

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Inzidenz und Prognose
p16^{INK4a}-assoziierter Tonsillen- und Zungengrundkarzinome
in einer unselektierten Patientenkohorte in Berlin**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

André Zakarneh

aus Hamburg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. U. Keilholz
 2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Kaufmann
 3. Prof. Dr. med. B. Wollenberg

Datum der Promotion: 7.Sep. 2012

Meinen wundervollen Kindern

Lea & Anton

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Ätiologie	2
1.3. HPV	3
1.4. p16 ^{INK4a}	4
1.5. Stadieneinteilung	5
1.6. Therapie und Prognose	7
1.7. Zielsetzung	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1. Patientenkollektiv	10
2.2. Elektronischer Fragebogen	11
2.3. Tumorgewebe	12
2.3.1. Immunhistochemische Untersuchung des p16 ^{INK4a} -Status	12
2.3.1.1. Prinzip	12
2.3.1.2. Färbeprotokoll (Zytomed Systems)	13
2.3.1.3. Histopathologische Auswertung der p16 ^{INK4a} -Färbung	14
2.4. Kontrollgruppe	14
2.5. Statistische Auswertung	14
3. ERGEBNISSE	16
3.1. Patientenkollektiv	16
3.2. Raucher- und Alkoholanamnese	16

3.3.	TNM-Stadien.....	18
3.4.	Tumorstadien.....	20
3.5.	Histologie.....	21
3.5.1.	Verhornung.....	21
3.5.2.	Grading.....	21
3.5.3.	L-Status.....	22
3.5.4.	V-Status.....	22
3.6.	Halslymphknotenstatus.....	22
3.7.	p16 ^{INK4a} -Status.....	23
3.7.1.	Gesamtkohorte.....	23
3.7.2.	Histologie.....	25
3.7.3.	L-Status.....	25
3.7.4.	V-Status.....	25
3.7.5.	Tumorlokalisation.....	26
3.7.6.	Patientengeschlecht.....	26
3.7.7.	Raucheranamnese.....	27
3.7.8.	Alkoholanamnese.....	28
3.7.9.	T-Stadium.....	28
3.7.10.	N-Stadium.....	29
3.7.11.	Tumor-Stadium.....	31
3.7.12.	Halslymphknotenmetastasen.....	32
3.7.12.1.	Extrakapsuläre Ausdehnung.....	33
3.7.12.2.	Zystische Lymphknotenmetastasen.....	34
3.8.	Therapie.....	35
3.8.1.	Therapie / p16 ^{INK4a} -Status.....	36
3.8.2.	Operative Therapie.....	37
3.8.3.	Strahlentherapie.....	37
3.8.4.	Chemotherapie.....	37
3.8.5.	Therapie / Tumorlokalisation.....	38
3.9.	Therapieausdauer.....	39

3.10. Therapieergebnis	39
3.10.1. Therapieergebnis / Tumorlokalisation	39
3.10.2. Therapieergebnis / Raucheranamnese	40
3.10.3. Therapieergebnis / Alkoholanamnese	41
3.10.4. Therapieergebnis / p16 ^{INK4a} -Status	41
3.11. Verlauf	42
3.11.1. Nachbeobachtung	42
3.11.2. Rezidivfreiheit	42
3.11.3. Verlauf / Tumorlokalisation	42
3.11.4. Verlauf / Raucheranamnese	43
3.11.5. Verlauf / Alkoholanamnese	43
3.11.6. Verlauf / p16 ^{INK4a} -Status	44
3.12. Überleben	45
3.12.1. Überleben / Gesamtkohorte	45
3.12.2. Überleben / Tumorlokalisation	45
3.12.3. Überleben / Raucheranamnese	45
3.12.4. Überleben / Alkoholanamnese	46
3.12.5. Überleben / p16 ^{INK4a} -Status	47
3.12.6. Überleben / Tumorlokalisation und p16 ^{INK4a} -Status	47
3.12.7. Überlebenszeitanalyse	48
4. DISKUSSION	51
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	62
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
8. TABELLENVERZEICHNIS	76
9. ERKLÄRUNG	77

