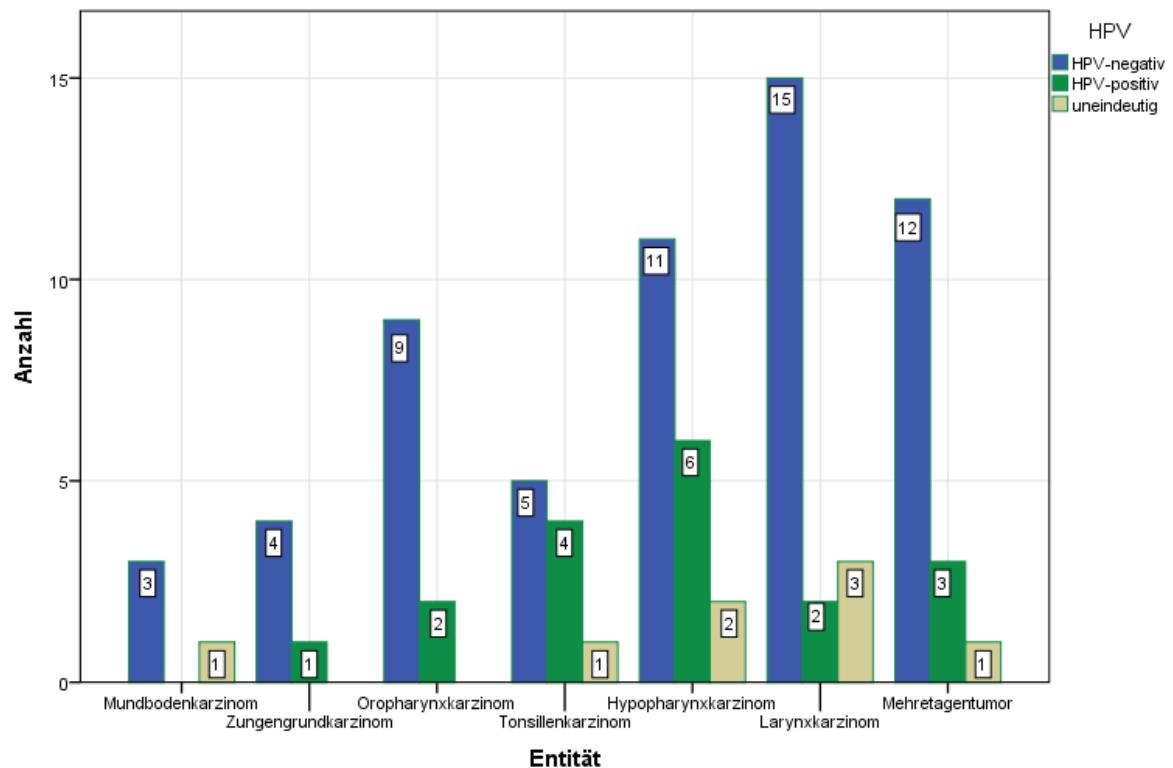


Abbildung 17: Statistische Auswertung des HPV-Status abhängig von der Tumorlokalisierung

Die Daten werden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. Den höchsten Anteil an HPV-positiven Karzinomen lag bei den Patienten mit Zungengrundkarzinomen mit einem Anteil von 1 aus 4, gefolgt von Tonsillenkarzinomen bei 4 von 10 und Hypopharynxkarzinomen mit 6 von 19.

Die in dieser Studie eingeschlossenen Patienten erhielten vor und ca. zwölf Wochen nach Abschluss der Radiochemotherapie eine Computertomographie zum Staging. Bei zwei Patienten lagen die posttherapeutischen CT-Datensätze leider nicht vor, sodass diese beiden Patienten aus den jeweiligen Fragestellungen herausgenommen werden mussten. Anhand der prä- und posttherapeutischen CT-Datensätze wurde der Erfolg der Radiochemotherapie durch Progression bzw. gleichbleibender Tumormasse, Teilremission und Vollremission gemessen. Bei jeweils 17 Patienten zeigte sich kein Ansprechen auf die Therapie, beziehungsweise eine Teilremission des Tumorvolumens. Bei den restlichen 49 Patienten kam es zu einer Vollremission des Tumorgewebes.

#### 4. Ergebnisse

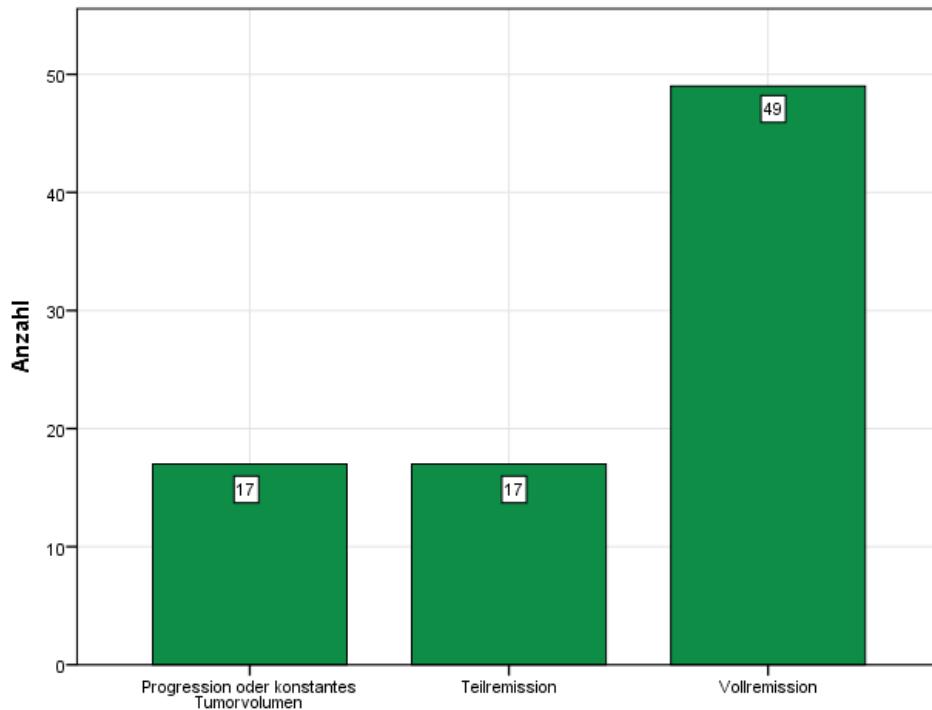


Abbildung 18: Vollremission vs. Teilremission vs. Tumorwachstum/konstantes Tumorvolumen  
Vergleich des Tumorvolumens vor und nach Radiochemotherapie anhand der prä- und posttherapeutischen CT-Bilder.

In einem weiteren Schritt wurde das Ansprechen auf die primäre Radiochemotherapie mit dem HPV-Status der Tumorproben verglichen. Während es bei elf Patienten mit einem HPV positiven Tumor zu einer Vollremission des Tumorgewebes kam, regierten vier Patienten mit HPV positiven Tumor überhaupt nicht auf die Therapie und zeigten ein konstantes oder zugenommenes Tumorvolumen nach der Therapie. Bei drei Patienten mit HPV positiven Tumor kam es zu einer Teilremission des malignen Gewebes.

#### 4. Ergebnisse

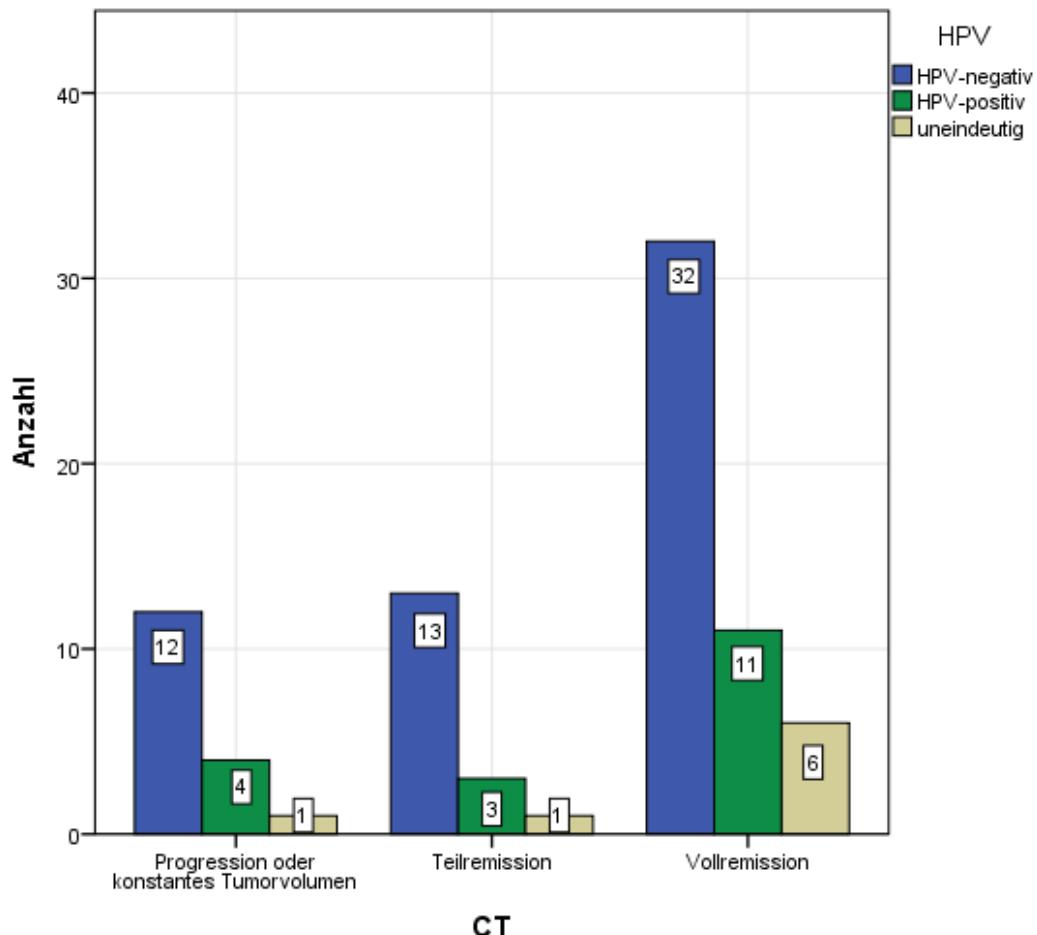


Abbildung 19: Ansprechen auf eine primäre Radiochemotherapie in Abhängigkeit des HPV-Status

Für die anschließend statistische Auswertung wurden die Patienten mit Tumorprogression, konstantem Tumorvolumen und Patienten mit einer Teilremission des Tumors in einer Gruppe zusammengefasst, die mit den 49 Patienten, deren Tumor nach der primären Radiochemotherapie eine Vollremission aufwiesen, verglichen wurden.

## 4. Ergebnisse

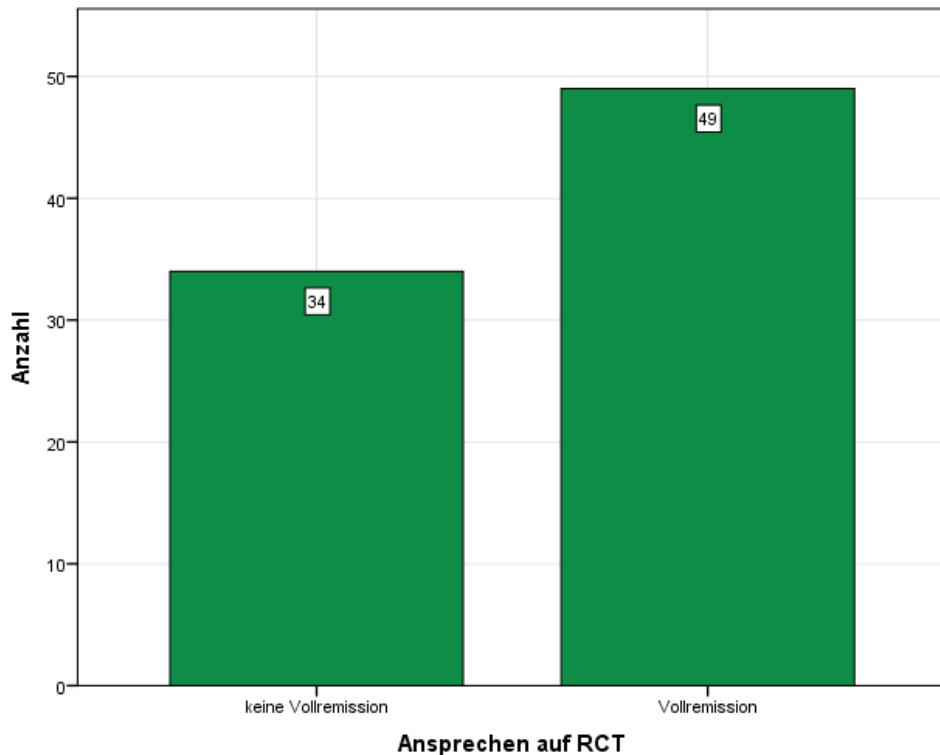


Abbildung 20: Vollremission vs. keine Vollremission

Anteil der Patienten die nach der primären Chemotherapie eine Vollremission des Tumorgewebes aufwiesen und Patienten ohne Vollremission.

### 4.2 Auswertung der immunhistochemischen IRF1 Färbung

#### 4.2.1 Analyse der Tumorzellen

Die Auswertung der IRF1 angefärbten Tumorzellen mit der Adobe Photoshop CS5 Software ergab für die 85 eingeschlossenen Patienten die nachfolgenden tabellarisch angeordneten Ergebnisse.

Tabelle 8: Auszählung der positiv gefärbten Zellen nach IRF1-Färbung

#### 4. Ergebnisse

	Bild 1												Bild 2												Bild 3											
	gesamt		stark		mäßig		leicht		nicht		gesamt		stark		mäßig		leicht		nicht		gesamt		stark		mäßig		leicht		nicht							
	Patient 1	144	2	1,39%	56	38,89%	52	36,11%	34	23,61%	99	13	13,13%	56	56,57%	17	17,17%	13	13,13%	170	23	13,53%	69	40,59%	37	21,76%	41	24,12%								
Patient 2	626	1	0,16%	2	0,32%	82	13,10%	541	86,42%	288	2	0,69%	24	8,33%	42	14,58%	220	76,39%	573	2	0,35%	14	2,44%	170	29,67%	387	67,54%									
Patient 3	250	28	11,20%	159	63,60%	63	25,20%	0	0,00%	185	47	25,41%	103	55,68%	35	18,92%	0	0,00%	451	34	7,54%	280	62,08%	137	30,38%	0	0,00%									
Patient 4	367	0	0,00%	61	16,62%	53	14,44%	253	68,94%	378	0	0,00%	84	22,22%	81	21,43%	213	56,35%	200	0	0,00%	21	10,50%	37	18,50%	142	71,00%									
Patient 5	224	4	1,79%	18	8,04%	98	43,75%	104	46,43%	344	8	2,33%	42	12,21%	150	43,60%	144	41,86%	283	6	2,12%	40	14,13%	106	37,46%	131	46,29%									
Patient 6	367	11	3,00%	42	11,44%	131	35,69%	183	49,86%	372	27	7,26%	100	26,88%	134	36,02%	111	29,84%	337	0	0,00%	5	1,48%	82	24,33%	250	74,18%									
Patient 7	325	15	4,62%	69	21,23%	221	68,00%	20	6,15%	426	7	1,64%	157	36,85%	233	54,69%	29	6,81%	334	12	3,59%	71	21,26%	227	67,96%	24	7,19%									
Patient 8	601	6	1,00%	121	20,13%	216	35,94%	258	42,93%	565	1	0,18%	91	16,11%	252	44,60%	221	39,12%	627	0	0,00%	77	12,28%	234	37,32%	316	50,40%									
Patient 9	228	89	39,04%	73	32,02%	29	12,72%	37	16,23%	114	62	54,39%	41	35,96%	15	13,16%	26	22,81%	523	0	0,00%	316	60,42%	175	33,46%	32	6,12%									
Patient 10	447	0	0,00%	5	1,12%	66	14,77%	376	84,12%	448	0	0,00%	36	8,04%	89	19,87%	323	72,10%	863	0	0,00%	144	16,69%	141	16,34%	578	66,98%									
Patient 11	303	9	2,97%	81	26,73%	155	51,16%	58	19,14%	299	8	2,68%	119	39,80%	111	37,12%	61	20,40%	313	12	3,83%	198	63,26%	59	18,85%	44	14,06%									
Patient 12	377	31	8,22%	109	28,91%	162	42,97%	75	19,89%	291	8	2,75%	69	23,71%	149	51,20%	65	22,34%	226	16	7,08%	60	26,55%	84	37,17%	66	29,20%									
Patient 13	200	80	40,00%	93	46,50%	19	9,50%	8	4,00%	725	419	57,79%	249	34,34%	48	6,62%	9	1,24%	406	55	13,55%	216	53,20%	103	25,37%	32	7,88%									
Patient 14	125	21	16,80%	69	55,20%	25	20,00%	10	8,00%	357	117	32,77%	159	44,54%	47	13,17%	34	9,52%	337	16	4,75%	207	61,42%	50	14,84%	64	18,99%									
Patient 15	232	30	12,93%	79	34,05%	30	12,93%	93	40,09%	416	152	36,54%	201	48,32%	63	15,14%	0	0,00%	323	81	25,08%	136	42,11%	53	16,41%	53	16,41%									
Patient 16	258	7	2,71%	79	30,62%	136	52,71%	36	13,95%	364	34	9,34%	165	45,33%	160	43,96%	5	1,37%	239	32	13,39%	74	30,96%	103	43,10%	30	12,55%									
Patient 17	348	43	12,36%	194	55,75%	97	27,87%	14	4,02%	477	7	1,47%	148	31,03%	172	36,06%	150	31,45%	331	4	1,21%	77	23,26%	160	48,34%	90	27,19%									
Patient 18	297	3	1,01%	56	18,86%	131	44,11%	107	36,03%	344	1	0,29%	51	14,83%	121	35,17%	171	49,71%	425	9	2,12%	83	19,53%	181	42,59%	152	35,76%									
Patient 19	399	0	0,00%	84	21,05%	220	55,14%	35	8,77%	417	2	0,48%	133	31,89%	209	50,12%	73	17,51%	286	19	6,64%	136	47,55%	77	26,92%	54	18,88%									
Patient 20	400	13	3,25%	150	37,50%	147	36,75%	90	22,50%	328	5	1,52%	130	39,63%	129	39,33%	64	19,51%	503	15	2,98%	179	35,59%	92	18,29%	217	43,14%									
Patient 21	387	8	2,07%	100	25,84%	255	65,89%	24	6,20%	538	9	1,67%	105	19,52%	366	68,03%	58	10,78%	281	8	2,85%	78	27,76%	166	59,07%	29	10,32%									
Patient 22	476	6	1,26%	27	5,67%	223	46,85%	220	46,22%	171	15	8,77%	50	29,24%	56	32,75%	50	29,24%	160	0	0,00%	22	13,75%	75	46,88%	63	39,38%									
Patient 23	218	8	3,67%	51	23,39%	107	49,08%	52	23,85%	114	3	2,63%	37	32,46%	55	48,25%	19	16,67%	453	16	3,53%	108	23,84%	289	63,80%	40	8,83%									
Patient 24	328	0	0,00%	148	45,12%	165	50,30%	15	4,57%	288	30	10,42%	117	40,63%	117	40,63%	24	8,33%	361	25	6,93%	132	36,57%	159	44,04%	45	12,47%									
Patient 25	438	17	3,88%	162	36,99%	203	46,35%	56	12,79%	350	25	7,14%	145	41,43%	154	44,00%	22	6,29%	482	37	7,68%	185	38,38%	129	26,76%	131	27,18%									
Patient 26	293	88	30,03%	99	33,79%	102	34,81%	4	1,37%	229	37	16,16%	88	38,43%	70	30,57%	34	14,85%	430	57	13,26%	232	53,95%	86	20,00%	55	12,79%									
Patient 27	364	7	1,92%	60	16,48%	67	18,41%	230	63,19%	603	4	0,66%	62	10,28%	201	33,33%	336	55,72%	541	11	2,03%	39	7,21%	192	35,49%	299	55,27%									

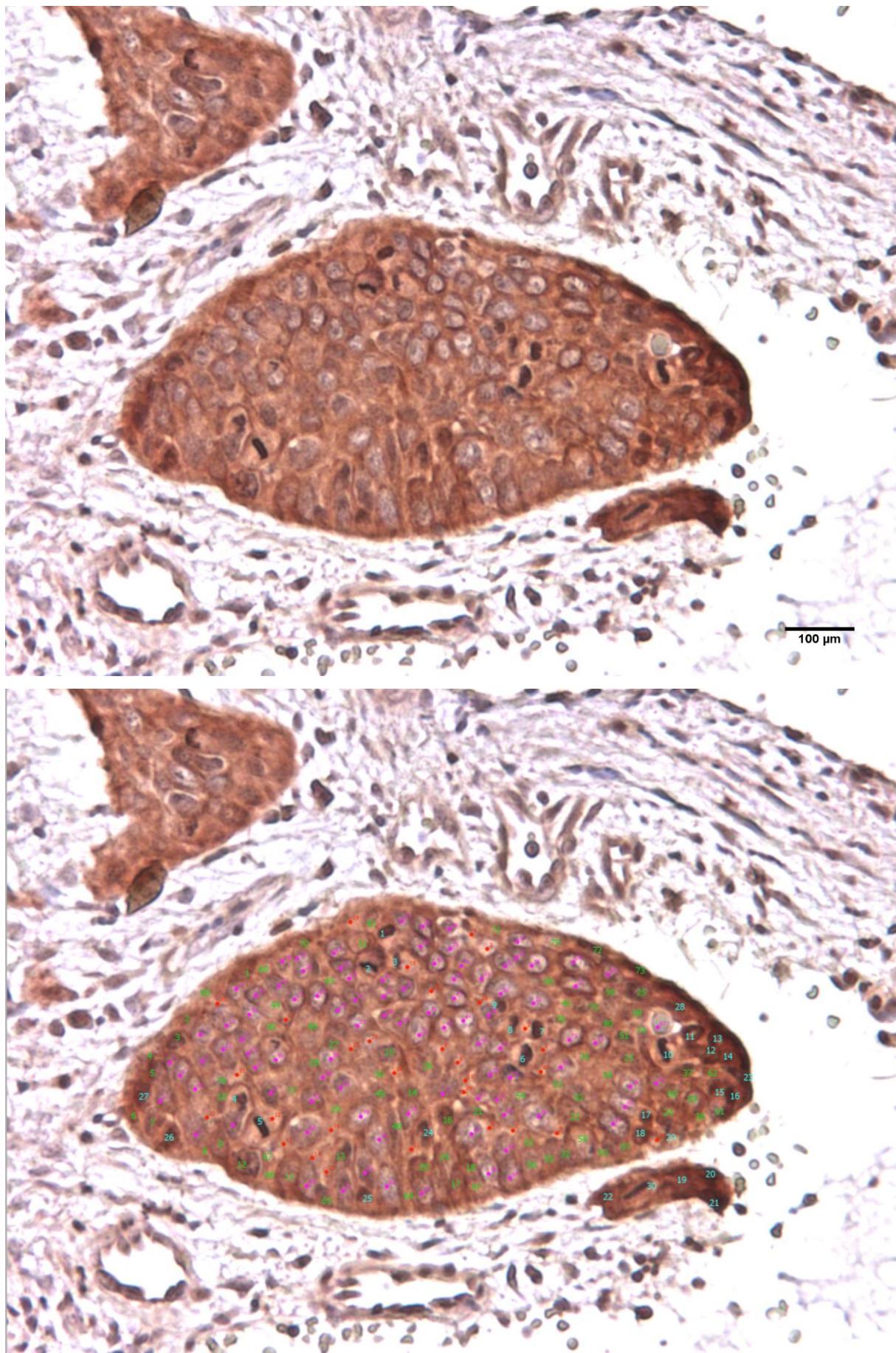
#### 4. Ergebnisse

Patient 28	251	12	4,78%	71	28,29%	82	32,67%	86	34,26%	294	0	0,00%	102	34,69%	114	38,78%	78	26,53%	279	0	0,00%	63	22,58%	62	22,22%	154	55,20%
Patient 29	516	11	2,13%	136	26,36%	197	38,18%	172	33,33%	485	7	1,44%	125	25,77%	173	35,67%	180	37,11%	523	3	0,57%	170	32,50%	289	55,26%	61	11,66%
Patient 30	143	4	2,80%	29	20,28%	106	74,13%	4	2,80%	228	4	1,75%	74	32,46%	86	37,72%	64	28,07%	477	9	1,89%	106	22,22%	168	35,22%	194	40,67%
Patient 31	802	13	1,62%	339	42,27%	200	24,94%	250	31,17%	313	5	1,60%	72	23,00%	160	51,12%	76	24,28%	950	25	2,63%	368	38,74%	347	36,53%	209	22,00%
Patient 32	476	73	15,34%	119	25,00%	150	31,51%	134	28,15%	263	25	9,51%	62	23,57%	70	26,62%	106	40,30%	347	24	6,92%	52	14,99%	94	27,09%	177	51,01%
Patient 33	231	5	2,16%	99	42,86%	72	31,17%	55	23,81%	273	4	1,47%	117	42,86%	90	32,97%	62	22,71%	257	21	8,17%	130	50,58%	63	24,51%	43	16,73%
Patient 34	597	6	1,01%	155	25,96%	357	59,80%	79	13,23%	439	7	1,59%	85	19,36%	293	66,74%	54	12,30%	397	0	0,00%	130	32,75%	201	50,63%	66	16,62%
Patient 35	563	12	2,13%	150	26,64%	241	42,81%	160	28,42%	522	122	23,37%	243	46,55%	150	28,74%	80	15,33%	405	0	0,00%	101	24,94%	245	60,49%	59	14,57%
Patient 36	522	36	6,90%	216	41,38%	172	32,95%	98	18,77%	251	11	4,38%	174	69,32%	42	16,73%	24	9,56%	678	11	1,62%	335	49,41%	296	43,66%	36	5,31%
Patient 37	342	2	0,58%	46	13,45%	258	75,44%	36	10,53%	419	1	0,24%	114	27,21%	282	67,30%	22	5,25%	401	6	1,50%	73	18,20%	155	38,65%	167	41,65%
Patient 38	291	2	0,69%	132	45,36%	152	52,23%	5	1,72%	379	0	0,00%	205	54,09%	164	43,27%	10	2,64%	338	0	0,00%	166	49,11%	123	36,39%	49	14,50%
Patient 39	89	0	0,00%	15	16,85%	40	44,94%	34	38,20%	224	0	0,00%	33	14,73%	96	42,86%	95	42,41%	86	0	0,00%	13	15,12%	55	63,95%	18	20,93%
Patient 40	404	16	3,96%	151	37,38%	217	53,71%	20	4,95%	455	8	1,76%	208	45,71%	209	45,93%	30	6,59%	278	4	1,44%	89	32,01%	139	50,00%	46	16,55%
Patient 41	117	0	0,00%	48	41,03%	28	23,93%	41	35,04%	401	0	0,00%	61	15,21%	133	33,17%	207	51,62%	155	19	12,26%	66	42,58%	19	12,26%	51	32,90%
Patient 42	148	8	5,41%	77	52,03%	33	22,30%	30	20,27%	41	0	0,00%	29	70,73%	9	21,95%	3	7,32%	305	4	1,31%	149	48,85%	131	42,95%	21	6,89%
Patient 43	209	14	6,70%	70	33,49%	65	31,10%	60	28,71%	192	11	5,73%	60	31,25%	85	44,27%	36	18,75%	207	12	5,80%	88	42,51%	65	31,40%	52	25,12%
Patient 44	583	0	0,00%	13	2,23%	135	23,16%	430	73,76%	272	0	0,00%	10	3,68%	98	36,03%	164	60,29%	600	12	2,00%	162	27,00%	98	16,33%	328	54,67%
Patient 45	301	18	5,98%	65	21,59%	75	24,92%	143	47,51%	468	0	0,00%	34	7,26%	195	41,67%	239	51,07%	271	0	0,00%	16	5,90%	107	39,48%	149	54,98%
Patient 46	460	13	2,83%	165	35,87%	103	22,39%	179	38,91%	542	14	2,58%	220	40,59%	151	27,86%	157	28,97%	361	28	7,76%	132	36,57%	119	32,96%	82	22,71%
Patient 47	341	0	0,00%	55	16,13%	268	78,59%	18	5,28%	310	7	2,26%	81	26,13%	153	49,35%	69	22,26%	257	9	3,50%	84	32,68%	72	28,02%	92	35,80%
Patient 48	337	0	0,00%	4	1,19%	160	47,48%	173	51,34%	635	0	0,00%	0	0,00%	265	41,73%	370	58,27%	443	0	0,00%	0	0,00%	144	32,51%	299	67,49%
Patient 49	163	19	11,66%	80	49,08%	39	23,93%	25	15,34%	419	41	9,79%	178	42,48%	147	35,08%	53	12,65%	319	15	4,70%	147	46,08%	117	36,68%	40	12,54%
Patient 50	302	22	7,28%	114	37,75%	89	29,47%	77	25,50%	631	51	8,08%	192	30,43%	251	39,78%	137	21,71%	609	42	6,90%	276	45,32%	217	35,63%	74	12,15%
Patient 51	303	0	0,00%	50	16,50%	122	40,26%	131	43,23%	313	4	1,28%	66	21,09%	134	42,81%	109	34,82%	306	0	0,00%	20	6,54%	88	28,76%	198	64,71%
Patient 52	380	0	0,00%	72	18,95%	189	49,74%	119	31,32%	296	9	3,04%	86	29,05%	122	41,22%	79	26,69%	314	0	0,00%	29	9,24%	198	63,06%	87	27,71%
Patient 53	275	0	0,00%	11	4,00%	104	37,82%	160	58,18%	310	0	0,00%	17	5,48%	147	47,42%	146	47,10%	196	0	0,00%	23	11,73%	99	50,51%	74	37,76%
Patient 54	242	4	1,65%	54	22,31%	113	46,69%	71	29,34%	229	5	2,18%	40	17,47%	68	29,69%	116	50,66%	423	7	1,65%	84	19,86%	115	27,19%	217	51,30%
Patient 55	560	0	0,00%	41	7,32%	263	46,96%	256	45,71%	457	4	0,88%	57	12,47%	203	44,42%	193	42,23%	548	6	1,09%	97	17,70%	235	42,88%	210	38,32%
Patient 56	314	0	0,00%	6	1,91%	97	30,89%	211	67,20%	546	0	0,00%	13	2,38%	182	33,33%	351	64,29%	606	12	1,98%	124	20,46%	178	29,37%	292	48,18%

#### 4. Ergebnisse

Patient 57	943	19	2,01%	135	14,32%	422	44,75%	367	38,92%	1010	26	2,57%	130	12,87%	352	34,85%	502	49,70%	973	41	4,21%	191	19,63%	311	31,96%	430	44,19%
Patient 58	310	6	1,94%	47	15,16%	103	33,23%	154	49,68%	213	6	2,82%	49	23,00%	60	28,17%	98	46,01%	566	3	0,53%	71	12,54%	133	23,50%	359	63,43%
Patient 59	276	0	0,00%	0	0,00%	138	50,00%	138	50,00%	650	0	0,00%	0	0,00%	29	4,46%	621	95,54%	759	0	0,00%	0	0,00%	58	7,64%	701	92,36%
Patient 60	615	0	0,00%	50	8,13%	291	47,32%	274	44,55%	606	3	0,50%	103	17,00%	311	51,32%	189	31,19%	239	0	0,00%	57	23,85%	108	45,19%	74	30,96%
Patient 61	367	141	38,42%	106	28,88%	47	12,81%	73	19,89%	213	45	21,13%	93	43,66%	44	20,66%	31	14,55%	144	57	39,58%	39	27,08%	26	18,06%	22	15,28%
Patient 62	259	24	9,27%	135	52,12%	95	36,68%	5	1,93%	473	40	8,46%	244	51,59%	142	30,02%	47	9,94%	229	26	11,35%	135	58,95%	60	26,20%	8	3,49%
Patient 63	647	66	10,20%	193	29,83%	192	29,68%	196	30,29%	392	6	1,53%	70	17,86%	202	51,53%	114	29,08%	251	2	0,80%	26	10,36%	76	30,28%	147	58,57%
Patient 64	333	75	22,52%	147	44,14%	35	10,51%	76	22,82%	316	13	4,11%	135	42,72%	95	30,06%	73	23,10%	498	14	2,81%	258	51,81%	146	29,32%	80	16,06%
Patient 65	601	45	7,49%	242	40,27%	137	22,80%	177	29,45%	259	17	6,56%	109	42,08%	51	19,69%	82	31,66%	345	31	8,99%	141	40,87%	92	26,67%	81	23,48%
Patient 66	226	19	8,41%	137	60,62%	56	24,78%	14	6,19%	136	9	6,62%	95	69,85%	25	18,38%	7	5,15%	501	28	5,59%	366	73,05%	89	17,76%	18	3,59%
Patient 67	539	0	0,00%	6	1,11%	126	23,38%	407	75,51%	474	0	0,00%	0	0,00%	118	24,89%	356	75,11%	328	0	0,00%	40	12,20%	105	32,01%	183	55,79%
Patient 68	375	15	4,00%	200	53,33%	112	29,87%	48	12,80%	826	18	2,18%	328	39,71%	315	38,14%	165	19,98%	357	15	4,20%	143	40,06%	78	21,85%	121	33,89%
Patient 69	660	0	0,00%	100	15,15%	407	61,67%	157	23,79%	546	0	0,00%	93	17,03%	200	36,63%	253	46,34%	584	23	3,94%	165	28,25%	283	48,46%	113	19,35%
Patient 70	238	84	35,29%	79	33,19%	51	21,43%	24	10,08%	247	21	8,50%	70	28,34%	83	33,60%	73	29,55%	297	33	11,11%	112	37,71%	89	29,97%	63	21,21%
Patient 71	610	50	8,20%	230	37,70%	111	18,20%	219	35,90%	659	14	2,12%	326	49,47%	233	35,36%	84	12,75%	784	0	0,00%	232	29,59%	442	56,38%	110	14,03%
Patient 72	425	43	10,12%	240	56,47%	84	19,76%	58	13,65%	761	78	10,25%	349	45,86%	220	28,91%	114	14,98%	684	220	32,16%	213	31,14%	136	19,88%	115	16,81%
Patient 73	721	0	0,00%	59	8,18%	241	33,43%	421	58,39%	619	1	0,16%	198	31,99%	242	39,10%	178	28,76%	345	0	0,00%	41	11,88%	135	39,13%	169	48,99%
Patient 74	250	19	7,60%	89	35,60%	65	26,00%	77	30,80%	666	24	3,60%	246	36,94%	314	47,15%	82	12,31%	293	38	12,97%	72	24,57%	102	34,81%	81	27,65%
Patient 75	392	6	1,53%	152	38,78%	154	39,29%	80	20,41%	527	37	7,02%	112	21,25%	207	39,28%	171	32,45%	590	1	0,17%	52	8,81%	463	78,47%	74	12,54%
Patient 76	450	13	2,89%	141	31,33%	180	40,00%	116	25,78%	293	69	23,55%	102	34,81%	95	32,42%	27	9,22%	570	0	0,00%	124	21,75%	219	38,42%	227	39,82%
Patient 77	638	7	1,10%	199	31,19%	298	46,71%	134	21,00%	552	0	0,00%	111	20,11%	368	66,67%	73	13,22%	707	11	1,56%	156	22,07%	376	53,18%	164	23,20%
Patient 78	486	61	12,55%	263	54,12%	114	23,46%	47	9,67%	482	9	1,87%	295	61,20%	157	32,57%	21	4,36%	242	19	7,85%	121	50,00%	81	33,47%	21	8,68%
Patient 79	366	34	9,29%	66	18,03%	73	19,95%	193	52,73%	272	16	5,88%	89	32,72%	130	47,79%	37	13,60%	218	0	0,00%	44	20,18%	76	34,86%	98	44,95%
Patient 80	534	46	8,61%	206	38,58%	163	30,52%	119	22,28%	447	0	0,00%	93	20,81%	205	45,86%	149	33,33%	246	19	7,72%	77	31,30%	131	53,25%	19	7,72%
Patient 81	259	0	0,00%	42	16,22%	80	30,89%	137	52,90%	679	0	0,00%	31	4,57%	281	41,38%	367	54,05%	304	8	2,63%	51	16,78%	111	36,51%	134	44,08%
Patient 82	611	0	0,00%	5	0,82%	146	23,90%	460	75,29%	966	0	0,00%	0	0,00%	84	8,70%	782	80,95%	689	0	0,00%	0	0,00%	92	13,35%	597	86,65%
Patient 83	303	6	1,98%	83	27,39%	110	36,30%	104	34,32%	324	16	4,94%	80	24,69%	70	21,60%	158	48,77%	714	34	4,76%	193	27,03%	125	17,51%	362	50,70%
Patient 84	152	1	0,66%	59	38,82%	56	36,84%	36	23,68%	152	9	5,92%	19	12,50%	39	25,66%	85	55,92%	131	4	3,05%	42	32,06%	21	16,03%	64	48,85%
Patient 85	364	30	8,24%	79	21,70%	106	29,12%	149	40,93%	387	27	6,98%	66	17,05%	130	33,59%	164	42,38%	468	17	3,63%	152	32,48%	117	25,00%	182	38,89%

#### 4. Ergebnisse

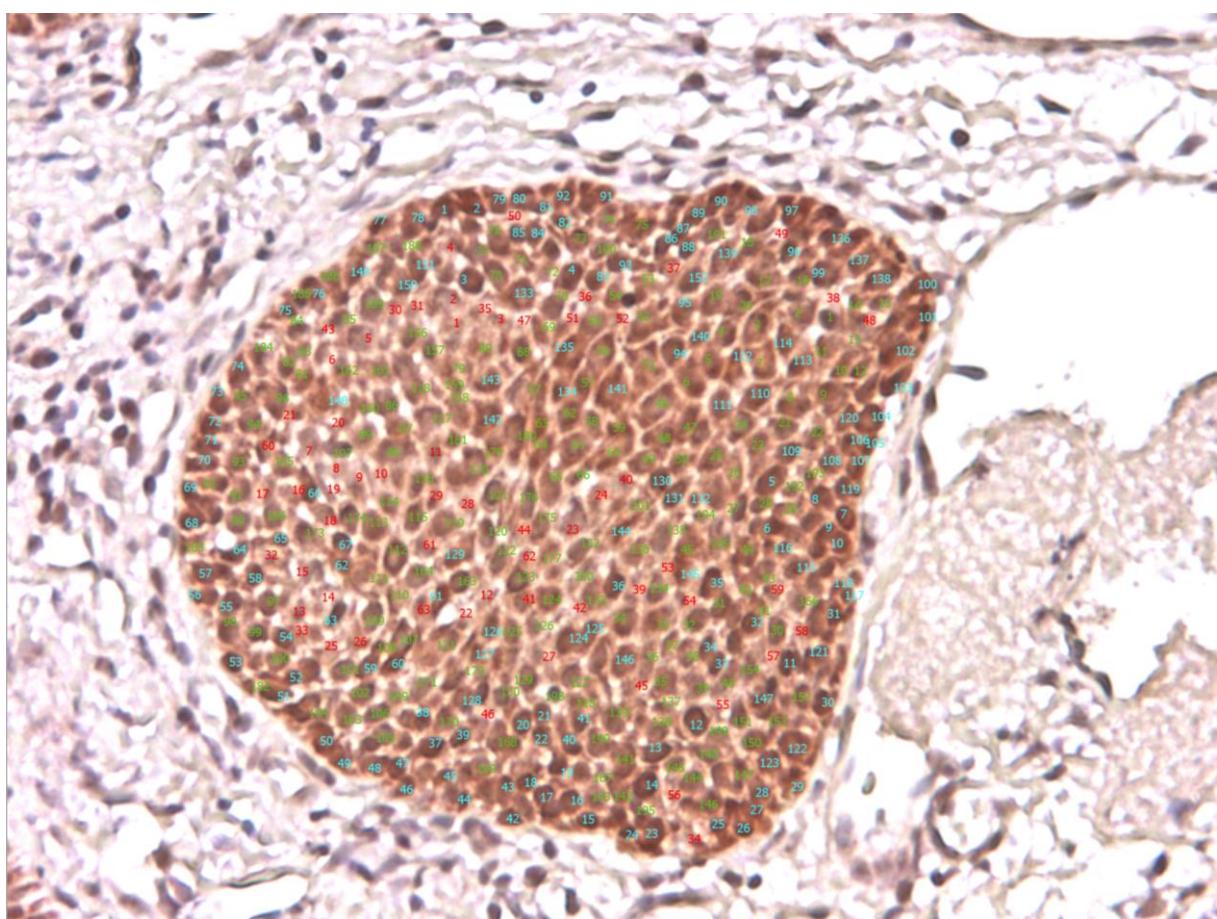
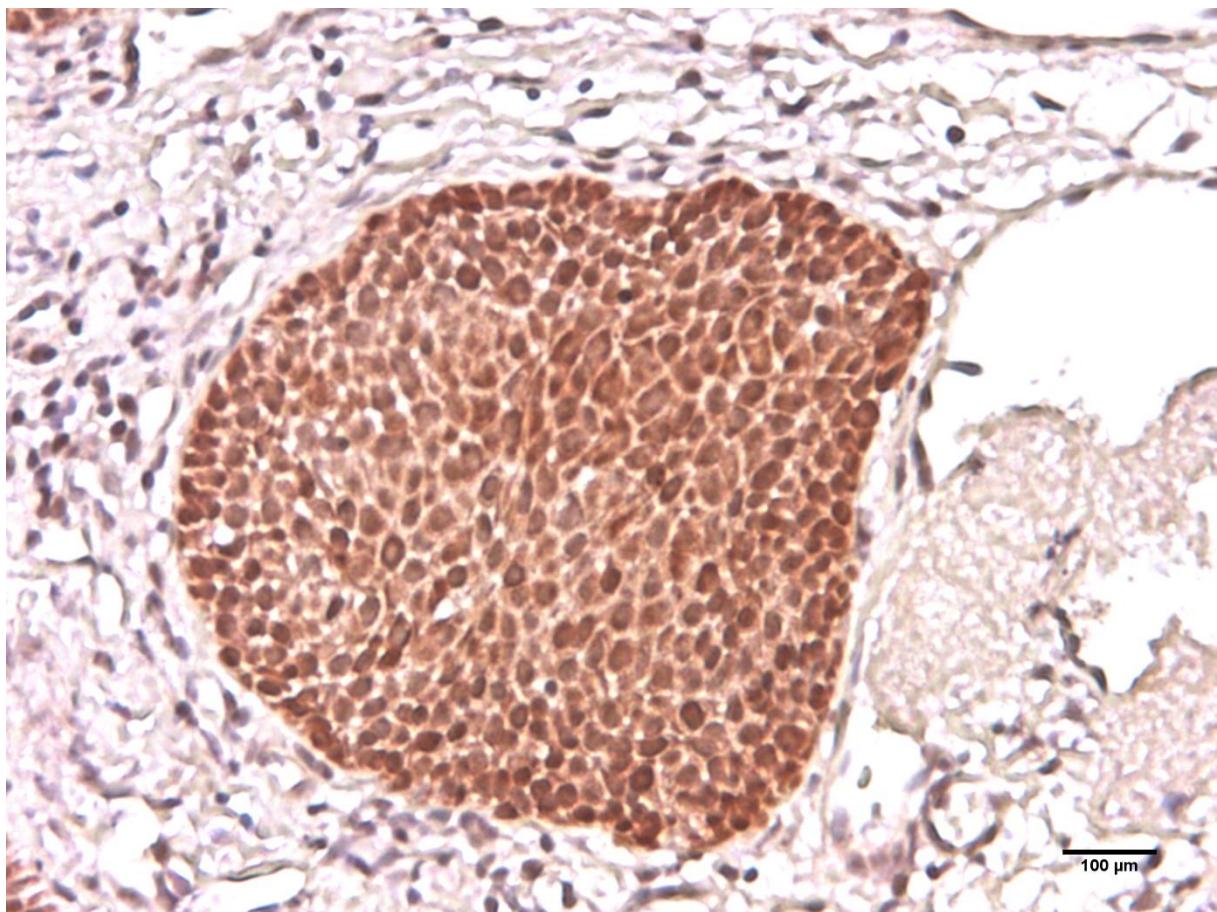


#### 4. Ergebnisse

232 Zellen gesamt

- = nicht gefärbt      93 Zellen      40,09 Prozent
- = leicht gefärbt      30 Zellen      12,93 Prozent
- = mäßig gefärbt      79 Zellen      34,05 Prozent
- = stark gefärbt      30 Zellen      12,93 Prozent