10.	DANKSAGUNG	78
11.	LEBENS LAUF	79
12.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN.....	80

Abkürzungen

Alk.	Alkohol
CA	Karzinom
CDK	Cyklin abhängige Kinase
CT	Computertomographie
d. F.	der Fälle
d. Z.	der Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
FU	Fluorouracil
HPV	Humanes Papillomavirus
LK	Lymphknoten
Met.	Metastasen
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
M-Stadium	Metastasen-Stadium
N-Stadium	Lymphknoten-Stadium
OP	Operation
PCR	Polymerasekettenreaktion
pRb	Retinoblastomprotein
prim.	Primär
RCT	Radio-Chemotherapie
RT	Radiotherapie
TH	Therapie
T-Stadium	Tumor-Stadium
S-Phase	Synthesephase

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Kopf-Hals-Karzinome stellen weltweit insgesamt die 6. häufigste aller Tumorerkrankungen dar. Die geschätzte Anzahl dieser Neoplasien betrug in Deutschland im Jahre 2006 etwa 14.750. Das waren ca. 4% aller bösartigen Neuerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland. Oropharynxkarzinome machen hierbei etwa ein Zehntel aller Kopf-Hals-Malignome aus. Für Krebserkrankungen der Mundhöhle- und des Rachens wird eine geschlechtsspezifische Inzidenz bezogen auf 100.000 Einwohner von 19,7 für Männern und 7,0 für Frauen angegeben. Bei höchsten Erkrankungsraten in der Altersgruppe zwischen 55 und 65 Jahren lag das mittlere Erkrankungsalter für Frauen bei 64 und für Männer sogar bei nur 60 Jahren [53].

Weltweit wurde die Anzahl der Neuerkrankungen von Malignomen der Mundhöhle- und des Rachens im Jahre 2002 auf etwa 500.000 geschätzt [72]. In den USA lag die für den Zeitraum 2004 bis 2008 ermittelte Inzidenz für Männer bei 15,7 und für Frauen bei 6,2 bezogen auf 100.000 Einwohner [98]. Der Anteil der Tonsillenkarzinome betrug für Kaukasier 15-17% und für Afroamerikaner sogar 22-23% [24]. Für die Zungen- und Tonsillenmalignome konnte insbesondere bei jungen Erwachsenen in den westlichen Ländern ein Anstieg der Neuerkrankungen aufgezeigt werden [3, 70, 91]. Während die Inzidenz der Karzinome der Gaumen- und Zungengrundtonsillen seit den 1970er Jahren in einem untersuchten Zeitraum von 1973-1995 in den Vereinigten Staaten um jährlich 1,9-2,7% anstieg, blieb die Anzahl der Neuerkrankungen in den übrigen pharyngealen Lokalisationen etwa konstant [24].

Bei den bösartigen Geschwulsten des Oropharynx handelt es sich in über 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Reifungsstufen [36]. In annähernd 80% sind die Tonsillen und der Zungengrund Ausgangspunkt der oropharyngealen Tumorerkrankung.

1.2. Ätiologie

Der Einfluss von Tabak- und Alkoholkonsum auf die Entstehung der Kopf-Hals-Karzinome gilt heute als erwiesen ([23, 65, 102]. Im Tabakrauch konnten über 50 Karzinogene, wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine nachgewiesen werden. Alkohol wirkt auf der Mukosa als Lösungsmittel für andere Karzinogene und wird selbst zu Acetaldehyd verstoffwechselt. Dieser Metabolit behindert die DNA-Synthese und zelluläre Reparaturmechanismen [61]. Das Risiko ein Karzinom zu entwickeln, steigt ab einer Anamnese von 10 Packungsjahren (1 Packungsjahr ist definiert als Konsum einer Schachtel von 20 Zigaretten täglich über 1 Jahr) deutlich an [6, 11, 18]. Alkoholmengen, ab derer sich das Erkrankungsrisiko erheblich erhöht, werden mit ca. 60-80 g/d angegeben [11]. Alkohol- und Tabakkonsum gemeinsam haben nicht nur einen additiven Effekt, sondern erhöhen das Karzinomrisiko multiplikativ [62, 75]. Der Konsum von Tabak und Alkohol zeigt nicht nur einen ätiologischen Zusammenhang mit der Tumorentstehung, sondern hat darüber hinaus auch Einfluss auf den Krankheitsverlauf. So konnte aufgezeigt werden, dass mit zunehmendem Tabakkonsum der Behandlungseffekt abnimmt und die Risiken der verschiedenen Therapiemodalitäten sowie die Mortalitätsrate ansteigen [11, 100].

Als weitere prädisponierende Faktoren gelten eine (berufliche) Schadstoffexposition, schlechte Mundhygiene sowie eine Mangelernährung [63, 85]. Darüber hinaus wird eine genetische Disposition in der Ätiologie der Kopf-Hals-Karzinome angenommen [12, 42].

Gleichzeitig fällt eine Gruppe von Karzinompatienten auf, die die „klassischen“ Risikofaktoren Zigarettenrauchen und chronischen Alkoholabusus nicht oder nur ansatzweise aufweisen. Für diese wird eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) als ursächlich angenommen.

Während der ätiologische Zusammenhang zwischen der Infektion mit sogenannten HPV- Hochrisikotypen und der Entwicklung eines Zervixkarzinoms als bewiesen und weltweit anerkannt gilt, war eine virale Genese der Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome lange Zeit ungewiss. Zwar stammen die ersten relevanten Berichte über den Nachweis von HPV in Kopf-Hals-Malignomen bereits aus dem Jahr 1985 [60], jedoch erst in jüngerer Zeit wurde der kausale Zusammenhang durch detaillierte Analysen untermauert [14, 30, 47, 78, 103]. Hierbei gelten die Gaumen- und

Zungengrundtonsillen als häufigste HPV-assoziierte Karzinomlokalisationen [28, 29, 49].

Im Gegensatz zu den Zervixkarzinomen, die zu annähernd 100% HPV-positiv sind, ist die Häufigkeit des HPV-Nachweises in Oropharynxkarzinomen je nach Studie und geographischer Region sehr unterschiedlich. So konnte beispielsweise in einer globalen multizentrischen Untersuchung in 18,3 % HPV-DNA vom Hochrisiko-Typ detektiert werden, während einer finnischen Arbeitsgruppe der HPV-Nachweis sogar in der Hälfte aller Oropharynxkarzinome gelang [38, 68]. Verschiedene Metaanalysen zeigen eine HPV-Prävalenz bei Karzinomen des Oropharynx von 35 bis 38% und bei Tonsillenkarzinomen allein von 53% an [50, 54, 97]. In über 90% der Fälle wurde hierbei der HPV-Typ 16 nachgewiesen [27, 47].

1.3. HPV

Bei HPV handelt es sich um unbehüllte Viren mit ringförmiger Doppelstrang-DNA, die zur Familie der Papillomaviridae gehören. Es sind mittlerweile weit über 100 Subtypen des Humanen Papillomavirus bekannt.

Eine Übertragung erfolgt überwiegend durch Haut- und Schleimhautkontakt. Etwa 30-40 Subtypen werden primär durch ungeschützten Sexualverkehr (genital, anal, oral) übertragen.

HPV infizieren ausschließlich Epithelzellen und werden in Haut- und Schleimhauttypen unterteilt. Je nach ihrer Potenz gutartige oder maligne Läsionen auszulösen unterscheidet man Niedrigrisiko-Typen (u.a. HPV 6 und 11) von Hochrisiko-Typen (u.a. HPV 16 und 18).

An der äußeren Haut können erstere vorrangig gutartige Warzen auslösen. Darüber hinaus wird eine HPV-assoziierte Ausbildung von prämaligen und malignen invasiven Tumoren am Integumentum insbesondere infolge einer Immunsuppression angenommen [10, 37, 71, 76].

Auch die mukotropen Typen unterscheiden sich in ihrer onkogenen Potenz. Während sich die „low-risk-Typen“ in benignen genitalen Läsionen wie Condylomata acuminata sowie im Kopf-Halsbereich bei der juvenilen Larynxpapillomatose nachweisen lassen, wurden HPV-Typen mit hoher transformierender Potenz in malignen intraepithelialen Neoplasien sowie invasiven Tumoren der Zervix und der Mund- und Rachenschleimhaut gefunden [9, 17, 52, 60, 103].

Voraussetzung für eine Infektion ist das Erreichen der teilungsfähigen epidermalen oder mukosalen Epithelzellen der Basalschicht (Basalzellen). Diese sind möglicherweise im Bereich der Transformationszone von mehrschichtigem Platten- zu einzelligem Zylinderepithel der Zervix uteri sowie im Übergangsbereich zwischen Platten- und Zylinderepithel in den Krypten der Gaumen- und Zungengrundtonsille leichter zugänglich [5, 44].