#### 4. Ergebnisse

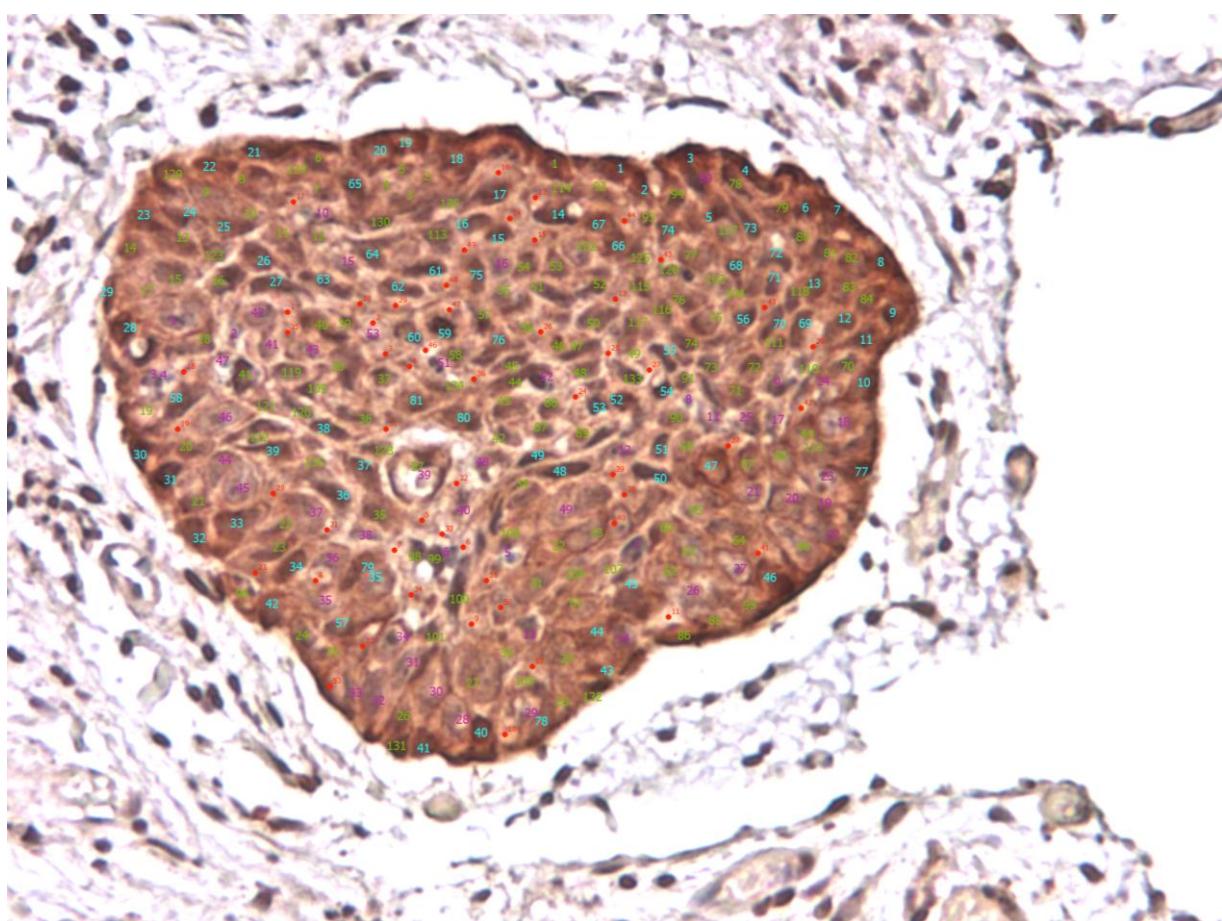
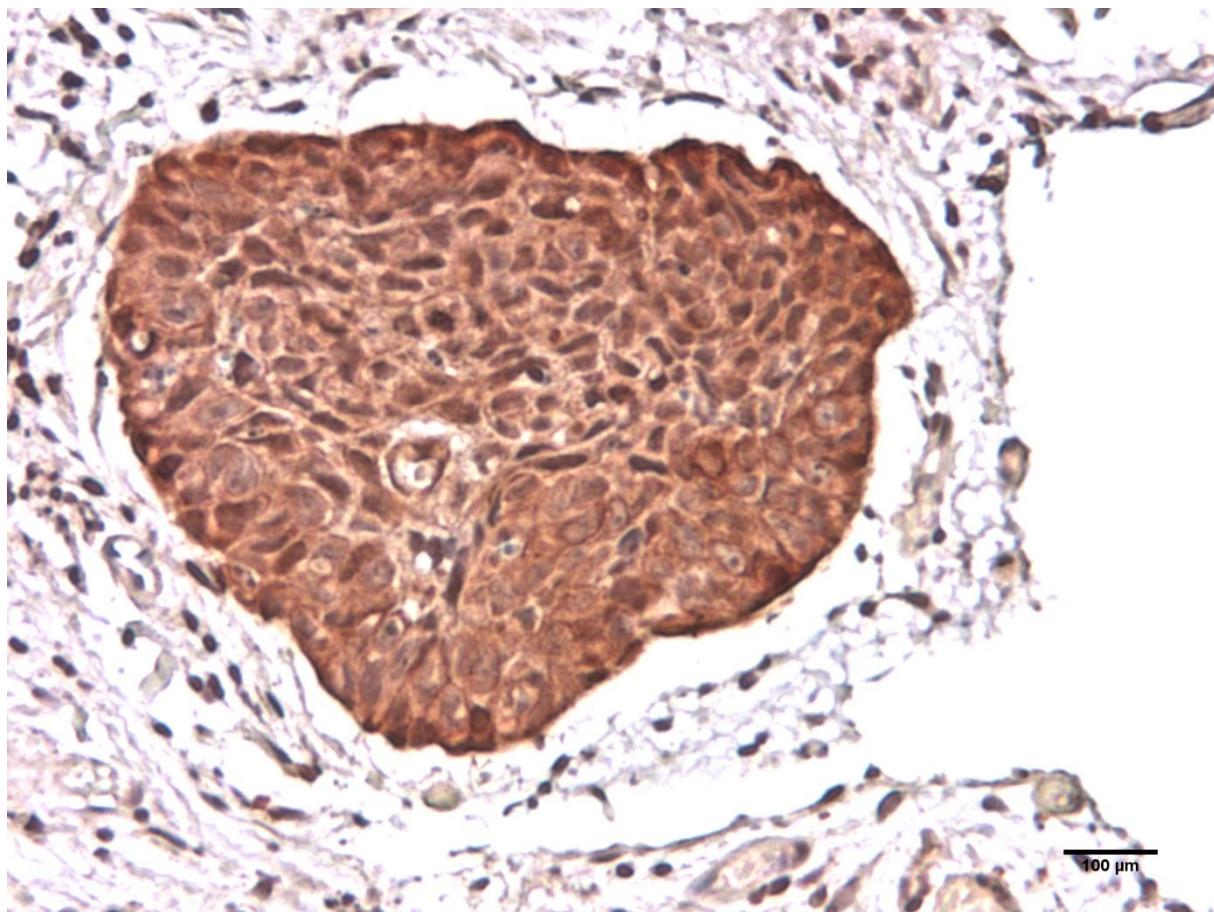


#### 4. Ergebnisse

416 Zellen gesamt

- = nicht gefärbt      0 Zellen      00,00 Prozent
- = leicht gefärbt      63 Zellen      15,14 Prozent
- = mäßig gefärbt      201 Zellen      48,32 Prozent
- = stark gefärbt      152 Zellen      36,54 Prozent

#### 4. Ergebnisse



## 4. Ergebnisse

323 Zellen gesamt

• = nicht gefärbt	53 Zellen	16,41 Prozent
• = leicht gefärbt	53 Zellen	16,41 Prozent
• = mäßig gefärbt	136 Zellen	42,11 Prozent
• = stark gefärbt	81 Zellen	25,08 Prozent

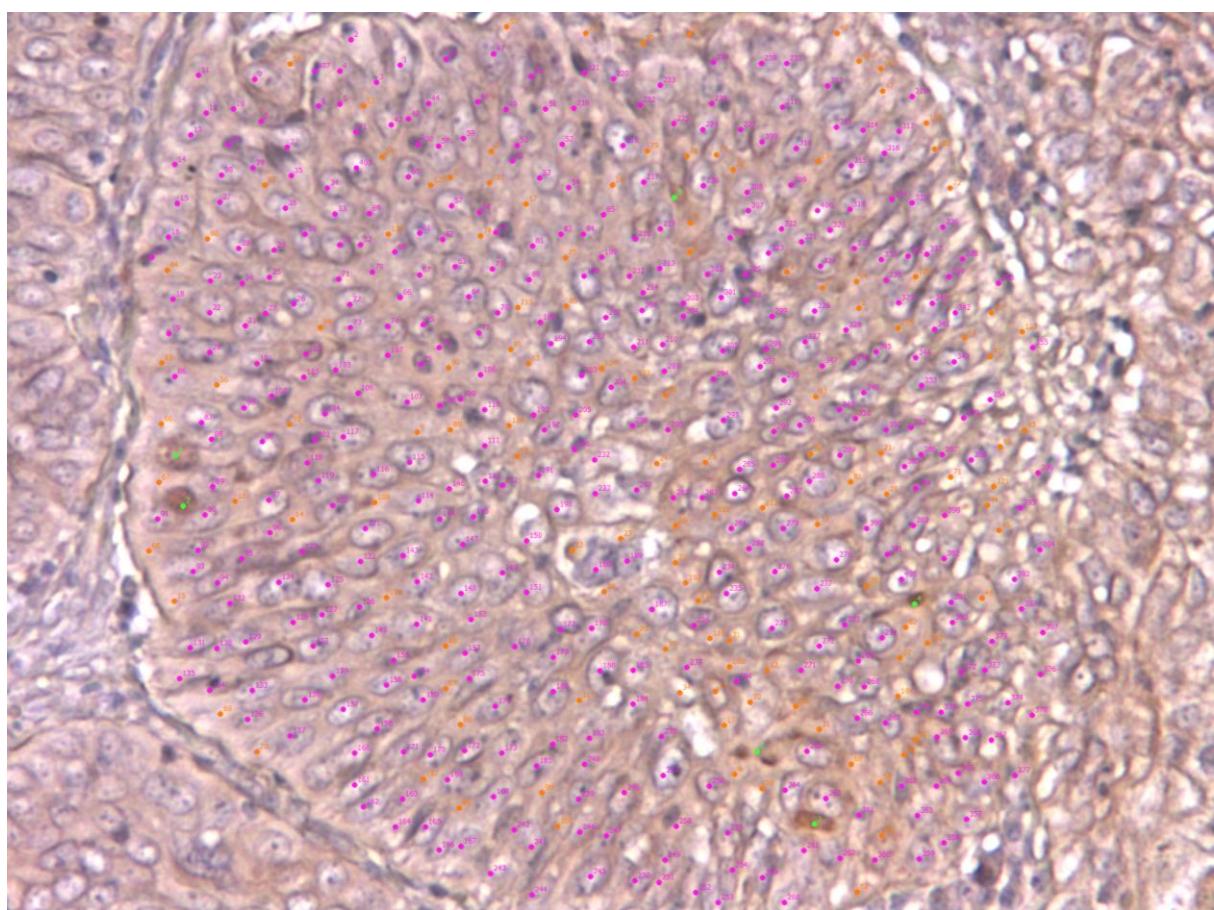
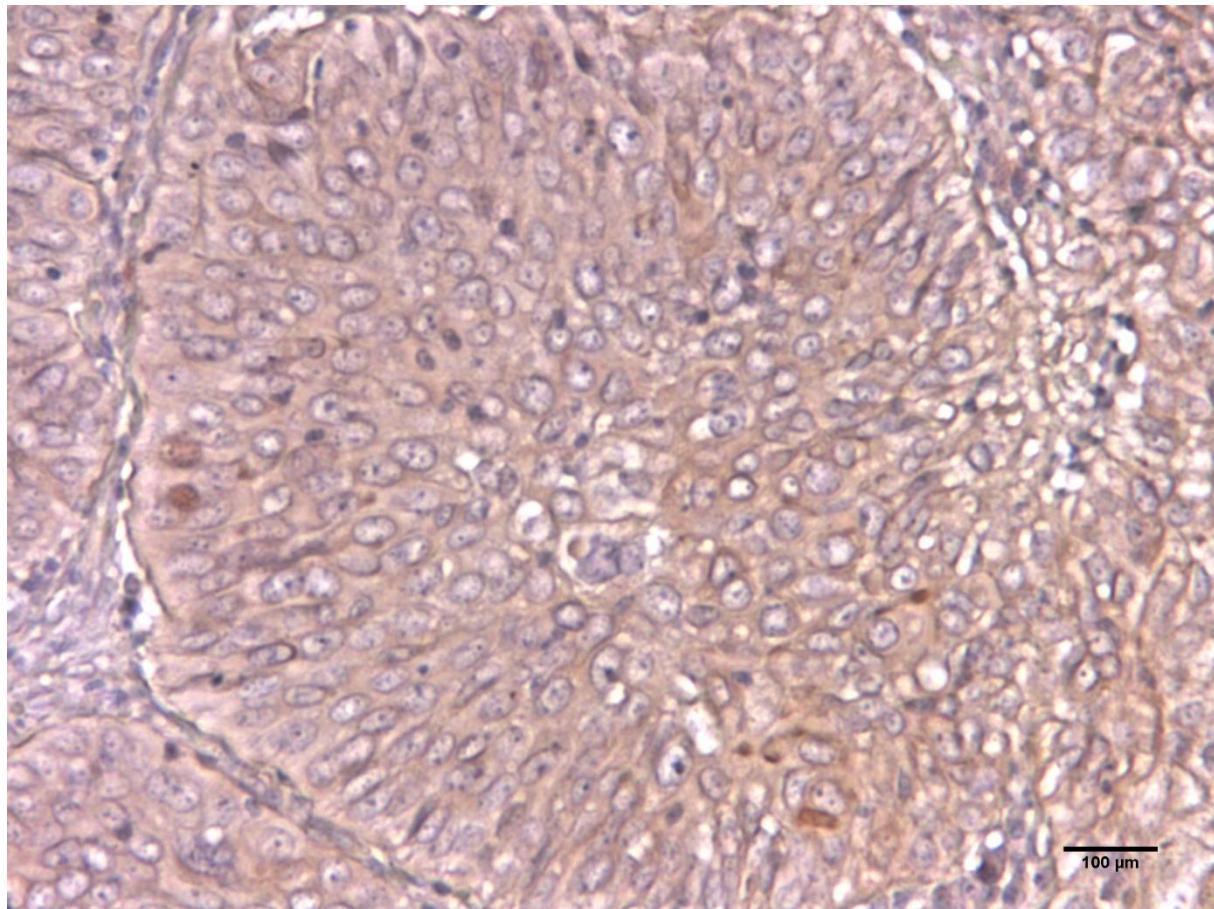
Mittel über alle drei Bilder

Stark gefärbte Zellen	24,85 Prozent
Mäßig gefärbte Zellen	41,49 Prozent
Leicht gefärbte Zellen	14,83 Prozent
Nicht gefärbte Zellen	18,83 Prozent

### Abbildungen 20-25: Tumor mit starker IRF1-Expression

Beispiel der jeweils dreiteiligen Bildserien von Tumorgewebe mit starker IRF1-Expression und IRS-Wert von 8 in 20-facher Vergrößerung

#### 4. Ergebnisse



#### 4. Ergebnisse

539 Zellen gesamt

- = nicht gefärbt
- = leicht gefärbt
- = mäßig gefärbt
- = stark gefärbt

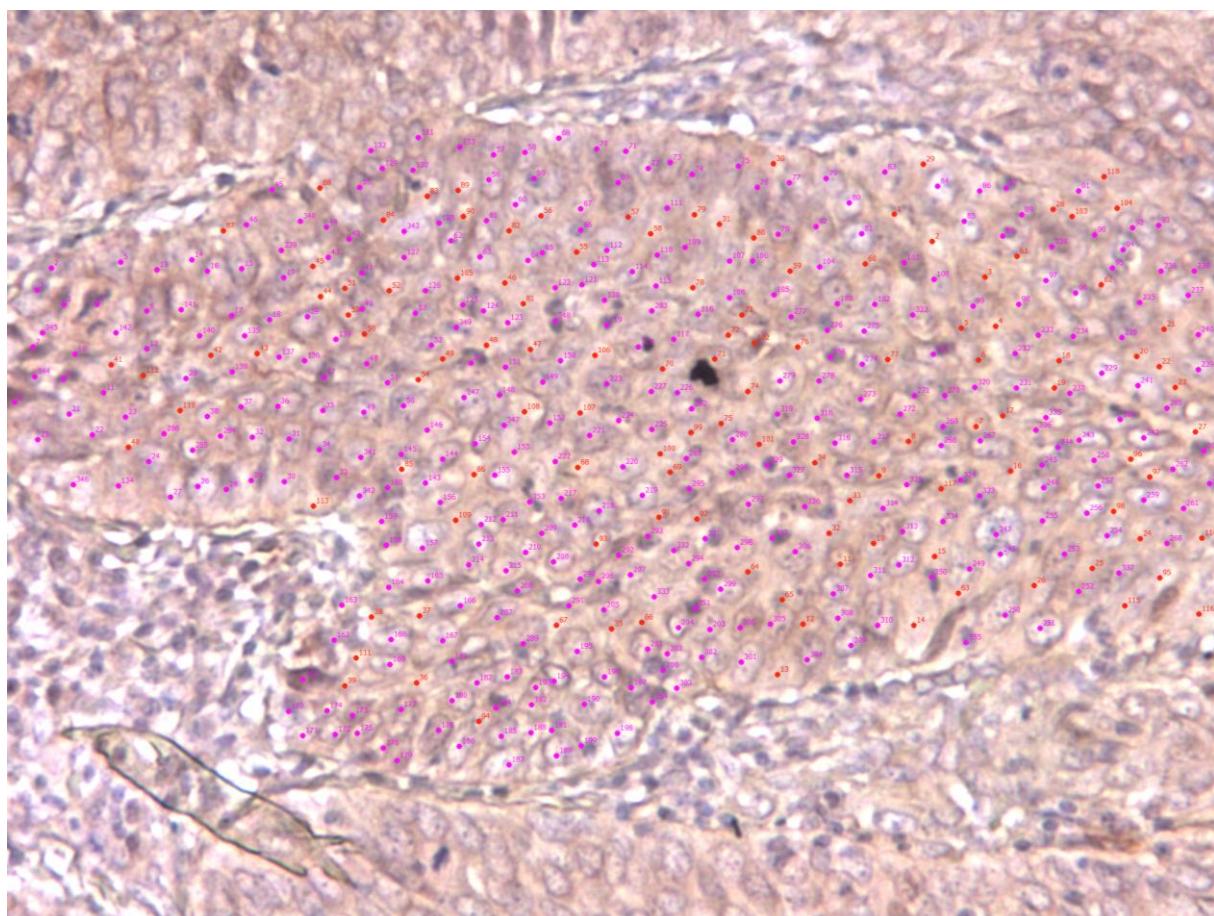
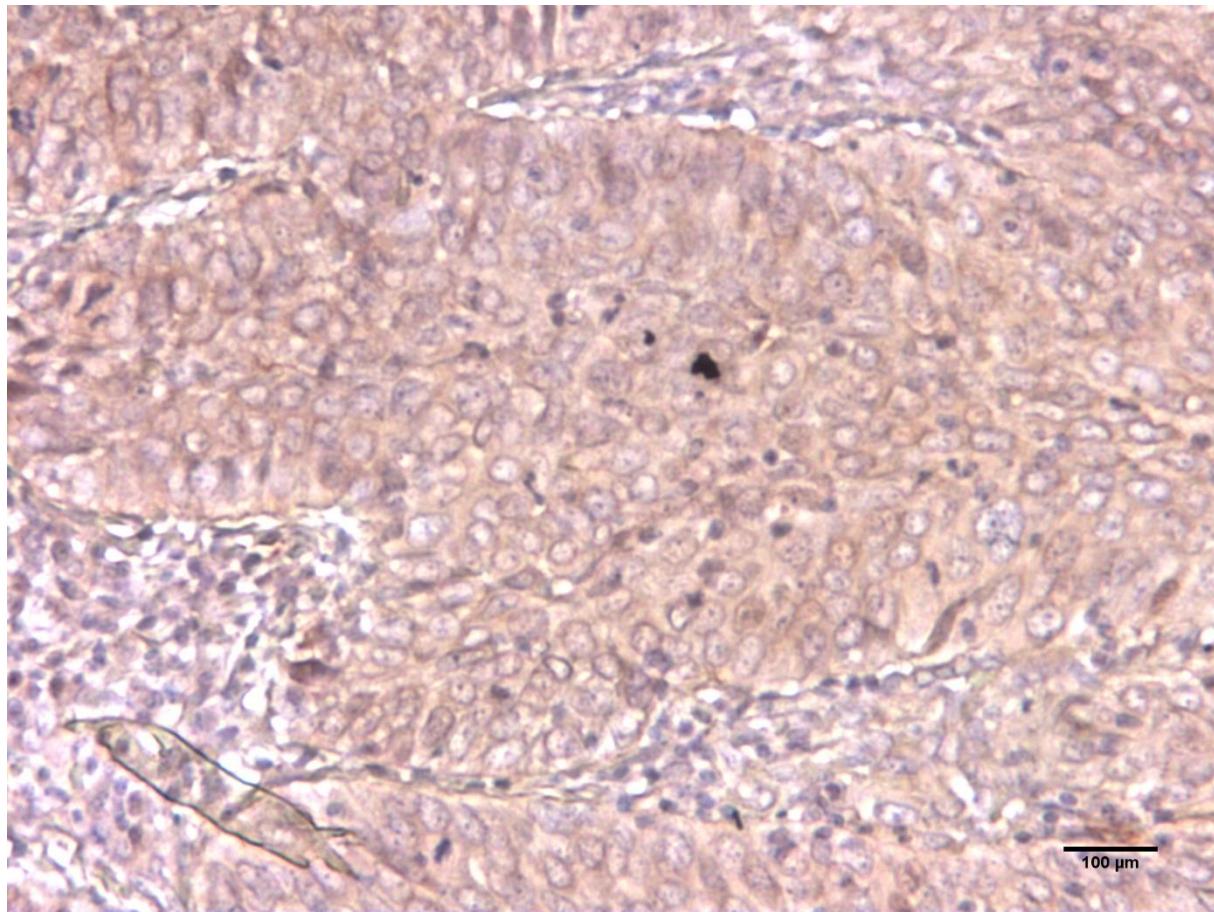
407 Zellen → 75,51 Prozent

126 Zellen → 23,38 Prozent

6 Zellen → 1,1 Prozent

0 Zellen → 0 Prozent

#### 4. Ergebnisse

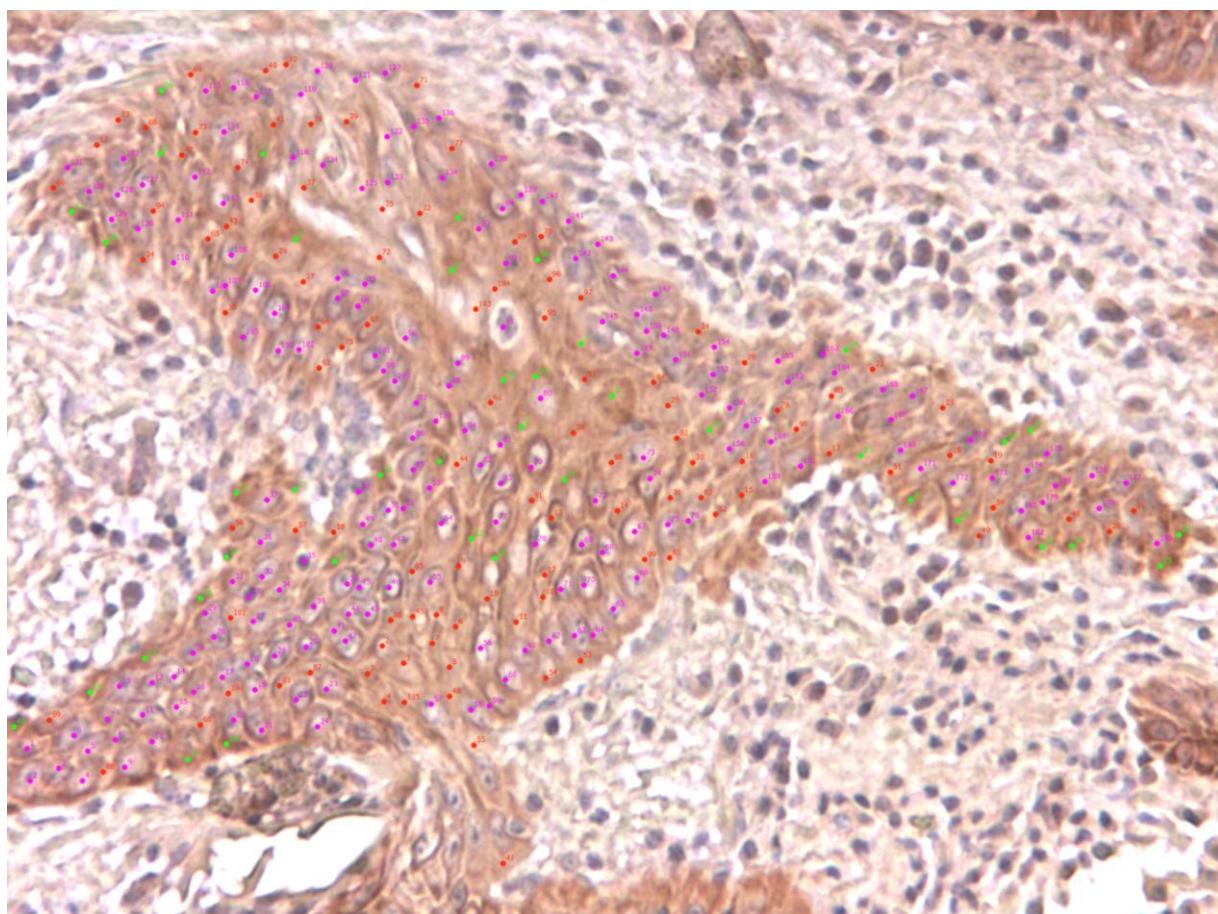
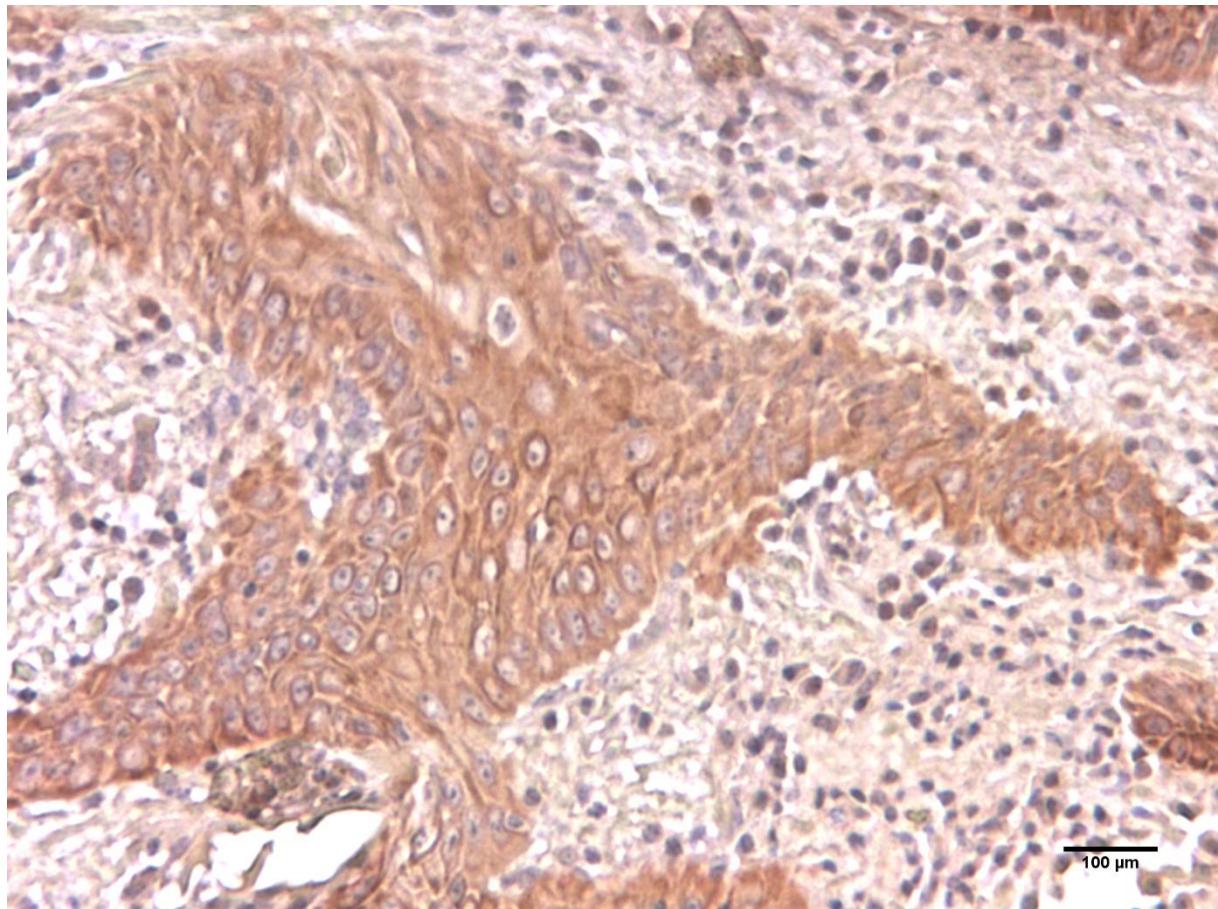


#### 4. Ergebnisse

474 Zellen gesamt

- = nicht gefärbt      356 Zellen      75,11 Prozent
- = leicht gefärbt      118 Zellen      24,89 Prozent
- = mäßig gefärbt      0 Zellen      0,00 Prozent
- = stark gefärbt      0 Zellen      0,00 Prozent

## 4. Ergebnisse



## 4. Ergebnisse

328 Zellen gesamt

• = nicht gefärbt	183 Zellen	55,79 Prozent
• = leicht gefärbt	105 Zellen	32,01 Prozent
• = mäßig gefärbt	40 Zellen	12,20 Prozent
• = stark gefärbt	0 Zellen	0,00 Prozent

Mittel über alle drei Bilder

Stark gefärbte Zellen	0,00%
Mäßig gefärbte Zellen	4,44%
Leicht gefärbte Zellen	26,76%
Nicht gefärbte Zellen	68,80%

Abbildung 26-31: Tumor mit wenig IRF1-Expression

Beispiel für eine jeweils dreiteilige Bildserie von Tumorgewebe mit geringer IRF1-Expression und IRS-Wert von 0 in ursprünglich 20-facher Vergrößerung.

Die Prozentsätze der Gruppen wurden anschließend über alle drei Bilder gemittelt. Die Gruppe mit dem höchsten prozentualen Wert der drei Bilder wurde mit ihrem je nach Anteil der insgesamt positiv dargestellten Zellen mit der Größe 0 bis 4 multipliziert. Dabei ergab sich über die 85 eingeschlossenen Patienten folgende Tabelle.

Tabelle 9: Erstellung des IRS nach Remmele und Stegner

		Mittelwert der Färbeintensität aller drei Bilder				insgesamt positive Zellen	IRS
		stark	mäßig	leicht	nicht		
Patient 1		9,35%	45,35%	25,02%	20,29%		79,71% 6
Patient 2		0,40%	3,70%	19,12%	76,78%		23,22% 0
Patient 3		14,71%	60,45%	24,83%	0,00%		100,00% 8
Patient 4		0,00%	16,45%	18,12%	65,43%		34,57% 0
Patient 5		2,08%	11,46%	41,60%	44,86%		55,14% 0
Patient 6		3,42%	13,27%	32,02%	51,30%		48,70% 0
Patient 7		3,28%	26,45%	63,55%	6,72%		93,28% 4
Patient 8		0,39%	16,17%	39,29%	44,15%		55,85% 0
Patient 9		31,14%	42,80%	19,78%	15,05%		93,72% 8
Patient 10		0,00%	8,61%	16,99%	74,40%		25,60% 0
Patient 11		3,16%	43,26%	35,71%	17,87%		82,13% 8
Patient 12		6,02%	26,39%	43,78%	23,81%		76,19% 3
Patient 13		37,11%	44,68%	13,83%	4,37%		95,63% 8
Patient 14		18,11%	53,72%	16,00%	12,17%		87,83% 8
Patient 15		24,85%	41,49%	14,83%	18,83%		81,17% 8
Patient 16		8,48%	35,64%	46,59%	9,29%		90,71% 4
Patient 17		5,01%	36,68%	37,42%	20,89%		79,11% 3
Patient 18		1,14%	17,74%	40,62%	40,50%		59,50% 3
Patient 19		2,37%	33,50%	44,06%	15,05%		79,93% 3
Patient 20		2,59%	37,57%	31,46%	28,38%		71,62% 6

#### 4. Ergebnisse

Patient 21		2,20%	24,37%	64,33%	9,10%		90,90%	4
Patient 22		3,34%	16,22%	42,16%	38,28%		61,72%	3
Patient 23		3,28%	26,56%	53,71%	16,45%		83,55%	4
Patient 24		5,78%	40,77%	44,99%	8,46%		91,54%	4
Patient 25		6,23%	38,93%	39,04%	15,42%		84,20%	4
Patient 26		19,82%	42,06%	28,46%	9,67%		90,33%	8
Patient 27		1,54%	11,32%	29,08%	58,06%		41,94%	0
Patient 28		1,59%	28,52%	31,22%	38,66%		61,34%	0
Patient 29		1,38%	28,21%	43,04%	27,37%		72,63%	3
Patient 30		2,15%	24,99%	49,02%	23,85%		76,15%	3
Patient 31		1,95%	34,67%	37,53%	25,82%		74,15%	3
Patient 32		10,59%	21,19%	28,41%	39,82%		60,18%	0
Patient 33		3,93%	45,43%	29,55%	21,08%		78,92%	6
Patient 34		0,87%	26,02%	59,06%	14,05%		85,95%	4
Patient 35		8,50%	32,71%	44,01%	19,44%		85,22%	4
Patient 36		4,30%	53,37%	31,11%	11,22%		88,78%	8
Patient 37		0,77%	19,62%	60,47%	19,14%		80,86%	4
Patient 38		0,23%	49,52%	43,97%	6,28%		93,72%	8
Patient 39		0,00%	15,57%	50,58%	33,85%		66,15%	3
Patient 40		2,39%	38,37%	49,88%	9,36%		90,64%	4
Patient 41		4,09%	32,94%	23,12%	39,86%		60,14%	0
Patient 42		2,24%	57,20%	29,07%	11,49%		88,51%	8
Patient 43		6,07%	35,75%	35,59%	24,19%		77,42%	6
Patient 44		0,67%	10,97%	25,17%	62,91%		36,81%	0
Patient 45		1,99%	11,59%	35,36%	51,19%		48,94%	0
Patient 46		4,39%	37,68%	27,74%	30,20%		69,80%	6
Patient 47		1,92%	24,98%	51,99%	21,11%		78,89%	3
Patient 48		0,00%	0,40%	40,57%	59,03%		40,97%	0
Patient 49		8,71%	45,88%	31,90%	13,51%		86,49%	8
Patient 50		7,42%	37,83%	34,96%	19,79%		80,21%	8
Patient 51		0,43%	14,71%	37,28%	47,59%		52,41%	0
Patient 52		1,01%	19,08%	51,34%	28,57%		71,43%	3
Patient 53		0,00%	7,07%	45,25%	47,68%		52,32%	0
Patient 54		1,83%	19,88%	34,53%	43,76%		56,24%	0
Patient 55		0,66%	12,50%	44,76%	42,09%		57,91%	3
Patient 56		0,66%	8,25%	31,20%	59,89%		40,11%	0
Patient 57		2,93%	15,61%	37,19%	44,27%		55,73%	0
Patient 58		1,76%	16,90%	28,30%	53,04%		46,96%	0
Patient 59		0,00%	0,00%	20,70%	79,30%		20,70%	0
Patient 60		0,17%	16,33%	47,94%	35,57%		64,43%	3
Patient 61		33,04%	33,21%	17,17%	16,57%		83,43%	8
Patient 62		9,69%	54,22%	30,97%	5,12%		94,88%	8
Patient 63		4,18%	19,35%	37,16%	39,31%		60,69%	0
Patient 64		9,82%	46,22%	23,30%	20,66%		79,34%	6
Patient 65		7,68%	41,07%	23,05%	28,20%		71,80%	6
Patient 66		6,87%	67,84%	20,31%	4,98%		95,02%	8
Patient 67		0,00%	4,44%	26,76%	68,80%		31,20%	0

#### 4. Ergebnisse

Patient 68	3,46%	44,37%	29,95%	22,22%		77,78%	6
Patient 69	1,31%	20,15%	48,92%	29,82%		70,38%	3
Patient 70	18,30%	33,08%	28,33%	20,28%		79,72%	6
Patient 71	3,44%	38,92%	36,64%	20,89%		79,01%	6
Patient 72	17,51%	44,49%	22,85%	15,15%		84,85%	8
Patient 73	0,05%	17,35%	37,22%	45,38%		54,62%	0
Patient 74	8,06%	32,37%	35,99%	23,59%		76,41%	3
Patient 75	2,91%	22,95%	52,35%	21,80%		78,20%	3
Patient 76	8,81%	29,30%	36,95%	24,94%		75,06%	3
Patient 77	0,88%	24,45%	55,52%	19,14%		80,86%	4
Patient 78	7,42%	55,11%	29,83%	7,57%		92,36%	8
Patient 79	5,06%	23,65%	34,20%	37,10%		62,90%	0
Patient 80	5,45%	30,23%	43,21%	21,11%		78,89%	3
Patient 81	0,88%	12,52%	36,26%	50,34%		49,66%	0
Patient 82	0,00%	0,27%	15,31%	80,96%		15,59%	0
Patient 83	3,89%	26,37%	25,14%	44,60%		55,40%	0
Patient 84	3,21%	27,79%	26,18%	42,82%		57,18%	0
Patient 85	6,28%	23,75%	29,24%	40,73%		59,27%	0

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv lag mit 29 Fällen am häufigsten der IRS-Werte 0 vor, gefolgt von 3 mit 18 Fällen und 8 mit 17 Fällen. 4 und 6 kam beziehungsweise zehn Mal vor. Die möglichen Werte 1, 2, 9 oder 12 wurden bei keinem Fall erreicht.

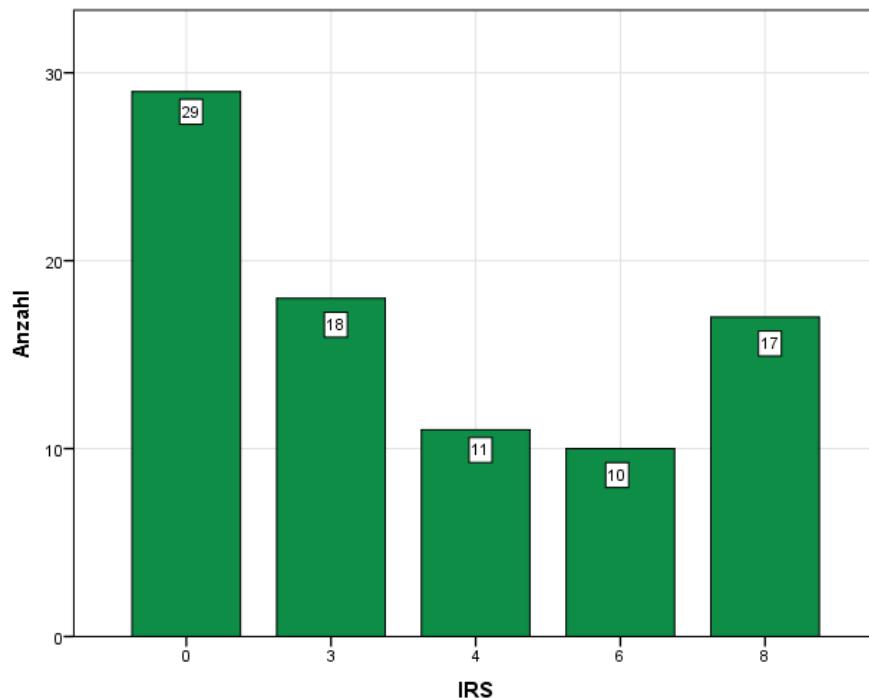
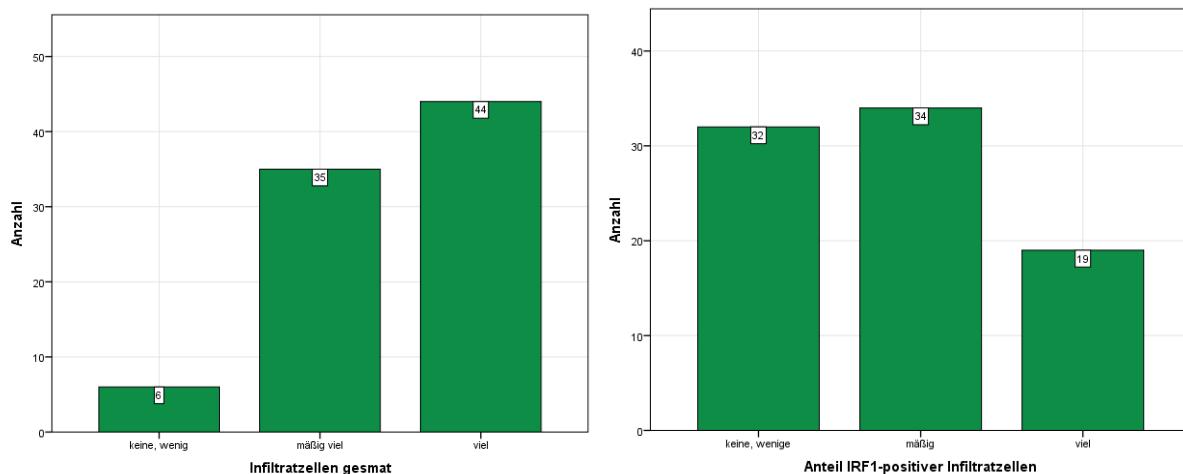


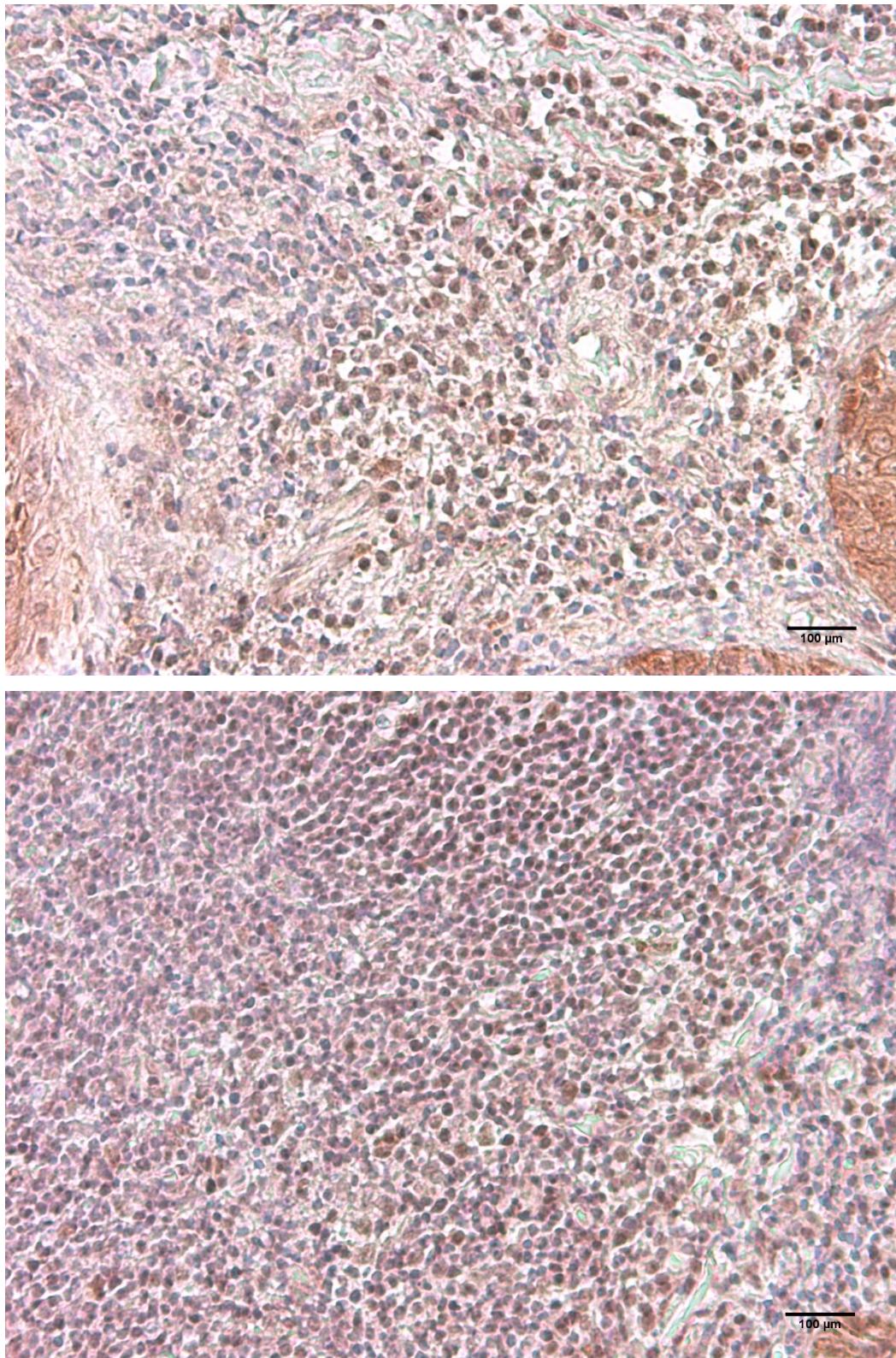
Abbildung 32: Auswertung des IRS nach Remmele und Stegner

### 4.2.2 Analyse der Infiltratzellen

Um die Infiltratzellen beurteilen zu können wurden von jeder IRF1-Färbung zwei Bilder in einer 20-fachen Vergrößerung angefertigt. Anhand dieser Fotos wurde die Anzahl der tumorinfiltrierenden Immunzellen in einer semiquantitativen Skala von eins bis drei beurteilt. Eins steht für keine oder wenig Infiltratzellen, zwei für mäßig viele Infiltratzellen und drei für viele Infiltratzellen. In einem zweiten Schritt wurden die Infiltratzellen hinsichtlich ihrer Anfärbbarkeit auf IRF1 beurteilt. Dabei war sowohl das Verhältnis von IRF1-positiven zu IRF1-negativen Infiltratzellen als auch die Farbintensität der IRF1-positiven Zellen ausschlaggebend. Auch hierfür wurde ein Skalenniveau von eins bis drei gewählt. Bei Schnitten, die mit einer eins beurteilt wurden, waren keine oder nur wenige der Infiltratzellen IRF1-positiv. Mit zwei wurden Bilder bewertet, bei denen der Anteil und die Intensität der IRF1-positiven Infiltratzellen mäßig hoch war und bei drei war der Großteil der vorhandenen Infiltratzellen stark IRF1-positiv.