Nach Internalisierung wird die HPV-DNA freigesetzt und der Replikationsapparat der Wirtszelle genutzt. Die zirkuläre HPV-DNA beinhaltet unterschiedliche spezifische Gen-Regionen, welche u.a. nach dem Zeitpunkt ihrer Expression und Aktivität im Lebenszyklus des Humanen Papillomavirus als frühe Gene („early-genes“) und späte Gene („late-genes“) bezeichnet werden. Diese kodieren entsprechende Proteine („early-“ und „late-proteins“).

In der frühen Phase der Infektion scheinen v.a. die Proteine E5, E6 und E7 von Bedeutung zu sein. So kommt es u.a. durch Komplexbildung von E5 mit dem epidermal-growth-faktor-Rezeptor, dem platelet-derived-growth-factor- β -Rezeptor und dem colony-stimulating-factor-I-Rezeptor zu einer gesteigerten Proliferation in der Basalzellschicht mit lateraler und vertikaler Expansion [41]. E6 und E7 spielen eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese. Sie inaktivieren zwei zelleigene Tumorsuppressorproteine, p53 und das Retinoblastomprotein (pRb), die den Zellzyklus kontrollieren und auf DNA-Schäden reagieren. So bewirkt das virale Onkoprotein E6 u.a. eine Herabsetzung von p53, was zu einer Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose) und zu einer chromosomalen Instabilität mit Akkumulation von DNA-Mutationen führt [64, 69, 80].

Durch die Degradation von pRb durch das virale Onkoprotein E7 werden Transkriptionsfaktoren (E2F) freigesetzt, die wiederum ein Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase und damit auch die Synthese viraler DNA ermöglichen [25].

1.4. p16^{INK4a}

Das im normalen Zellzyklus auf die aktivierende Phosphorylierung von pRb indirekt hemmend und damit antiproliferativ wirkende zelleigene Protein p16^{INK4a} wird gleichzeitig negativ durch pRb rückreguliert. Daher bewirkt die Blockade von pRb, zum Beispiel durch das virale Protein E7 oder aber auch durch Mutation von pRb eine Überexpression von p16^{INK4a} mit einer konsekutiven Anreicherung des entsprechenden

zelleigenen Proteins [52]. Individuen aus den seltenen Familien mit inaktivierender p16^{INK4a}-Mutation weisen mit sehr hoher Penetranz eine deutlich erhöhte Inzidenz auf, unterschiedliche Tumoren zu entwickeln, wodurch zudem der Nachweis der entscheidenden Bedeutung von p16^{INK4a} in der Tumorgenese erbracht ist [86].

Der immunhistologische Nachweis von p16^{INK4a} hat sich bereits als geeigneter Marker für prä-maligne und maligne HPV-assoziierte Läsionen beim Zervix-CA herausgestellt [45, 87].

Auch bei den Oropharynxkarzinomen konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von HPV-DNA mittels PCR und dem immunhistologischen Nachweis des p16^{INK4a}-Proteins aufgezeigt werden [2, 34, 48, 82]. Es wird sogar angenommen, dass die mangelnde Spezifität für einzelne HPV-Subtypen gerade eine besondere Stärke des Nachweises der p16^{INK4a}-Überexpression im Vergleich mit dem HPV-DNA-Nachweis zur Beurteilung einer HPV-Assoziation von Oropharynxkarzinomen ist, da p16^{INK4a} einen verlässlichen Biomarker für das Onkoprotein E7 darstellt. Dieses wiederum gilt gemeinsam mit E6 als Standard bei der Definition eines Tumors als HPV-assoziiert [2]. Ferner scheint der immunhistologische Nachweis einer p16^{INK4a}-Überexpression eine biologisch relevante HPV-Infektion besser aufzuzeigen als der Nachweis von HPV-DNA mittels PCR, bei der Kontaminationen leichter zu falsch-positiven Ergebnissen führen können [50]. Im Gegensatz zu HPV induzierten Karzinomen kommt es offenbar bei den durch die „klassischen“ Risikofaktoren ausgelösten Tumoren zu genetischen Defekten die wiederum eine reduzierte p16^{INK4a}-Expression bewirken [43, 81, 99]. Allerdings gibt es eine Ausnahme: Wenn eine genetische Läsion vorliegt, die das Rb-Protein direkt oder indirekt betrifft, dann wird p16^{INK4a} ebenfalls hochreguliert und ist in diesen Fällen kein Marker für eine HPV-Aktivierung. In neueren Studien aus den USA wird die Rate der Patienten mit p16^{INK4a}-Expression und negativer HPV-PCR allerdings mit deutlich unter 10% angegeben. Damit steht die immunhistologische Untersuchung der Expression von p16^{INK4a} als ein leicht verfügbarer und wenig aufwändiger, allerdings indirekter Marker als Hinweis auf ein durch HPV induziertes Oropharynxkarzinoms zur Verfügung [90, 92].