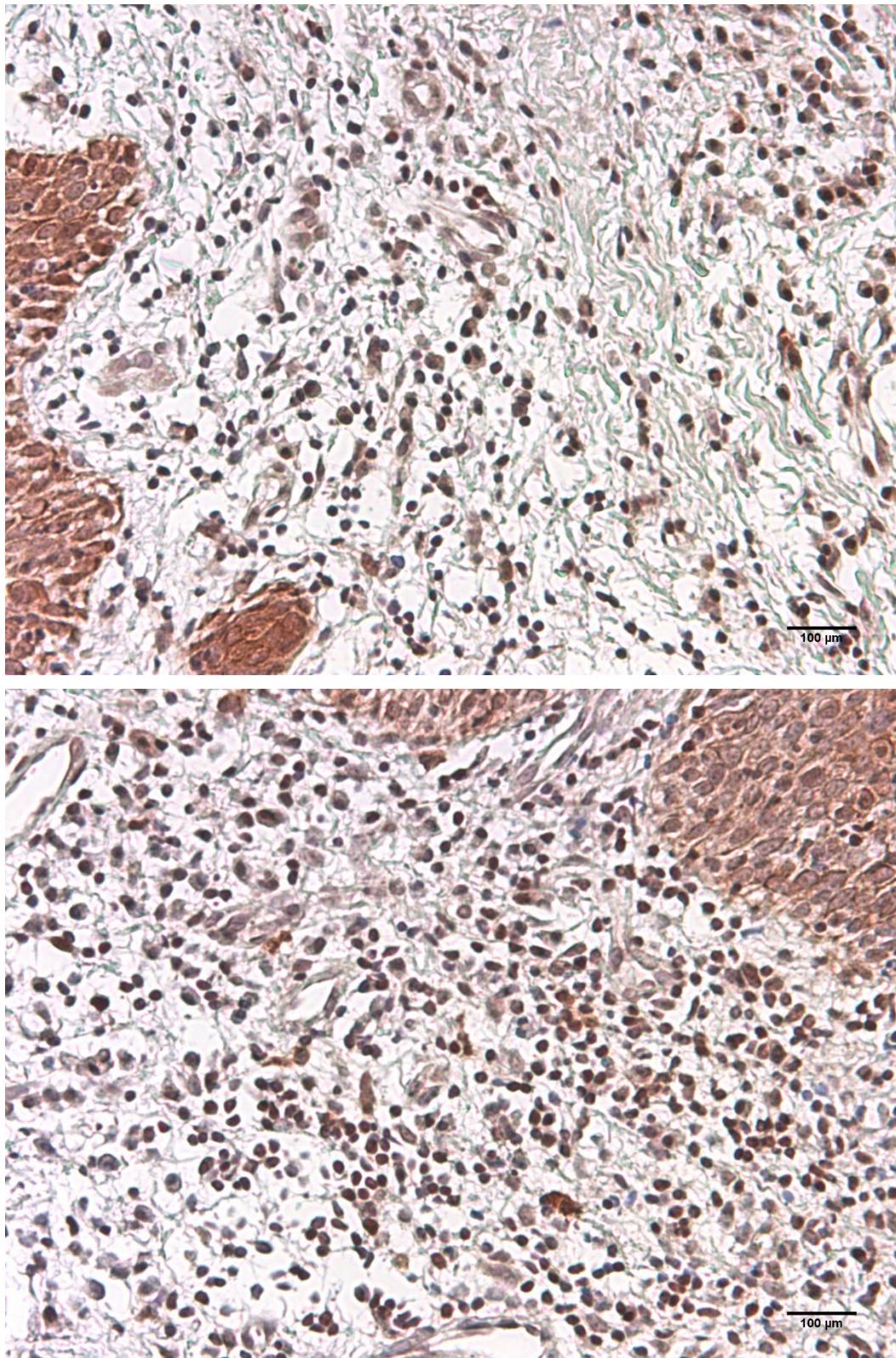
#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 35-36: Viel Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit vielen Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

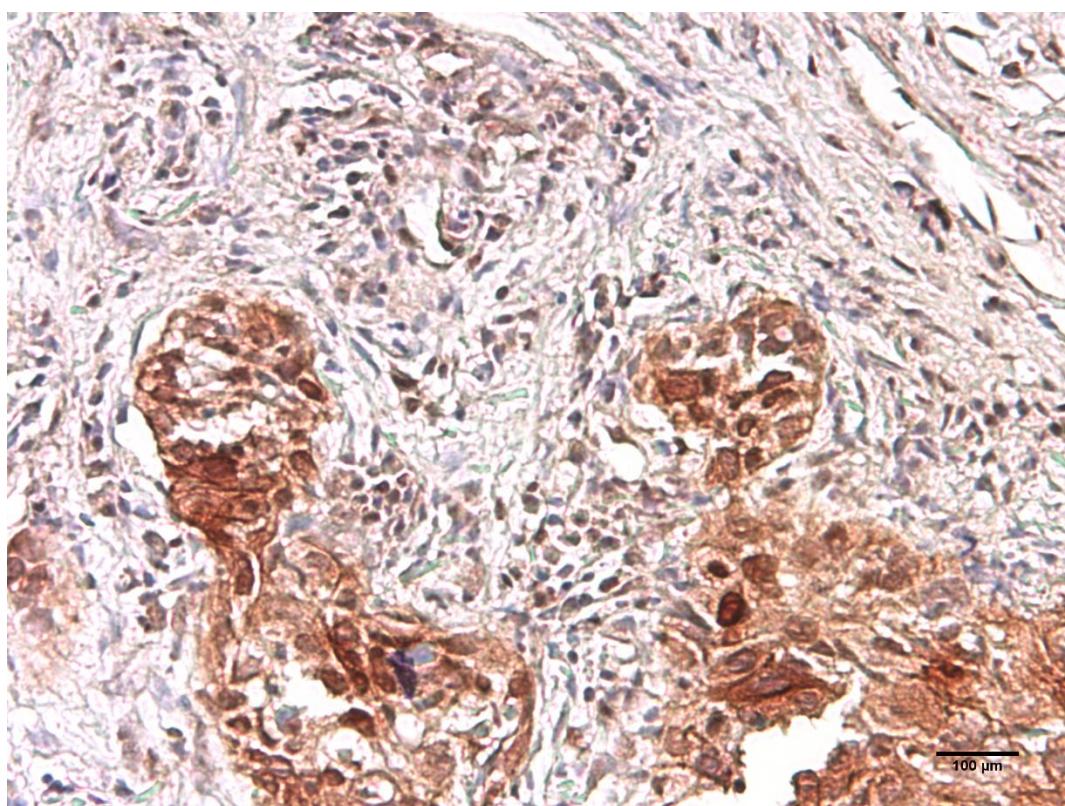
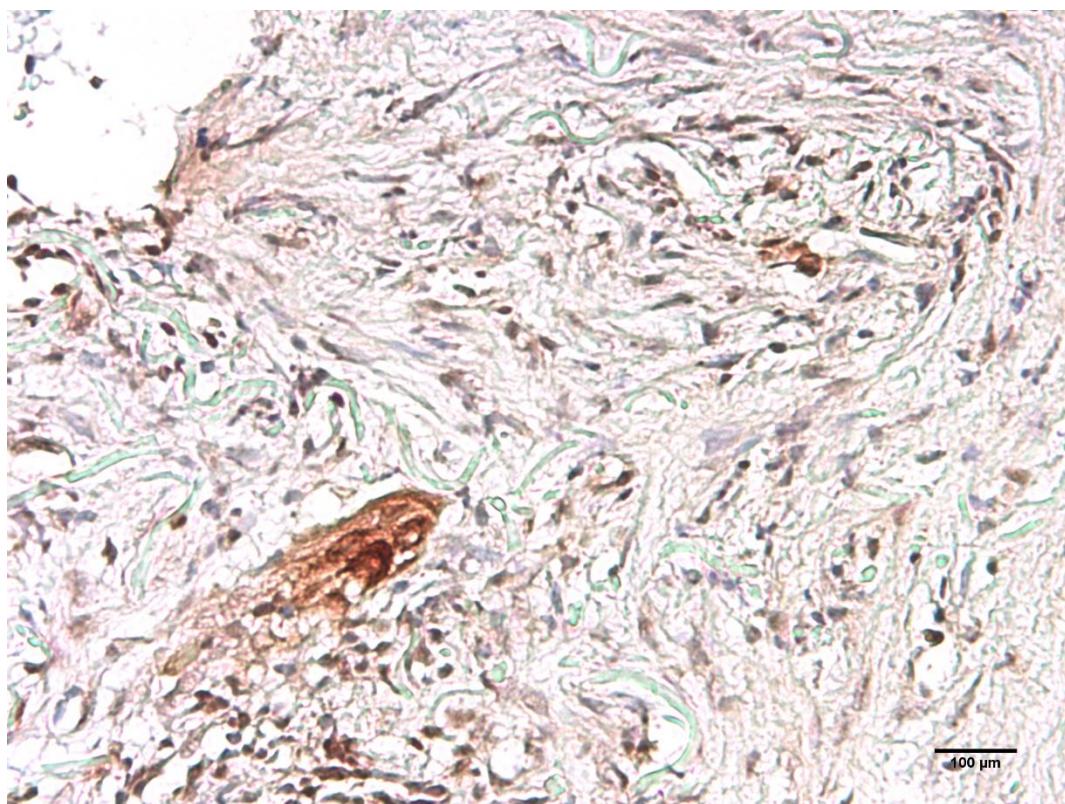
#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 37-38: Mäßig viel Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit mäßig vielen Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

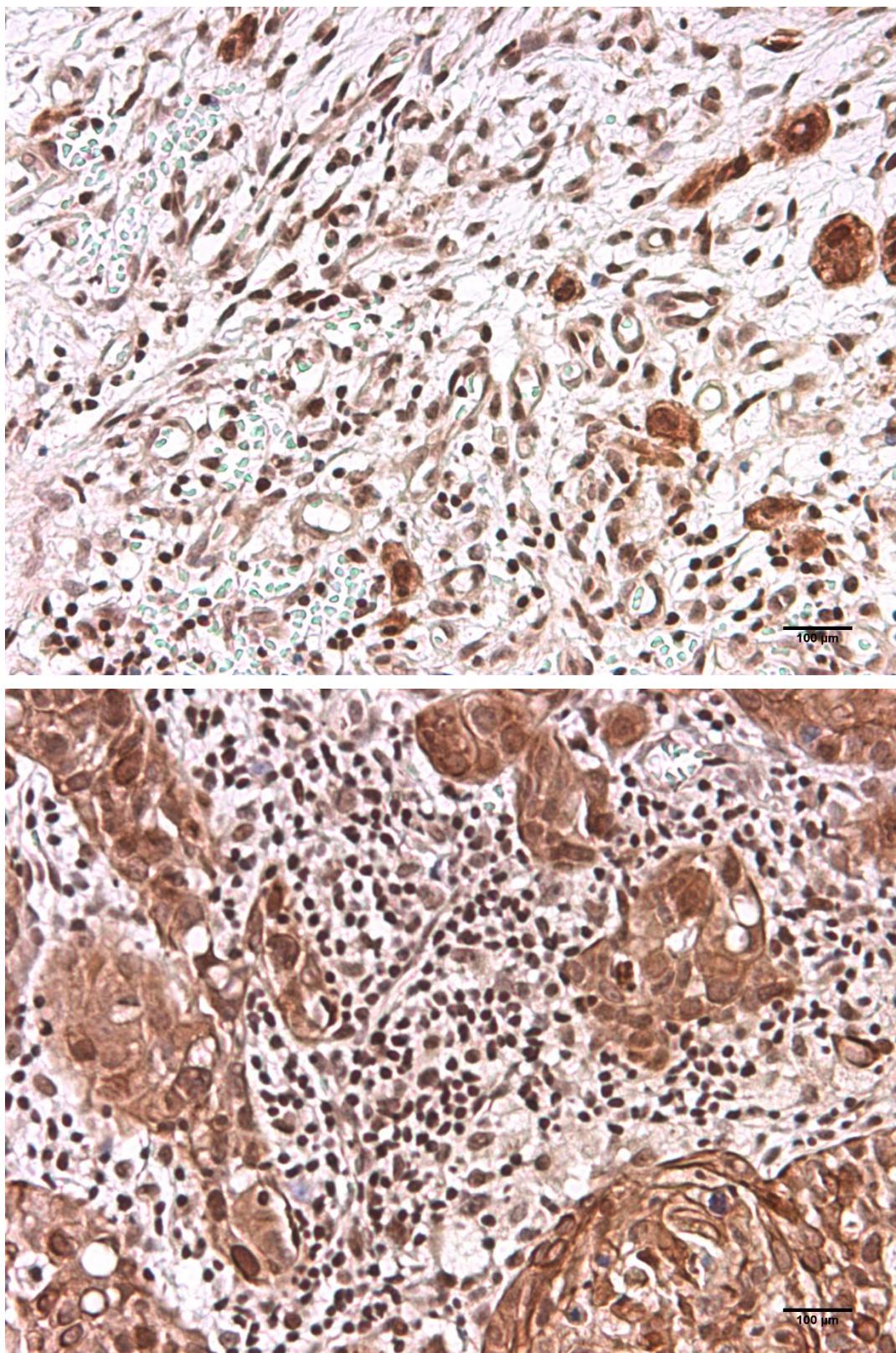
#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 39-40: Wenig Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit wenig Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

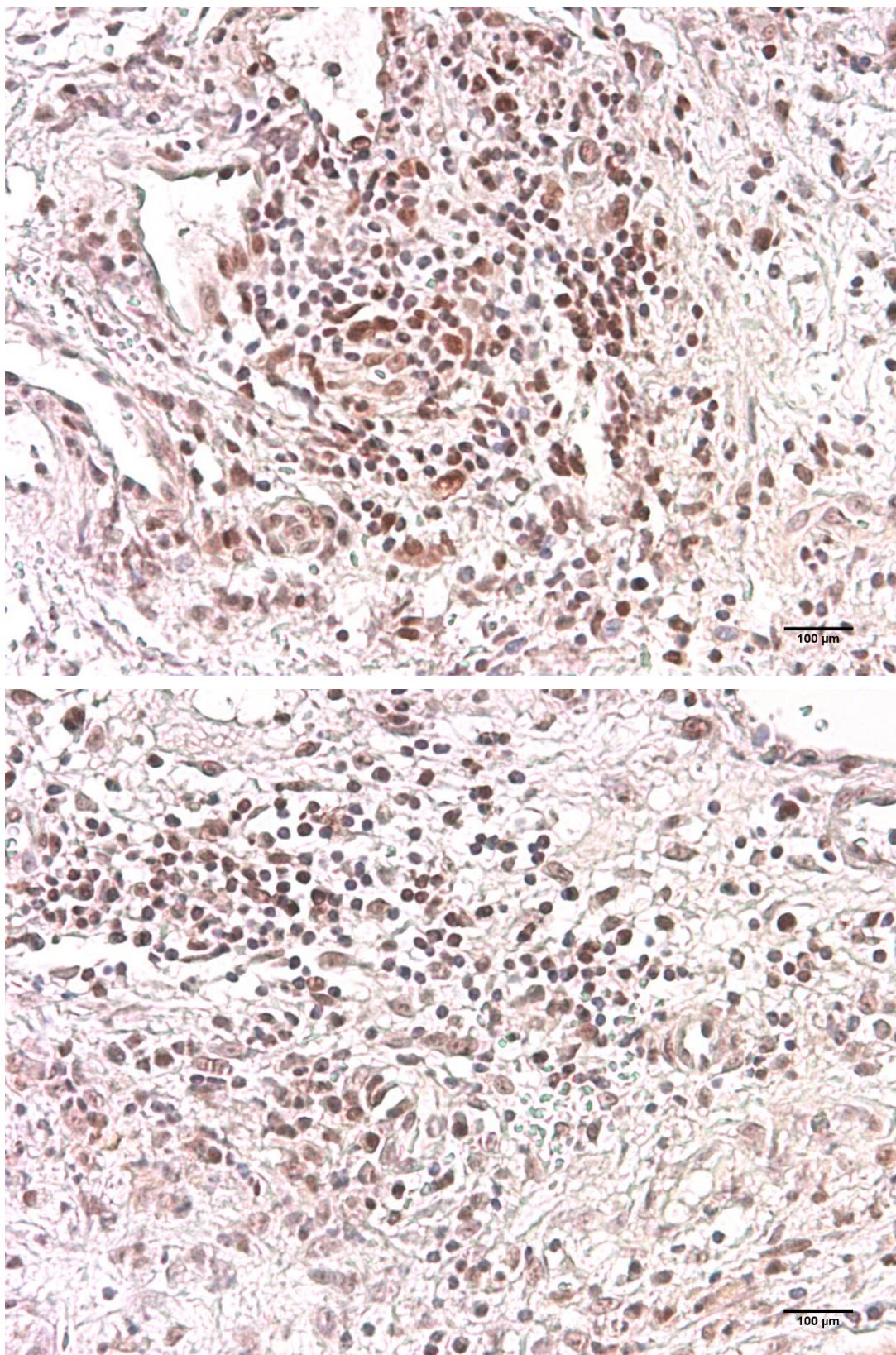
#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 41-42: Starke IRF1-Positivität der Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit starker IRF1-Positivität der Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

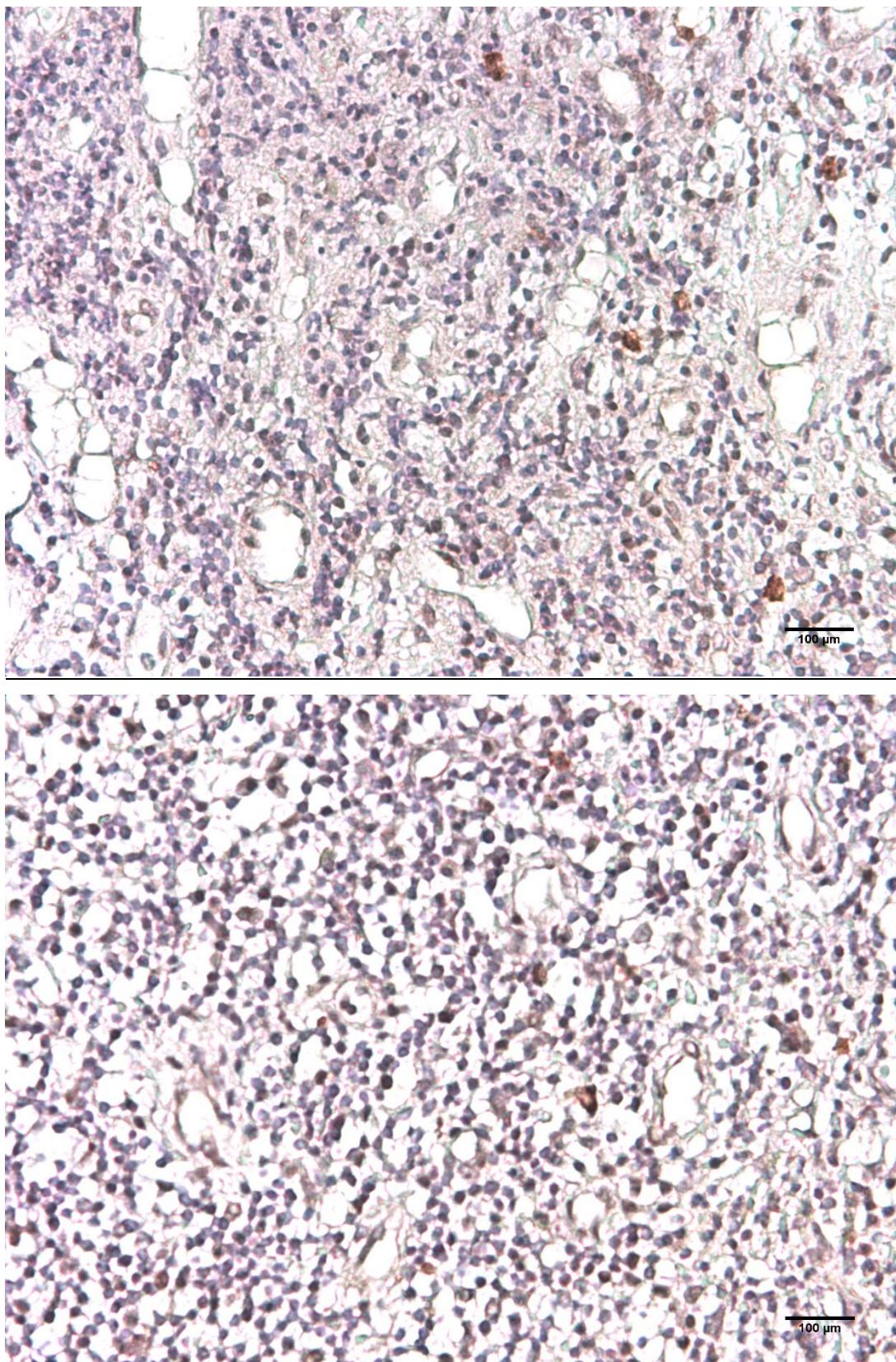
#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 43-44: Mäßig starke IRF1-Positivität der Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit mäßig starker IRF1-Positivität der Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

#### 4. Ergebnisse



Abbildungen 45-46: Geringe IRF1-Positivität der Infiltratzellen

Beispiel der jeweils zweiteiligen Bildserien von Tumorschnitten mit geringer IRF1-Positivität der Infiltratzellen in ursprünglich 20-facher Vergrößerung

### 4.3 Statistische Ergebnisse

#### 4.3.1 Zusammenhang von IRF1-Expression der Tumorzellen, des HPV-Status und der Infiltratzellen

##### Zusammenhang von IRF1-Expression der Tumorzellen und dem HPV-Status

Die Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der IRF1-Expression, welche anhand des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner in einem ordinalen Skalenniveau dargestellt wurde und des HPV-Status erfolgt mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson. Da in diesen Test nur Patienten mit eindeutigem HPV-Status eingeschlossen werden konnten, mussten acht Patienten, bei welchen der HPV-Status nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ausgeschlossen werden. Die Fallzahl lag so schließlich noch bei 77 Patienten. Bei einer asymptotischen Signifikanz von 0,205 des Chi-Quadrat-Tests kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen IRS-Wert der IRF1-Expression der Tumorzellen und dem HPV-Status angenommen werden.

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der prätherapeutischen IRF1-Expression des Tumorgewebes und des HPV-Status

##### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,927 <sup>a</sup>	4	,205
Likelihood-Quotient	5,971	4	,201
Zusammenhang linear-mit-linear	3,231	1	,072
Anzahl der gültigen Fälle	77		

a. 4 Zellen (40,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,10.

##### Zusammenhang von Infiltratzellanzahl und deren IRF1-Expression und des HPV-Status

Auch die Überprüfung dieser Zusammenhänge erfolgte jeweils mit einem Chi-Quadrat-Test nach Pearson mit den eingeschlossenen 77 Patienten, welche einen eindeutigen HPV-Status aufwiesen. Die Anzahl der Infiltratzellen wurde hierbei auf einer ordinalen Skala von eins bis drei für wenig, mäßig und viele Infiltratzellen, angegeben. Auch hier konnte mit einer asymptotischen Signifikanz von 0,243 kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Die IRF1-Expression der Infiltratzellen wurde ebenfalls auf einer ordinalen Skala von eins bis drei für wenig, mäßig und viel IRF1-Expression kategorisiert. Der Chi-Quadrat-Test auf einen Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der IRF1-Expression der Infiltratzellen zeigte eine asymptotische Signifikanz von 0,224, so dass auch hier von keinem statistisch signifikanten Zusammenhang ausgegangen werden kann.

## 4. Ergebnisse

Tabelle 11: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der Anzahl der prätherapeutischen Infiltratzellen und des HPV-Status

<b>Chi-Quadrat-Tests</b>			Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
	Wert	df	
Chi-Quadrat nach Pearson	2,829 <sup>a</sup>	2	,243
Likelihood-Quotient	4,145	2	,126
Zusammenhang linear-mit-linear	,048	1	,826
Anzahl der gültigen Fälle	77		

a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,40.

Tabelle 12: Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit zwischen der IRF1-Positivität der Infiltratzellen und des HPV-Status

<b>Chi-Quadrat-Tests</b>			Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
	Wert	df	
Chi-Quadrat nach Pearson	2,994 <sup>a</sup>	2	,224
Likelihood-Quotient	3,641	2	,162
Zusammenhang linear-mit-linear	1,372	1	,241
Anzahl der gültigen Fälle	77		

a. 1 Zellen (16,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,51.

### 4.3.2 Zusammenhang zwischen IRS-Wert und Ansprechen auf die primäre Radiochemotherapie

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf eine primäre Radiochemotherapie und der Expression von IRF1 der Tumorzellen zu detektieren, wurde das Regressionsanalyseverfahren verwendet. Da die Fallzahl der Patienten mit Teilremission und Tumorprogression beziehungsweise konstanten Tumorvolumen nach der Radiochemotherapie mit jeweils 17 Fällen zu klein für eine multinominale logistische Regression waren, wurden diese beiden Gruppen unter dem Namen „keine Vollremission“ neu zusammengefasst und anschließend mit den Patienten, deren Tumor nach der primären Radiochemotherapie eine Vollremission aufwies, bezüglich deren IRS-Werte verglichen. Angewandt wurde hierbei das binär logistische Regressionsanalyseverfahren mit Hilfe eines Wald-Tests. Als abhängige

## 4. Ergebnisse

Variable galt das Ansprechen auf die Chemotherapie mit den beiden Optionen „Vollremission“ oder keine „Vollremission“. Die unabhängige Variable, in SPSS Faktor genannt, stellte der IRS-Scorewert der IRF1-Expression der Tumorzellen dar. Als Referenzkategorie der unabhängigen Variable wurde der IRS-Wert von null gewählt. Die Odds Ratio wurde aus dem Regressionskoeffizienten B der unabhängigen Variablen berechnet und als Exp(B) im Modell mit dazugehörigen 95% Konfidenzintervall ausgegeben.

Tabelle 13: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumory Vollremission nach der primären Radiochemotherapie

<b>Variablen in der Gleichung</b>								
Schritt	Regression skoeffizient					95% Konfidenzintervall für EXP(B)		
		B	Standardfe hler	Wald	df	Sig.	Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt	IRS			6,902	4	,141		
1 <sup>a</sup>	IRS 3	1,128	,632	3,186	1	,074	3,091	,895 10,672
	IRS 4	,995	,737	1,824	1	,177	2,705	,638 11,458
	IRS 6	1,283	,791	2,628	1	,105	3,606	,765 17,001
	IRS 8	1,534	,695	4,871	1	,027	4,636	1,187 18,105
	Konstant e	-,435	,387	1,266	1	,261	,647	

#### 4. Ergebnisse

Patienten deren Tumor einen IRS-Wert von acht aufwies hatten mit einer 4,636 erhöhten Wahrscheinlichkeit eine statisch signifikant bessere Chance auf eine Vollremission nach der primären Radiochemotherapie als Patienten mit einem Tumor, deren IRS-Wert null betrug. Auch bei einem IRS-Wert von drei, vier oder sechs war die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission höher als bei einem IRS Wert von null. Jedoch waren diese Zusammenhänge statistisch nicht im fünf-Prozent-Niveau signifikant.

Verglichen mit Patienten, deren Tumor einen IRS-Wert von 0 aufwies, hatten Patienten mit einem IRS-Wert von drei eine 3,091 höhere Wahrscheinlichkeit, dass ihr Tumor mit einer Vollremission auf die Radiochemotherapie reagierte. Bei Patienten mit einem IRS-Wert von vier lag die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission 2,705-fach höher und bei einem IRS-Wert von sechs sogar 3,606-fach höher als bei den IRS-0-Tumoren. Obwohl hier schon eine klare Tendenz zu besserem Ansprechen der primären Radiochemotherapie bei höher werdenden IRS-Werten zu vermerken ist, erreichten nur IRS-Werte von acht mit einer 4,636-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission ein statistisch signifikantes besseres Ansprechen auf die primäre RCT im fünf-prozentigem Signifikanzniveau. Das 95% Konfidenzintervall für die Odds ratio (3,606) lag hierbei zwischen 1,187 und 18,105. Der P-Wert betrug 0,027.

Um den Einfluss möglicher Kovariablen zu veranschaulichen wurde anschließend die binär logistische Regressionanalyse nach Wald zwischen dem Ansprechen auf die primäre Radiochemotherapie als abhängige Variable und dem IRS-Scorewert als unabhängige Variable, wieder mit dem IRS-Wert von null als Referenzkategorie, jeweils mit den Kovariablen des Geschlechts, des Erkrankungsalters und des HPV-Status durchgeführt.

Bei Hinzunahme des HPV-Status als Kovariabel wurde die Regressionsanalyse nach Wald nur mit den 75 Fällen durchgeführt, bei denen ein eindeutiger HPV-Status erhoben werden konnte. Patienten, bei denen der HPV-Status nicht sicher bestimmbar war, wurden in diesen Test nicht miteinbezogen. Als HPV-Referenzkategorie wurde der HPV-negative Status gewählt. Auffällig war, dass die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der Radiochemotherapie bei allen IRS-Werten höher lag, wenn gleichzeitig ein HPV-positiver Status vorlag. Gegenüber einem IRS-Wert von null errechneten wir statistisch signifikant höhere Wahrscheinlichkeiten auf eine Vollremission bei einem IRS Wert von 3 (Odds ratio = 3,834; p-Wert = 0,045; 95% Konfidenzintervall = 1,028-14,299) und bei einem IRS-Wert von 8. Hier lag bei gleichzeitig positivem HPV-Status eine 7,308 höhere Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission vor als bei einem Tumor mit einem IRS-Wert von 0, wenn dieser keine HPV-Assoziation zeigte. Der P-

## 4. Ergebnisse

Wert lag mit 0,028 innerhalb des fünf-Prozent-Signifikanz-Niveau (Odds ratio = 7,308; 95% Konfidenzintervall = 1,243 – 42,969). Die Aufdehnung der 95% Konfidenzintervalle ist vermutlich mit der niedrigen Anzahl an HPV-positiven Fällen zu erklären.

Tabelle 14: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des HPV-Status als Kovariabel.

		Variablen in der Gleichung						95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
		Regressionsskoeffizient	Standardfehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt	IRS	B							
1 <sup>a</sup>	IRS			7,278	4	,122			
	IRS 3	1,344	,672	4,004	1	,045	3,834	1,028	14,299
	IRS 4	,995	,776	1,644	1	,200	2,706	,591	12,393
	IRS 6	1,344	,839	2,568	1	,109	3,834	,741	19,834
	IRS 8	1,989	,904	4,842	1	,028	7,308	1,243	42,969
	HPV_negativ	-,693	,625	1,230	1	,267	,500	,147	1,702
	Konstante	-,026	,533	,002	1	,962	,975		

Bei allen IRS-Werten war die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären Radiochemotherapie höher, wenn der Tumor HPV-assoziiert war. Bei einem HPV-positiven Tumor mit einem IRS-Wert von acht lag die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission 7,308 höher als bei einem Tumor mit einem IRS-Wert von null, wenn dieser nicht HPV-assoziiert war.

Da möglicherweise auch das Patientenalter einen Einfluss auf das Ansprechen auf die Radiochemotherapie hatte, wurde anschließend die binär logistische Regressionsanalyse mit dem Erkrankungsalter als Kovariabel durchgeführt. Dabei kam es jedoch nur zu geringfügigen Änderungen der Odds ratio und der p-Werte. Eine auf dem fünf-Prozent-Niveau signifikant statistische höhere Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären RCT gegenüber Patienten mit einem IRS-Wert von null hatten wiederum nur Patienten mit einem IRS-Wert von acht (Odds ratio: 4,927; p-Wert: 0,025; 95% Konfidenzintervall: 1,212-20,029). So konnte das Alter der behandelten Patienten als wesentlicher Einflussfaktor ausgeschlossen werden.

Tabelle 15: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des Patientenalters bei Erstdiagnose als Kovariabel

## Variablen in der Gleichung

#### 4. Ergebnisse

Schritt	IRS	Regression skoeffizient B						95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
			Standardfe hler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Unterer Wert	Oberer Wert
1 <sup>a</sup>	IRS 3	1,137	,633	3,220	1	,073	3,116	,900	10,784
	IRS 4	1,079	,771	1,959	1	,162	2,943	,649	13,340
	IRS 6	1,340	,807	2,758	1	,097	3,818	,785	18,559
	IRS 8	1,595	,716	4,967	1	,026	4,927	1,212	20,029
	Erkrankungsa lter	,012	,031	,146	1	,702	1,012	,953	1,074
	Konstante	-1,180	1,989	,352	1	,553	,307		

Das Erkrankungsalter als Kovariabel beeinflusste die statistische Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor mit einer Vollremission auf die primäre Radiochemotherapie reagierte, bei allen IRS-Werten nur geringfügig.

Auch der Einfluss des Geschlechts wurde als Einflussgröße auf das binär logistische Regressionsanalyseverfahren nach Wald geprüft. Das weibliche Geschlecht galt dabei als Referenzkategorie. Dabei fiel ins Auge, dass sich bei allen IRS-Werten die statistischen Wahrscheinlichkeiten auf eine Vollremission gegenüber den Patienten mit einem IRS-0-Tumor erhöhte, sobald von einem männlichen Patienten ausgegangen wurde. Männliche Patienten mit einem IRS-Wert von drei hatten eine 3,823-fach höhere Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären Radiochemotherapie als weibliche Patienten mit einem IRS-Wert von null. Mit einem p-Wert von 0,044 war dies statistisch im fünf-Prozent-Niveau signifikant (95% Konfidenzintervall 1,036 – 14,103). Ebenfalls signifikant höhere Chancen auf eine Vollremission hatten männliche Patienten mit einem IRS-Wert von sechs (Odds ratio = 5,263; p-Wert = 0,045; 95% Konfidenzintervall 1,037 – 26.707) und acht (Odds ratio = 6,401; p-Wert = 0,011; 95% Konfidenzintervall 1,519 – 26.973). Jedoch sollte hier beachtet werden, dass die Fallzahl der weiblichen Patienten mit 14 von 69, entsprechend der generellen Prävalenz der Kopf-Hals-Tumoren, recht gering war. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass das männliche Geschlecht möglicherweise mit anderen Einflussfaktoren, wie verstärktem Rauchverhalten und Alkoholkonsum assoziiert ist, die hier keine Berücksichtigung finden konnten.

Tabelle 16: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen dem IRS-Wert und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie unter Hinzunahme des Geschlechts als Kovariabel

#### Variablen in der Gleichung

#### 4. Ergebnisse

Schritt		Regression skoeffizient B	Standardfe hler	Wald	df	Sig.	95% Konfidenzintervall für EXP(B)		
							Unterer Wert	Oberer Wert	
Schritt	IRS			8,658	4	,070			
1 <sup>a</sup>	IRS 3	1,341	,666	4,055	1	,044	3,823	1,036	14,103
	IRS 4	1,186	,768	2,385	1	,122	3,276	,727	14,764
	IRS 6	1,661	,829	4,015	1	,045	5,263	1,037	26,707
	IRS 8	1,856	,734	6,399	1	,011	6,401	1,519	26,973
	Geschlecht( 1)	-1,248	,711	3,083	1	,079	,287	,071	1,156
	Konstante	,435	,635	,469	1	,493	1,545		

Die statistische Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der Radiochemotherapie war bei allen IRS-Werten gegenüber den Tumoren mit einem IRS-Wert von null erhöht, wenn von einem männlichen Patienten ausgegangen wird. Statistisch signifikant höhere Wahrscheinlichkeiten ergaben sich bei männlichen Patienten mit den IRS-Werten von drei, sechs und acht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tumore mit mehr IRF1-Expression (dargestellt in höheren IRS-Werten) eher dazu neigen, auf eine primäre Radiochemotherapie mit einer Vollremission des Tumorgewebes zu reagieren als Tumore mit wenig IRF1-Expression. Vor allem bei Tumoren, deren IRF1-Expression mit einem IRS-Wert von acht angegeben wurde war die statistische Wahrscheinlichkeit einer Vollremission gegenüber Tumoren mit einem IRS-Wert von null signifikant höher. Bei HPV-positiven Status oder männlichen Geschlecht verstärkt sich dieser Effekt noch. Das Erkrankungsalter hatte hingegen wenig Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Vollremission.

#### 4.3.3 Zusammenhang zwischen Anzahl der Infiltratzellen und Ansprechen auf die primäre Radiochemotherapie

Als nächster Schritt wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Infiltratzellen und dem Ansprechen auf eine primäre Radiochemotherapie besteht. Die Radiochemosensibilität wurde erneut mit den zwei Gruppen „Vollremission“ oder „keine Vollremission“ nach der RCT beschrieben. Für die Anzahl der Infiltratzellen wurde ein dreistufiges ordinales Skalenniveau mit den Gruppen „wenig“, „mäßig viele“ und „viele“ Infiltratzellen gewählt. Angewandt wurde abermals das binär logistische Regressionsanalyseverfahren mit Hilfe eines Wald-Tests. Als abhängige Variabel galt das

## 4. Ergebnisse

Ansprechen auf die Radiochemotherapie. Für die unabhängige Variablen wurde die Anzahl der Infiltratzellen mit „wenig Infiltratzellen“ als Referenzkategorie gewählt. Die Odds Ratio wurde aus dem Regressionskoeffizienten B der unabhängigen Variablen berechnet und als Exp(B) im Modell mit dazugehörigen 95% Konfidenzintervall ausgegeben.

Die Wahrscheinlichkeit für eine Vollremission nach einer primären Radiochemotherapie bei Patienten, welche vor der Therapie mäßig viele Infiltratzellen um das Tumorgewebe aufwiesen, lag 1,615-fach höher als bei Patienten mit wenig Infiltratzellen. Bei Patienten mit vielen Infiltratzellen lag die Aussicht auf eine Vollremission noch 1,389-fach höher als bei wenig Infiltratzellen. Beide Werte lagen jedoch weit außerhalb des fünf-prozentigen Signifikanzniveaus, so dass davon ausgegangen werden musste, dass kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Infiltratzellen und der Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine primäre Radiochemotherapie besteht.

Tabelle 17: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen der Anzahl der Infiltratzellen und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie

		Variablen in der Gleichung						
	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
Schritt	Infiltratzellen						Unterer Wert	Oberer Wert
1 <sup>a</sup>	gesamt		,319	2	,852			
	Mäßig viel	,480	,889	,291	1	,590	1,615	,283 9,235
	viel	,329	,873	,142	1	,707	1,389	,251 7,688
	Konstante	,000	,816	,000	1	1,000	1,000	

Bei nur leicht erhöhter Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission bei mäßig vielen oder vielen Infiltratzellen gegenüber wenig Infiltratzellen und p-Werten, welche weit außerhalb des gewählten Signifikanzniveaus lagen, muss davon ausgegangen werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Infiltratzellen und der Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine primäre Radiochemotherapie besteht.

### 4.3.4 Zusammenhang zwischen IRF1-Positivität der Infiltratzellen und Ansprechen auf die primäre Radiochemotherapie

Anschließend wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der IRF1-Positivität der Infiltratzellen und dem Ansprechen auf eine primäre Radiochemotherapie besteht. Um die IRF1-Positivität der Infiltratzellen beschreiben zu können, wurde das Verhältnis der

## 4. Ergebnisse

Infiltratzellen, die sich mit Anti-IRF1 anfärben ließen, mit IRF1-negativen Infiltratzellen betrachtet. Außerdem floss die Farbintensität der Antikörperfärbung bei den Infiltratzellen mit in die Betrachtung ein, so dass insgesamt ein dreistufiges ordinales Skalenniveau mit den Gruppen „wenig“, „mäßig viel“ und „viel“ IRF1-Positivität bei den Infiltratzellen gewählt wurde. Angewandt wurde wiederum das binär logistische Regressionsanalyseverfahren mit Hilfe des Wald-Tests. Als abhängige Variabel galt das Ansprechen auf die Chemotherapie mit den Gruppen „Vollremission“ und „keine Vollremission“. Für die unabhängige Variabel wurde die Anzahl der Infiltratzellen mit „wenig Infiltratzellen“ als Referenzkategorie gewählt. Die Odds Ratio wurde aus dem Regressionskoeffizienten B der unabhängigen Variablen berechnet und als Exp(B) im Modell mit dazugehörigen 95% Konfidenzintervall ausgegeben.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tumor mit einer Vollremission auf eine primäre Radiochemotherapie ansprach, war bei Patienten, deren Infiltratzellen um das Tumorgewebe prätherapeutisch eine mäßig hohe IRF1-Positivität aufwiesen 1,618-fach höher als bei Patienten mit prätherapeutisch geringer IRF1-Positivität der Infiltratzellen. Statistisch signifikant war diese erhöhte Chemostrahlensensibilität mit einem p-Wert von 0,34 und einer 95% Konfidenzintervall bei einem fünf-prozentigem Signifikanzniveau jedoch nicht. Bei Tumoren mit hoher IRF1-Positivität der Infiltratzellen war der Effekt noch geringer. Hier lag die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären RCT nur 1,261-mal höher als bei Karzinomen mit wenig IRF1-positiven Infiltratzellen (p-Wert = 0,703; 95% Konfidenzintervall = 0,384 – 4,141). Aufgrund des jeweils nicht erreichten fünf-prozentigen Signifikanzniveaus ist der Einfluss der IRF1-Positivität der Infiltratzellen auf das Ergebnis der primären Radiochemotherapie wohl nur als sehr gering zu beurteilen.

Tabelle 18: Binär logistische Regressionsanalyse zwischen der IRF1-Positivität der Infiltratzellen und der Wahrscheinlichkeit auf eine Tumorvollremission nach der primären Radiochemotherapie

<b>Variablen in der Gleichung</b>							
	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)
							Unterer Wert
Schritt 1 <sup>a</sup>	IRF1-Positivität der Infiltratzellen		,910	2	,634		
	Mäßig viel IRF1-Positivität	,481	,504	,910	1	,340	1,618
							,602
							4,346

#### 4. Ergebnisse

Viel IRF1-Positivität	,232	,607	,146	1	,703	1,261	,384	4,141
Konstante	,125	,354	,125	1	,724	1,133		

Bei nur leicht erhöhter Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission bei mäßig hoher oder hoher IRF1-Positivität der Infiltratzellen gegenüber geringer IRF1-Infiltratzell-Positivität und p-Werten, welche weit außerhalb des gewählten Signifikanzniveaus lagen, muss davon ausgegangen werden, dass kein Zusammenhang zwischen der IRF1-Expression der Infiltratzellen und der Ansprechwahrscheinlichkeit

### 5. Diskussion

Nach Berechnungen des Robert Koch-Instituts erkranken nach derzeitigem Stand jeder zweite Mann (51 %) und 43 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens an malignen Tumoren (Robert Koch-Institut, 2016; Kaatsch et al., 2015). Daraus ergibt sich, dass bösartige Krebserkrankungen bereits jetzt, nach den Herz-Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland darstellen. So sind nach Kaatsch et al. rund 24,1% aller Todesfälle auf die Folgen einer malignen Erkrankung zurückzuführen. Durch den demographischen Wandel gehen Kaatsch et al. zudem von einer steigenden Tumorinzidenz in den kommenden Jahren aus, was die Bedeutung dieser Erkrankungsart für das Gesundheitssystem immer weiter wachsen lässt. Am häufigsten erkranken Männer in Deutschland an Prostatakrebs, bei Frauen ist hingegen der Brustdrüsengeschwülste führend. Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereichs stehen insgesamt an fünfter Stelle, wobei Frauen, obgleich zunehmender Inzidenz, noch deutlich seltener betroffen sind als Männer (RKI 2020; Jiang und Dong 2017). Trotz aller Bemühungen in der Forschung und in der Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen sind die Überlebensraten der Erkrankten dieser Tumorentität, anders als bei den meisten anderen Tumorerkrankungen, in den vergangenen Jahren kaum gestiegen. Dies mag zum einen an dem durchschnittlich deutlich fortgeschrittenen Tumorstadium bei Erstdiagnose der Erkrankung liegen, was auf das Fehlen eindeutiger Frühsymptome zurückzuführen ist. Zum anderen weisen die Tumore des Kopf-Hals-Bereichs eine große molekulare wie auch klinischen Heterogenität auf, was das Ansprechen auf Standardtherapien deutlich beeinträchtigt (Gerlinger et al. 2012). Dies erklärt, wieso sich die Behandlung solcher Tumore als äußerst komplex darstellt und die 5-Jahres-Überlebensrate seit mehreren Jahren nahezu unverändert bei 50-60 Prozent liegt (RKI 2020). Die Therapie der Kopf-Hals-Karzinome umfasst die chirurgische Intervention, die Radio- oder Radiochemotherapie, sowie Chemotherapien und Immuntherapien mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab. Je nach Tumorstadium können diese Behandlungsoptionen einzeln eingesetzt werden oder unterschiedlich kombiniert werden. Allerdings sind diese Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Tumorstadien häufig nur eingeschränkt wirksam oder weisen starke Unterschiede in ihrer Effektstärke auf. Zudem können erhebliche Nebenwirkungen auftreten, welche die Lebensqualität der Patienten massiv beeinträchtigt. Daher ist es wichtig, für jeden Patienten ein individuell angepasstes Therapiekonzept zu finden, um ein möglichst langes Überleben bei geringstmöglichen Therapienebenwirkungen gewährleisten zu können. Diese individualisierten Therapieverfahren sind Gegenstand der aktuellen Forschung und auch der Schwerpunkt dieser Arbeit.

## 5. Diskussion

Prinzipiell gelten HPV-positive Kopf-Hals-Tumore in der Literatur sowohl als prognosebegünstigt als auch als strahlen- und chemosensibler als Kopf-Hals-Tumore mit HPV-negativen Status (Fakhry et al., 2008; Ragin und Taioli 2007). Als mögliche Erklärung für die höhere Strahlen- und Chemosensibilität gilt die in HPV-positiven Tumoren vorliegende Wildtyp-Form des Tumorsuppressorgens p53, welches als eines der wichtigsten Regulatoren der zellulären Antwort bei Erbinformationsmutationen und Zelltartungen gilt. Zwar wird das p53 durch das high-risk-HPV-Onkogen E6 inhibiert, so dass es zeitweise seine Funktion nicht mehr ausüben kann, jedoch wird angenommen, dass immer noch eine höhere Restaktivität des p53 gegeben ist als bei HPV-negativen Tumoren, bei denen das Tumorsuppressorgen Mutationen unterliegt, die zu einem vollständigen Funktionsverlust führen. Außerdem können Chemotherapien die E6- und E7-Expression herunterregulieren und dadurch der p53-abhängige Regulationsmechanismus des Zellzyklus und der Apoptoseeinleitung bei DNA-Mutationen wieder greifen (Douglas et al., 2010). Jedoch gibt es unter den Patienten mit HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren eine nicht unerhebliche Anzahl an Patienten, die entweder gar nicht oder nur unzureichend auf eine Radio- oder Radiochemotherapie ansprechen (Thibodeau et al., 2015). So konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass von den 18 Patienten, die unter einem HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumor litten, nicht alle von einer Radiochemotherapie profitierten. Insgesamt konnte in dieser Arbeit auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven HPV-Status und einem besseren Ansprechen auf eine Radiochemotherapie festgestellt werden. Möglicherweise lag dies an der geringen Anzahl der Patienten mit HPV-assoziiertem Kopf-Hals-Tumor. Da aber, wie oben beschrieben, in der Literatur von einem nicht unerheblichen Teil der HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren gesprochen wird, welche sich strahlen- und chemoresistent zeigen, gilt es, die molekularen und mikrobiologischen Prozesse hinter dieser Tumorentität zu erforschen, um prädiktive Aussagen treffen zu können, welche Patienten von einer primären Radiochemotherapie profitieren würden und für welche Patienten andere besser passende Therapieoptionen entwickelt und in die Tumorversorgung integriert werden müssen.

Ein erster Ansatz, der aufzeigte, wie die Chemosensibilität eines HPV-positiven Tumors beeinflusst wird, wurde 2016 von der Arbeitsgruppe um Prof. Smola beschrieben. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass diese Chemosensibilisierung von HPV-positiven Cervixkarzinomen STAT3-abhängig ist und identifizierten den IFN-Regulationsfaktor-1 (IRF1) als STAT3-induzierten Mediator, der für die Steigerung des Zelltods erforderlich ist. Unerwartet war dies, da die STAT3-Aktivierung bei verschiedenen anderen bösartigen Erkrankungen das

## 5. Diskussion

Tumorwachstum und die Resistenz gegen Chemotherapien fördert. Als zugrundeliegender Mechanismus für die Radio-/ Chemosensibilisierung wurde eine dramatische Aufwärtsregulierung des proapoptotischen Faktors IRF1 nach STAT3-Aktivierung identifiziert. Demnach korreliert die epitheliale IRF1-Expression in vortherapeutischen Biopsien von Gebärmutterhalskrebs signifikant mit der Reaktion des Patienten auf eine Chemo- oder Radiochemotherapie.

Da das E7-Onkoprotein bereits als bekannter Unterdrücker der IRF1-Expression gilt und somit die IRF1-Expression eines HPV-positiven Tumors eigentlich niedrig sein müsste, kam es zu der Überlegung, ob die Aktivierung von STAT3 die IRF1-Hemmung durch E7 außer Kraft setzen kann (Walch-Rückheim, et al., 2016). In diesem Fall wären die proapoptotischen Effekte des IRF1 den eigentlich antiapoptischen Effekten des STAT3 überlegen.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Frage, ob dieser Effekt auch bei Kopf-Hals-Tumoren nachweisbar ist, und in wieweit das humane Papillomvirus Typ 16 mit der Aktivierung des STAT3-IRF1-Signalwegs in Verbindung gebracht werden kann. Dadurch soll erforscht werden, ob in Zukunft die Analyse der IRF1-Expression eines Kopf-Hals-Tumors eine Möglichkeit darstellen könnte, gezielt Patienten auf die Ansprechwahrscheinlichkeit einer primären Radiochemotherapie zu screenen. Patienten, bei denen die Erfolgsaussichten der primären Radiochemotherapie besonders hoch sind, könnte so die primär chirurgische Therapie zu Gunsten der RCT erspart bleiben. Operative Nebenwirkungen und Risiken wie Sprechunfähigkeit, Nervenverletzungen, postoperative Schmerzen, Narkoserisiken und ästhetische Schäden könnten dadurch gezielt umgangen werden, ohne dass Einbußen in der Prognose in Kauf genommen werden müssten.

Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Kollektiv von 85 Patienten ausgewählt, die an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich erkrankt waren und primär mit einer Radiochemotherapie therapiert wurden. Bei allen Patienten wurde der HPV-Status bestimmt und die Expression von IRF1 in den Tumorzellen und den um den Tumor umgebenden Infiltratzellen quantifiziert. Um schließlich die Auswirkung der IRF1-Expression auf die Sensibilität der Tumore gegenüber der Radiochemotherapie untersuchen zu können, wurden die CT-Bilder der Patienten vor und nach der RCT miteinander verglichen. Dabei wurde untersucht, ob es bei der jeweiligen Tumormasse zu einer Vollremission, zu einer Teilremission oder zu keiner Veränderung der Tumormasse beziehungsweise zu einer Größenzunahme des Karzinoms gekommen war. Die Analyse der Abhängigkeit des Ansprechens auf die

## 5. Diskussion

Radiochemotherapie und der IRF1-Expression des Tumorgewebes und der Infiltratzellen erfolgte jeweils mithilfe des binär-logistischen Regressionsanalyseverfahren nach Wald.

Prinzipiell müssen alle hier aufgezeigten Ergebnisse mit dem Hintergrund der relativ geringen Fallzahl von, je nach Test, maximal 85 Patienten betrachtet werden. Die Aussagekraft statistischer Ergebnisse wächst immer mit Größe der Fallzahl, so dass hier den zugeschriebenen Effekten in ihrer Beurteilbarkeit eine natürliche Grenze gesetzt ist. So sind auch die statistisch signifikanten Ergebnisse immer mit einem weitläufigen 95 Prozent-Konfidenzintervall verbunden, was die Qualität der Signifikanzeffekte sicherlich einschränkt. Insbesondere die Fallzahl der HPV-positiven Patienten stellte sich im ausgewählten Patientenkollektiv als sehr gering dar. So sollten auf alle Fälle die Tests, bei denen der HPV Status als Kriterium miteingeflossen ist, an einem größeren Kollektiv mit mehr HPV-positiven Fällen wiederholt und überprüft werden. Allerdings muss dazu gesagt werden, dass sich die Größe des in Frage kommenden Kollektivs als sehr übersichtlich erweist. So wurden in diese Arbeit nur Patienten mit kurativ-beabsichtigter primärer Radiochemotherapie eingeschlossen, die ein neu diagnostiziertes Kopf-Hals-Plattenepithel-Karzinom oder in wenigen Fällen ein Lokalrezidiv eines Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich aufwiesen, dessen Primärtumor weder mit einer Strahlen- Chemo- oder kombinierten Therapie behandelt worden ist. Da jedoch bei kurativen Absichten bislang meist die chirurgische Therapie bevorzugt wird, engte sich die Auswahl auf Patienten ein, deren Tumor primär als inoperabel galt aber dennoch nicht zu weit fortgeschritten war, um den kurativen Ansatz der Therapie verwerfen zu müssen. Auch der geringe Anteil an Patienten, die aus persönlichen Gründen eine chirurgische Intervention ablehnten und von sich aus eine primäre Radiochemotherapie wünschten, konnte mit in die Studie aufgenommen werden.

In den USA werden hingegen weit mehr Patienten, die unter einem lokalbeschränktem Kopf-Hals-Tumor leiden, mit einer primären Radiochemotherapie behandelt. Das primär operative Verfahren hat dort einen wesentlich geringeren Stellenwert als in Europa (Brana und Siu, 2012), so dass die Ergebnisse dieser Arbeit auch für den dortigen Raum von großer Relevanz sind.

Außerdem gilt zu beachten, dass die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen durch FFPE-Gewebe Schnittfärbungen aus Probebiopsien entstanden sind. Diese Biopsien stellen schon an sich jeweils nur kleinste Anteile des Gesamttumors dar. Aus diesen dreidimensionalen Probebiopsien wurden anschließend Paraffinblöcke angefertigt, von denen die

zweidimensionalen FFPE-Gewebeschnitte stammten. So zeigt der einzelne Gewebeschnitt auch jeweils nur einen kleinen Anteil des gesamten Probebiopsiegewebes. Ob sich der Tumor in seinem gesamten Bild ähnlich wie in dem kleinen 2D-Gewebeausschnitt darstellt, kann nicht garantiert werden. Insbesondere bei sich sehr inhomogen darstellenden Tumoren kann so eine Verfälschung der Ergebnisse zu Stande kommen. Allerdings stellt sich dieses Problem bei allen diagnostischen und nicht-diagnostischen Probebiopsien und muss als Unsicherheitsfaktor sowohl in der Klinik als auch in der Forschung hingenommen werden.

### IRF1-Expression des Tumorgewebes und Radiochemosensibilität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kopf-Hals-Karzinome, deren Tumorgewebe mehr IRF1 exprimierten eine höhere Sensibilität gegenüber der Radiochemotherapie zeigten als Tumore mit geringer IRF1-Expression. Da die mengenmäßige Erhebung der IRF1-Expression mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner erfolgte, wurde bei der IRF1-Quantifizierung sowohl das Verhältnis aus IRF1-produzierenden Tumorzellen zu Tumorzellen ohne IRF1-Produktion als auch die Quantität der IRF1-Produktion der einzelnen Zellen in die Berechnung mit einbezogen. Wurde ein Tumor mit einem hohen IRS-Wert klassifiziert, war die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor gut auf eine Radiochemotherapie ansprach, immer höher als bei Tumoren mit sehr geringer IRF1-Expression. Verglichen mit Patienten, deren Tumor einen IRS-Wert von 0 aufwies, hatten Patienten mit einem IRS-Wert von acht eine 4,636-fach erhöhte Chance auf eine Vollremission nach der primären RCT und zeigten damit ein auf dem fünf-Prozent-Niveau signifikant besseres Ansprechen. So konnte eindeutig bewiesen werden, dass bei sehr hoher IRF1-Produktion im Tumorgewebe - was sich hier in hohen IRS-Werten spiegelt – die Radiochemotherapie wesentlich besser anschlägt als bei Tumoren mit wenig IRF1-Produktion.

Erstaunlich war, dass sich dieser Effekt zu verstärken schien, sobald von einem männlichen Patienten ausgegangen wurde. So zeigten Männer mit einem IRS-Wert von drei eine 3,823-fach höhere Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären RCT als weibliche Patienten mit einem IRS-Wert von null. Dies war mit einem p-Wert von 0,044 genauso auf dem fünf-Prozent-Niveau signifikant wie bei einem IRS-Wert von sechs (Odds ratio = 5,263; p-Wert = 0,045) und acht (Odds ratio = 6,401; p-Wert = 0,011). Wie dieser Effekt zu Stande kam, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, jedoch sollte bedacht werden, dass die Anzahl der weiblichen Patientinnen, die in diese Arbeit eingeschlossen wurden mit 14 von 85 Probanden recht gering war. Dies war zwar der allgemeinen epidemiologischen Inzidenzrate

## 5. Diskussion

der Kopf-Hals-Tumore, die bei Frauen, trotz steigender Inzidenzrate, noch wesentlich seltener auftreten als bei Männern, geschuldet, führt aber bei einer Arbeit mit einem überschaubaren Patientenkollektiv zwangsläufig zu statistischen Unsicherheiten und möglichen Verzerrungen der Ergebnisse. Daher sollte dieser Effekt im Rahmen einer größeren Studie überprüft werden und bei einer Wiederholung der Ergebnisse geprüft werden, ob wirklich das Geschlecht den beeinflussenden Faktor darstellt, oder ob es sich um Störvariablen, wie etwa Alkoholkonsum oder Rauchverhalten handelt, die zwar eher mit dem männlichen Geschlecht assoziiert sind, aber nicht ursächlich auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede zurückzuführen sind.

Eine andere Frage, die sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit stellt, betrifft die Art und Weise der Sensibilisierung des Tumorgewebes gegenüber der Radiochemotherapie bei IRF1-Expression. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass ein Tumor mit viel IRF1-Expression in der Regel sensibler auf die Radiochemotherapie reagiert als Tumore, die wenig oder kein IRF1 exprimieren. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe, die 2016 nachweisen konnten, dass IRF1-positive Zervixkarzinome sensibler auf eine Chemo- und Radiochemotherapie mit Cisplatin reagierten als Zervixkarzinome, bei denen keine IRF1-Expression nachgewiesen werden konnte. Da platinhaltige Chemotherapeutika auch standardmäßig bei der Radiochemotherapie von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt werden, gilt es nun zu ermitteln, ob die hier aufgezeigten Ergebnisse auf das bessere Ansprechen der Chemotherapeutika zurückzuführen sind oder ob die IRF1-Expression neben der Chemosensibilisierung den Tumor auch strahlensensibler macht. Hierfür sollte die tumoröse IRF1-Expression von Patienten, welche eine reine Radiotherapie erhalten haben, mittels Immunhistochemie und geeigneten Scores, wie der hier verwendete Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner quantifiziert werden. Anschließend könnte statistisch beurteilt werden, ob auch hier Patienten mit viel IRF1-Expression ein besseres Ansprechen auf die Radiotherapie zeigen als Patienten mit Tumoren mit wenig IRF1-Expression. Wäre dies der Fall, kann davon ausgegangen werden, dass die IRF1-Expression neben der Chemosensibilität, auch die Strahlensensibilität der Tumore nach oben reguliert. Zu beachten gilt dabei, dass reine Chemotherapien bei Kopf-Hals-Tumoren ausschließlich bei weit fortgeschrittenen, palliativen Tumorstadien angewandt werden (Honecker und Dornoff, 2016). Dies macht einen direkten Vergleich mit kurativ angestrebten Therapien schwieriger und muss entsprechend in die Bewertung der Ansprechqualität der Radiotherapie mit einfließen.

Ein weiterer Aspekt, dem künftig noch Beachtung geschenkt werden sollte, ist die Langzeitprognose der Patienten, die initial gut auf eine Radiochemotherapie ansprachen. In dieser Arbeit wurde bei den Patienten lediglich der Zeitraum bis zum posttherapeutischen CT,

welches in der Regel drei Monate nach Abschluss der Radiochemotherapie erfolgte, betrachtet. So konnte zwar eine sichere Aussage darüber getroffen werden, wie gut die Tumore initial auf die Radiochemotherapie ansprachen, jedoch fehlen Aussagen über den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten. Insbesondere die Rezidivwahrscheinlichkeit nach primordialer Vollremission muss in Abhängigkeit der IRF1-Expression und des HPV-Status in kommenden Arbeiten untersucht werden. Bei Fällen, in denen Rezidive auftreten, muss außerdem eruiert werden, ob diese früher oder später als durchschnittlich nach einer operativen Primärbehandlung auftreten und ob auch darauf der IRF1-Status Einfluss hat. Zudem sollte in solchen Fällen die IRF1-Expression der Tumorrezidive untersucht werden und mit den Ausgangsbefunden verglichen werden. So könnten möglicherweise molekulare Mechanismen der fortgeschrittenen Kopf-Hals-Onkologie aufgedeckt werden.

### IRF1-Expression der Infiltratzellen und Radiochemosensibilität

Anders als bei der IRF1-Expression der Tumorzellen schien die IRF1-Expression der Infiltratzellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Radiochemosensibilität des Tumors zu besitzen. Jedoch muss dazu gesagt werden, dass die Quantifizierung der IRF1-positiven Infiltratzellen nur anhand einer selbst festgelegten Skala mit Ordinalniveau von wenig, über mäßig-viel bis viel IRF1-Positivität erfolgte. Aufgrund der Masse, der sich auch teilweise überlagernden, Infiltratzellen und der Größe der Tumorschnitte war es hier nicht möglich auf, in der Literatur bewährte, Quantifizierungsskalen, wie den Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner zurückzugreifen. Um diesem jedoch möglichst nahe zu kommen, wurde bei den Infiltratzellen sowohl das Verhältnis aus IRF1-positiven zu IRF1-negativen Infiltratzellen, wie auch die Intensität der Anfärbung der IRF1-positiven Infiltratzellen beurteilt und mit in die hier verwendete Skala aufgenommen. Da die Infiltratzellen allerdings nicht, wie die Tumorzellen, einzeln ausgezählt wurden, liegt hier zu einem gewissen Teil eine vom Betrachter subjektive Beurteilung der Tumorinfiltratzellen vor. Dieser Effekt könnte, durch das teilweise sehr heterogene Bild der Verteilung der Infiltratzellen, je nach Lokalisation der Bildaufnahme, zusätzlich beeinflusst worden sein. Um eine genauere und vergleichbarere Aussage über die Infiltratzellen und deren IRF1-Expression treffen zu können, müsste ein festgelegter Abstand zum Tumor gewählt werden, in dessen Durchmesser alle Infiltratzellen in der Auswertung Berücksichtigung finden. Mit der hier verwendeten Software war diese bei der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Dennoch müsste selbst bei dieser optimierten Umsetzung der Infiltratzauswertung beachtet werden, dass sich kleine Infiltratzellen in einer 2D-

Bildaufnahme einer Probebiopsie häufig überlagert darstellen und sich so die Auszählung der einzelnen Zellen schwierig gestalten könnte.

Zudem würde eine Differenzierung der Infiltratzellen und eine Analyse welche Immunzellen unter welchen Umständen mehr oder weniger IRF1 produzieren interessante Ergebnisse liefern, da es hierzu kaum Hinweise in der aktuellen Literatur gibt. Auch eine Untersuchung, ob IRF1 positive Tumore von anderen Immunzellen umgeben sind als IRF1 negative Tumore, könnte zu neuen aufschlussreichen Erkenntnissen führen.

### IRF1-Expression und HPV-Status

In dieser Arbeit wurde zudem überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der Quantität der IRF1-Expression der Tumorzellen besteht. Bei der vorausgegangenen Arbeit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Smola, die zuvor gezeigt hatte, dass Zervixkarzinome bei hoher IRF1-Expression besser auf eine Chemotherapie ansprachen als Tumore mit geringer IRF1-Expression, konnte aufgrund der hohen Assoziation von Zervixkarzinomen und HPV-Infektion immer von einem positiven HPV-Status ausgegangen werden (Hillemans et al., 2003). Bei Kopf-Hals-Tumoren ist hingegen die Assoziation mit humanen high-risk Papillomviren deutlich geringer. Primär konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der IRF1-Expression des Tumorgewebes und des HPV-Status aufgezeigt werden. Jedoch war insgesamt die Fallzahl der HPV-positiven Tumore in der vorliegenden Arbeit recht gering, so dass diese Aussage kritisch betrachtet werden muss. Daher empfiehlt sich eine Kontrolle der statistischen Untersuchung bei einem Patientenkollektiv, bei dem ca. die Hälfte der Kopf-Hals-Tumore einen HPV-positiven Status aufweisen. Dadurch könnte direkt überprüft werden, ob HPV-positive Tumore mehr IRF1 exprimieren als HPV-negative Tumore. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen höheren HPV-Assoziation würde sich gegebenenfalls eine Studie an Zungengrund- oder Tonsillenkarzinomen eignen (Ndiaya et al., 2015; Paz et al., 2000). Auch wäre eine Untersuchung an 3D-Zellkulturen möglich, bei welcher Keratinozyten mit HPV infizieren werden könnten und die IRF1-Expression vor und nach der Virusinfizierung miteinander verglichen werden könnten. Sollte es nach der Infizierung zu einem signifikanten Anstieg der IRF1 Expression kommen, könnte davon ausgegangen werden, dass die high-risk Papillomviren direkten Einfluss auf die IRF1-Expression haben. In diesem Falle müssten weitere Untersuchungen folgen, welche die molekularen Mechanismen der IRF1-Induktion aufdecken.

### STAT3-IRF1-Signalweg als Radiochemosensibilisierer?

Unsere Arbeitsgruppe machte in ihren früheren Untersuchungen STAT3 als Regulator für eine höhere IRF1-Expression bei Zervixkarzinomen aus. Ob dieser Signalweg auch bei Kopf-Hals-Tumoren zu einer erhöhten IRF1-Expression führt, muss in künftigen Arbeiten erörtert werden. Ähnlich wie die eigene Arbeitsgruppe diesen Signalweg bei Zervixkarzinomen überprüft hat, könnte auch eine Untersuchung bei Kopf-Hals-Tumoren erfolgen. So könnte bei Tumorgewebe einerseits die IRF1-Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden und in einem zweiten Schritt das Vorhandensein von STAT3 mit einem geeigneten Antikörper auf einem zweiten Gewebeschnitt derselben Tumorprobe untersucht werden. Anschließend müssten die Färbungen miteinander verglichen werden. Falls sich die Tumorproben an denselben Lokalisationen sowohl mit STAT3 als auch mit IRF1 anfärbten lassen, würden diese Ergebnisse daraufhin deuten, dass beide Faktoren funktionell miteinander verknüpft sein könnten. Überprüfen könnte man dies anschließend, wie bei den Zervixproben geschehen, mit 3D-Zellkulturen. Wenn bei Zelllinien, bei denen die STAT3-Expression durch STAT3-Knockdown verhindert ist auch die IRF1-Induktion signifikant unterdrückt wäre, würden diese Belege für einen STAT3-abhängigen Mechanismus der IRF1-Induktion sprechen.

Obwohl sich in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der IRF1-Expression des Tumorgewebes im Chi-Quadrat-Test feststellen ließ, zeigte sich dennoch eine Beeinflussung, wenn es darum ging, ob eine hohe IRF1-Expression des Tumorgewebes die Wahrscheinlichkeit auf eine Vollremission nach der primären Radiochemotherapie erhöhte. Lag ein HPV-positiver Tumor vor, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine hohe IRF1-Expression des Tumors auch zu einem besseren Ansprechen auf die Radiochemotherapie führt als bei HPV negativen Tumoren. Auch diese Ergebnisse sollten im Rahmen einer größer angelegten Studie mit mehr HPV-positiven Tumoren überprüft werden, da zum einen die Anzahl der HPV-positiven Fälle in dieser Arbeit relativ gering war, zum anderen aus der Literatur bereits bekannt ist, dass Kopf-Hals-Tumore mit HPV-Assoziation besser auf eine Radiotherapie ansprechen als HPV-negative Tumore. Ob die hier gezeigte Beeinflussung lediglich auf die HPV-assoziierte Radiosensibilisierung zurückzuführen ist oder sie diese, aufgrund einer möglichen IRF1-Induktion mit deren proapoptotischen Auswirkungen, übersteigt, konnte bei der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden.

### Einfluss anderer Faktoren auf IRF1-Expression

Ein möglicher Einfluss von Nikotin- und Alkoholabusus, welche als Hauptrisikofaktoren für die Erkrankung an Kopf-Hals-Tumoren gelten, auf die IRF1-Expression, konnte leider nicht überprüft werden. Da es sich hier um eine retrospektive Studie handelt, konnte nicht bei allen Patienten nachvollzogen werden, ob diese eine positive Nikotin- oder Alkoholabusus-Anamnese aufwiesen. Auch andere mögliche Einflussvariablen wie Infektionen mit dem Ebstein-Barr-Virus oder chemische Toxine konnten in dieser Arbeit keine Berücksichtigung finden. Da es hierzu in der aktuellen Literatur keine Aussagen gibt, würde die Überprüfung dieser Einflussvariablen auf die IRF1 Expression wichtige Informationen liefern.

### Frage nach Impfbedingungen

Eine klinische, in der Literatur bereits viel diskutierte, Frage werfen auch die hier erhobenen Daten auf. Da nachgewiesen werden konnte, dass ein nicht unerheblicher Anteil der Kopf-Hals-Tumore mit den humanen Papillomviren assoziiert ist, muss erörtert werden, ob künftig eine geschlechtsunabhängige, sowie, bei HPV-negativen Status, eine altersunabhängige Impfung gegen high-risk HPV-Typen empfohlen werden sollte. Der deutsche Nobelpreisträger Prof. Harald zur Hausen konnte bereits Anfang der 1980er Jahre nachweisen, dass HPV-Infektionen für das Entstehen von Zervixkarzinomen verantwortlich sind. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden anschließend mehrere Impfstoffe gegen verschiedene high-risk HPV-Typen entwickelt, mit denen weltweit immer mehr Mädchen geimpft werden. Dies soll die Inzidenz des Zervixkarzinoms in den kommenden Jahren systematisch reduzieren. Jedoch konnte 2017 eine US-amerikanische Forschungsgruppe zeigen, dass erwachsene Personen, welche mindesten eine Dosis eines HPV-Impfstoffes (empfohlen werden je nach Impfstoff und Alter der zu impfenden Person zwei bis drei Impfdosen) erhalten hatten, mit 0,11% gegenüber 1,61%, auch signifikant weniger orale HPV-Infektionen aufwiesen als ungeimpfte Personen (Chaturvedi et al. 2018). Die Autoren schlussfolgerten, dass die HPV-Impfung Infektionen mit krebserregenden HP-Viren auch im Oropharyngealbereich verhindern kann und dadurch in der Lage sein könnte vor HPV-induzierten Oropharynxkarzinomen zu schützen. Da aktuell die ständige Impfkomission (STIKO) am RKI lediglich eine Schutzimpfung gegen HP-Viren bei Mädchen und Jungen im Alter von neun bis zwölf Jahren oder spätestens bis zum Ende des 17. Lebensjahres als Nachholimpfung empfiehlt, ist gegebenenfalls über eine Ausweitung dieser

## 5. Diskussion

---

Richtlinie nachzudenken (Robert Koch-Institut Impfkalender 2018). Dadurch könnten möglicherweise auch ältere Personen effektiv vor HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren und anderen HPV assoziierten Malignomen geschützt werden und die Inzidenz dieser Erkrankungen deutlich verringert werden.

### Literaturverzeichnis

Aktories K, Fösermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier München. 2017; 12: 838

Ang K, Trott A, Brown B W, Garden A, Foote L, Morrison W, ... Peters L: Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 2001 Nov; 51: 571-578

Auw-Haedrich C, Martin G, Spelsberg S, Sundmacher R, Freudenberg B, Maier P, Reinhard T: Expression of p16 in Conjunctival Intraepithelial Neoplasia Does Not Correlate with HPV-Infection. Open Ophthalmology Journal. 2008; 2: 48–56

Barossa M S, Lowy D R, Schiller J T: Papillomavirus Polypeptide E6 and E7 are Zinc-Binding Proteins. Journal of Virology. 1989 Mar; 63: 1404-1407

Bernard H U, Burk R D, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M: Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 2010; 401: 70-70

Betoli J, Villa L L, Sicero L: Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer; Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2013 Mar; 46

Bhatia B, Burtness B: Human Papillomavirus-Associates Oropharyngeal Cancer: Defining Risk Groups and Clinical Trials. Journal of Clinical Oncology. 2015; 33

Boulet G, Horvatg C, Broeck D V, Sahebali S, Bogers J: Human papillomavirus: E6 and E7 oncogens. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007; 39: 1006-2011

Boyer S N, Wazer D E, Band V: E7 Protein of human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Cancer Research. 1996 Oct; 56: 4620-2624

Brana I, Siu L L: Locally advanced head and neck squamous cell cancer: treatment choice based on risk factors and optimizing drug prescription. Annals of Oncology. 2012 Sep; 23: 178-185

Brierley J D, Gospodarowicz M K, Wittekind C: TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. Union for International Cancer Control. 2016 Dez

Bubach V, Bubach W: Sequentielle und simultane Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. Der Onkologe. 2001;533-549

Budach V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, Grabenbauer G, Wernecke K D: Hyperfractionated Accelerated Chemoradiation With Concurrent Fluorouracil-Mitomycin Is More Effective Than Dose-Escalated Hyperfractionated Accelerated Radiation Therapy Alone in Locally Advanced Head and Neck Cancer: Final Results of the Radiotherapy Cooperative Clinical Trials Group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. Journal of clinical oncology. 2005 Feb; 23: 1125–35

## 6. Literaturverzeichnis

ChanT A, Hwang P M, Hermeking H, Kinzler K W, Vogelstein B: Cooperative effects of genes controlling the G2/M checkpoint. *Genes and Development.* 2000; 14: 1584–1588

Chaturvedi A K, Engels E A, Anderson W F, Gillison M L: Incidence Trend for Human Papillomavirus-related and unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology.* 2008 Feb 01; 26: 612-619

Chaturvedi A K, Graubard B I, Broutian T, Pickard R K L, Tong Z, Xiao W, Kahle L, Gillison M L: Effect of Prophylactic Human Papillomavirus (HPV) Vaccination on Oral HPV Infections Among Young Adults in the United States. *Journal of Clinical Oncology.* 2018 Jan; 36: 262–267

Cooper J S, Fu K, Marks J, Silvermann S: Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 1995; 31: 1141-1164

Coughlin C T, Richmond R C: Biologic and clinical developments of cisplatin combined with radiation: concepts, utility, projections for new trials, and the emergence of carboplatin. *Seminars in Oncology.* 1989 Sep; 16: 31-43

Darnell J E: STATs and Gene Regulation. *Science.* 1997 Sep 12; 277: 1630-1635

Darnell J E, Kerr J I, Stark G R: Jak-STAT Pathway and Transcriptional Activation in Response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994 Jun 3; 264: 1415-1421

Day P M, Lowy D R, Schiller J T: Papillomavirus infection cells via a clathrin-dependet pathway. *Virology.* 2003; 207: 1-11

Dayyani F, Etzel C, Liu M, Ho C-H, Lippman S M, Tsao A S: Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology.* 2015

De Villiers E-M, Fauquet C, Broker T R, Bernard H-U, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324: 17-27

Deng C, Zhang P, Harper J W, Elledge S J, Leder P: Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 1995 Aug; 82: 675-684

Doorbar J: The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology.* 2005; 32: 7-15

Doorbar, J: Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science.* 2006; 110: 525-541

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo I G, Stoler M, Broker T R, Stanley M: The Biology and Life-Cycle of Human Papillomavirus. *Vaccaccine.* 2012: 55-70

Douglas R, Lowy M D, Munger K: Prognostic Implications of HPV in Oropharyngeal Cancer. *The new england journal of medicine.* Jun 2010: 1-3

Dyson N, Howley P M, Munger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* Feb 1989; 243: 934-937

## 6. Literaturverzeichnis

Estler C-J, Schmidt H: Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer Stuttgart New Yourg. 2006; 6: 911, 912, 919-921

Fakhry C, Westra W H, Li S, Cmelak A, Ridge J A, Pinto H, Forastiere A, Gillison M L: Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. Journal of the National Cancer Institute. Feb. 2008; 100: 261–269

Frazer I H: Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. Virology. 2009; 384: 410-414

Friesland S, Mellin H, Munck-Wikland E, Lindholm J, Dalianis T, Lewensohn R: Human papilloma virus (HPV) and p53 immunostaining in advanced tonsillar carcinoma – reation to radiotherapy response and survival. Anticancer Research. 2001 Jan 01; 21: 529-534

Galbiatti A L S, Padovani-Junior J A, Maniglia J V, Rodrigues C D S, Pavarino E C, Goloni-Bertollo E M: Head and neack cancer: causes, prevention and treatment. Brazilian Journal of Oropharyngealogy. 2013; 79: 239-247

Gaykalova D A, Manola J B, Ozawa H, Zizkova V, Morton K, Bishop J A, ... Califano A: NF-KB ans stat3 transcription factor signatures differentiate HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous ceöö carcinoma. International Journal of Cancer. 2015; 137: 1879-1889

Gerlinger M, Rowan A J, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronross E, ... Phillipmor P: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. New England Journal of Medicine. 2012; 366:883–892

Gewin L, Galloway D A. E: Box-Dependent Activation of Telomerase by Human Papillomavirus Type 16 E6 Does Not Require Induction om c-myc. Journal of Viology. 2001 Aug; 75: 7198-7201

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M: The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. Virus genes. 2010; 40: 1-13

Gillison M L, Koch W M, Capone R B, Spafford M, Westra W, Wu L, ... Sidransky D: Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2000 May 03; 92: 709-720

Grandis R, Pitt A S: Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell groth in vitro. American Society for Clinical Investigation. 1998 Oct; 102: 1385-1392

Grivennikov S, Karin M, Dangerous liaisons: STAT3 und NF-KB collaboration amd crosstalk in cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews 21. 2010; 11-19

Harwood C A, Proby C M: Human papillomaviruses and non melanoma skin cancer. Current Opinion in Infectious diseases. 2002: 101-114

## 6. Literaturverzeichnis

- Hashibe M, Breman P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado M P, ... Wünsch-Filow V: Alcohol Drinking in never users of Tabacco, cigarette smoking in never Drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooles Analysis in the international Head and Neck Cancer Epidemiology Cnsortium. *Journal of the National Cancer Institute.* 2007 May 16; 99: 777-789
- Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C, Boccia S, Castellsague X, Chen C, ... Buffetta P: Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention.* 2009 Feb; 18: 541-550
- Hartmann S, Sayehli C M, Maurus K, Bhola N E, Brands R C, Kübler A C Müller-Richter U: Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs. *Der MKG-Chirurg.* 2018 Feb; 11: 30-37
- Hecken J, Gemeinsamer Bundesausschuss: Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a SGB V Pembrolizumab (neues Anwendungsgebiet: zur Behandlung des rezidivierenden oder metastasierenden Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region (HNSCC)). 2019 Apr
- Hillemanns P, Friese K, Hepp H: HPV und Zervixkarzinom. *Der Gynäkologe* 4. 2003; 36: 281
- Hoffmann M, Tribius S: HPV bei Oropharynxkarzinomen in der 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation. *Laryngo-Rhino-Otologie.* 2018; 97: 641-649
- Holthusen H: Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzanwendung zur Verhütung von Schäden. *Strahlentherapie* 57. 1936: 254-269
- Honecker P, Dornoff C: Onkologie 2016/2017 Interdisziplinäre Empfehlung zur Therapie. 2016; 16
- Horiot J C, Le Fur R, N'Guyenc T, Chenald C, Schraube S, Alfonsif S, ... De Pauw M: Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology.* 1992; 25: 231-241
- Huibregtse J M, Scheffner M, Howley P: A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal.* 1991; 10: 4129-4135
- Huibregtse J M, Scheffner M, Howley P: Cloning and Expression of the cDNA for E6-AP, a Protein That Mediates the Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with p53. *American Societyfor Microbiology.* 1993; 13: 775-784
- Jou A, Hess J: Epidemiolg and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncology Research and Treatment.* 2017; 40: 328-332
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C: Krebs in Deutschland 2011/2012. *Robert Koch-Institut.* 2015; 10: 8-31
- Kauffmann G W, Moser E, Sauer R: Radiologie. Elsevier, Urban und Fischer. 2006.

## 6. Literaturverzeichnis

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roder R, Drüst M, Lowy D R, Schiller J T: Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*. Dez. 1993; 67: 6929-2936

Klug A, Fisch J T: Structure of viruses of the papilloma-polyoma type. I. Human wart virus. *Mol. Biol.* 1965; 11: 403-423

Klussmann J P, Preuss S F, Speel E J: Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. *HNO*. 2009; 57: 113-122

Kriemer A R, Clifford G M, Boyle P, Franceschi S: Human Papillomavirus Types in Head and neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Feb; 467-465

Li M, Beard P, Estes P A, Lyon M K, Carcea R L: Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. *Journal of Virology*. 1998 Mar; 72: 2160-2167

Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle M, ... Schick B: Reply to combination of p16 INK4a-Ki67 immunocytoLOGY and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathology*. 2015; 123: 382–383

Löffler G, Petrides P E: Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag. 2013

Maier H, Gewelke U, Dietz A, Heller W-D: Kehlkopfkrebsrisiko bei chronischem Tabak- und/oder Alkoholkonsum. *Otorhinolaryngol*. 1991 Jan; 1: 271-277

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller W-D, Weidauer H: Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *The Clinical Investigator*. 1992; 70: 320-327

Maier H, Dietz A, Zielinski D, Jünemann k-h, Heller W-D: Risikofaktoren bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx. *DMW* 1990; 22: 843-850

Mantovani F, Banks L: The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001; 20; 7874-7887

Marur S, D'Souza G, Westra W H, Forastiere A A: HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. 2010 Aug; 11: 781–789

Mirghani H, Amen F, Tao Y, Deutsch E, Levy A; Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treatment Reviews*. 2015; 41: 844-852

Münger K, Werness B A, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley P M: Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal*. 1989; 8: 4099-4195

Muto V, Stellacci E, Lamberti A G, Perrotti E, Carrabba A, Matera G, ... Focá A: Human papillomavirus type 16 E5 protein induces expression of beta interferon through interferon regulatory factor 1 in human keratinocytes. *Journal of Virology* 2011; 85: 5070–5080

## 6. Literaturverzeichnis

Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsaué X, Laporte L, ... Trottier H: HPV DNA, E6/E7 mRNA and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 1319-1331

Pantel M, Guntinas-Lichius O: Larynxkarzinom Epidemiologie, Risikofaktoren, Überleben. *HNO* Springer Verlag. 2011; 60: 32-40

Paz B, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski S: Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Cancer. *American Cancer Society.* 1997 Feb 01; 79: 595-604

Pfeiffer J, Rawluk J, Thomsen A, Voss P: Kopf-Hals-Tumore Mundhöhle, Pharynx, Larynx, Comprehensive Cancer Center Freiburg. 2017

Pignon J P, Bourhis J, Domenge C: Meta-Analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACHNC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology.* 2009; 92: 4-14

Poremba C, Simon R, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B: Molekulare Ursachen der Tumorentstehung. *Der Onkologe.* 1999; 5: 847-854

Quint K D, Genders R E, de Koning M N C, Borgogna C, Gariglio M, Bouwes Bavinck J N, ... Feltkamp M C: Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *Journal of Pathology.* 2015; 235: 342-354

Ragin C C R, Taioli E: Survival of squamous cell carcinoma of head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta analysis. *Int. J. Cancer.* 2007; 121: 1813-1820

Rawlings J S, Rosler M, Harrison D A: The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell Science.* 2004; 117: 1281-1283

Remmele W, Stegner HE: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987; 8: 138-140

Robert Koch-Institut: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten. 2020

Robert Koch-Institut: Impfkalender (Standardimpfungen) für Säuglinge, Kinder, Jugendliche und Erwachsene. 2018

Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2013/14. Zentrum für Krebsregisterdaten. 2016

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland 2015/2016. 2020

Schuler P J, von Witzleben A, Doescher J, Wollenberg B, Dietz A, Hoffmann T K: Immun-, radio- und chemotherapeutische Studien bei Kopf-Hals-Tumoren. *HNO.* 2018 Mar; 66: 212-218

Semrau S, Schmidt D, Lell M, Waldfahrer F, Lettmaier S, Kuwert T, ... Fietkau R: Results of chemoselection with short induction chemotherapy followed by chemoradiation or surgery in the treatment of functionally inoperable carcinomas of the pharynx and larynx. *Oral Oncology.* 2013; 49: 454-460

Senba M, Mori N: Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology reviews.* 2012; 8: 135-144

Shen Y, Devgan G, Darnell J E, ... Bromberg F: Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. *PNAS.* 2001 Feb 13; 98: 1543-1548

Stanley M A: Epithelial Cell Response to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012 Apr; 25: 215-222

Stein A P, Saha S, Kraninger J L, Swick A D, Yu M, Lambert P F, Kimple R J: Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer. *The Cancer Journal.* 2015 May/Jun; 21: 138-146

Stromberger C: Primäre und adjuvante Radio(chemo)therapie bei Kopf-Hals-Tumoren - Indikationen, Techniken, Ergebnisse. *Der Onkologe.* 2019 Jan; 25: 240–245

Syrjänen S: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology.* 2005; 32: 59-66

The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015 Jan 29; 517: 576-582

Thibodeau B J, Geddes T J, Ahmed S, Pruetz B L , Chen P Y, Woob J, ... Wilson G J: Gene expression profiling predicts nonresponders to chemoradiation in HPV16-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* Sep. 2015 Sep; 9: 345–353

Tomaic V: Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers Basal.* 2016 Oct; 96

Turkson J: STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2004: 409-422

Trotti A: Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues: *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 2000; 47: 1-12

Um S J, Rhyu J W, Kim E J, Jeon K C, Hwang E S, Park J S: Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein invivo. *Cancer Letters.* 2002; 179: 205–212

Voigt W, Dietrich A, Schmoll H J: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz Cisplatin und seine Analoga. *Pharm. Unserer Zeit.* Wiley-VCH Verlag Weinheim. 2006; 35: 134-143

## 6. Literaturverzeichnis

Vokes E, Weichselbaum R, Lippman S M, Hong W K: Head and Neck Cancer. The new england journal of medicine. 1993 Jan; 328: 184-194

Wagner S, Sharma S J, Wuerdemann N, Knuth J, Reder H, Wittekindt C, Klussmann J P: Human Papilloma-related Head and Neck Cancer. Oncology research and Reatment. 2017; 40: 334-340

Walch-Rückheim B, Pahne-Zeppenfeld B, Fischbach J, Wickenhauser J, Horn C, Tharun L, ... Smola S: STAT3/IRF1 pathway activation sensitizes cervical cancer cells to chemotherapeutic drugs. Cancer Research. 2016

Wannenmacher M, Wenz F, Debus J. Strahlentherapie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013; 2: 5

Weinberger P M, Yu Z, Haffty B G, Kowalski D, Harigopal M, Sasai C, ... Psyrri A: Prognostic Significance of p16 Levels in oropharyngeal squamous cell cancer. Clinical Cancer research. 2004 Sep

Wilson V G, West M, Woytek K, Rangasamy D: Papillomavirus E1 Proteins: Form, Function and feature; Virus Genes. 2002 Jan: 275-290

Yiang S, Dong Y: Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. Current Problems in Cancer. 2017 Sep; 41: 323-327

Young L S, Dawson C W, Clark D, Rupani H, Busson P, Tursz T, ... Rickinson A B: Epstein Barr Virus Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma. Journal of general Virology. 1988; 69: 1051-1065

Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence JJ, ..., Oren M: p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. Molecular and cellular biology. 1993 Mar; 13: 1415-1423

Zur Hausen H: Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. Biochimica et Biophysica Acta. 1996; 1288: 55-78

Zur Hausen H: Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. Nature. 2002 May; 2; 342-350

# Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Ausland in gleicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Die vorliegende Arbeit wurde mithilfe der von der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellten, Plagiatssoftware iThenticate auf mögliche Übereinstimmungen überprüft.

Datum Unterschrift

# Danksagung

Ohne die Hilfe und die Unterstützung von vielen Personen wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit zu verfassen.

Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Sigrun Smola (Institut für Virologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) außerordentlich für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit an ihrer Klinik schreiben zu dürfen, für das Überlassen des hochinteressanten Themas, sowie für die überaus freundliche Aufnahme, die hervorragende Betreuung und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Außerdem besteht mein großer Dank Frau Prof. Dr. med. Sigrun Smola und Herrn PD Dr. Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die großartige Unterstützung bei meiner Arbeit sowie der jederzeit möglichen Diskussionsbereitschaft und der wahnsinnig schnellen Hilfe im Falle einer Frage oder eines Problems. Auch für das Überlassen sämtlicher klinischer Daten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Linxweiler bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Katharina Bastuck (Institut für Virologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) bedanken. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Dankbar anerkennen will ich auch die freundliche immer geduldige Bereitschaft, mir Dinge der Molekularbiologie näher zu bringen. Dies gilt ebenso für die gesamte Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Sigrun Smola, sowie für Juliane Kütten, die die Gewebeschnitte aus den Paraffinblöcken für mich angefertigt hat und Barbara Best, welche die HPV-Tests durchgeführt hat.

Auch den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik gilt mein Dank, die mir bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse große Hilfe geleistet haben.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Bohle und Herrn PD Dr. Matthias Wagner (Klinik für Pathologie Universität des Saarlandes) für die Bereitstellung der Paraffinblöcke mit den Tumorproben, ohne die, diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium ermöglicht hat. Außerdem danke ich meinem Freund Marc Bauer und meinen Freunden für ihre emotionale Unterstützung und dafür, dass sie immer an meiner Seite standen.