1.5. Stadieneinteilung

Zur Dokumentation, Abschätzung der Prognose und Beurteilung möglicher Therapieoptionen maligner Erkrankungen erfolgt prätherapeutisch das sogenannte

Tumorstaging. Hierbei werden u.a. mittels klinischer und bildgebender Untersuchung die lokale und regionale Ausdehnung des Tumors sowie eine eventuelle Fernmetastasierung beurteilt. Die TNM-Klassifikation stellt die gebräuchlichste Form der Tumorklassifikation dar und variiert für Kopf-Halskarzinome in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors. Dabei beschreibt T die Tumorgöße bzw. dessen Ausdehnung auf anatomische Nachbarstrukturen, N das Ausmaß des Befalls regionärer Lymphknoten und M eine etwaige Fernmetastasierung. Liegen der Abschätzung des Tumorstadiums nur klinische Untersuchungen zugrunde, wird dieses durch den entsprechenden Zusatz kenntlich gemacht (cTNM). Basiert das festgelegte Tumorstadium dagegen auf einer histopathologischen Untersuchung, z.B. nach chirurgischer Entfernung des Tumors und der regionären Lymphknoten, wird ein „p“ der entsprechenden TNM-Kategorie vorangestellt (z.B. pT1 pN2a M0).

Für Karzinome der Tonsillen und des Zungengrundes, die definitionsgemäß dem Oropharynx zugeordnet werden, gilt folgende TNM-Klassifikation [105], die auch dieser Arbeit zugrunde gelegt wurde:

Tab. 1 - TNM-Klassifikation der Oropharynxkarzinome

T1	Tumor ≤ 2cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2cm, aber ≤ 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4cm in größter Ausdehnung
T4	a Befall von Larynx, äußerer Zungenmuskulatur, Unterkiefer, hartem Gaumen
	b Befall von Schädelbasis, Arteria carotis
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen LK; ≤ 3cm in größter Ausdehnung
N2	a Metastase in solitärem ipsilateralen LK; > 3cm, aber ≤ 6cm in größter Ausdehnung
	b Metastasen in multiplen ipsilateralen LK; ≤ 6cm in größter Ausdehnung
	c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen LK; ≤ 6cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in regionären LK; ≥ 6 cm in größter Ausdehnung
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Aus den TNM-Kategorien ergeben sich folgende Tumorstadien nach der Union internationale contre le cancer (UICC) [106]:

Tab. 2 - UICC-Tumorstadien

Stadium	TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0; T1-3 N1 M0
IV a	T4 N0-1 M0; T1-4 N2 M0
IV b	T1-4 N3 M0
IV c	T1-4 N0-3 M1

In Ergänzung zu den o.g. Kategorien der Tumorklassifikation haben sich weitere Angaben bei der Beschreibung von Kopf-Hals-Malignomen etabliert, da diese einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben scheinen. So werden eine etwaige Invasion von Lymphgefäßen (L0 bzw. L1) und von Venen (V0 bzw. V1) beurteilt, sofern diese durch eine histopathologischen Untersuchung beurteilt werden konnte [107]. Darüber hinaus werden nach einer chirurgischen Therapie die Schnittränder des Exzidates pathologisch untersucht, um die Wahrscheinlichkeit von verbliebenen Tumorresten einzuschätzen. Grundsätzlich sind tumorfreie Schnittränder (R0) anzustreben. Mikroskopische (R1) oder makroskopische (R2) Tumorausläufer im Resektionsrand erhöhen das Rezidivrisiko. Ferner wird im Rahmen der feingeweblichen Untersuchung, meist bereits im Rahmen der Diagnosestellung durch eine Tumorbiopsie, neben dem histologischen Typ auch der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes beurteilt. Dieses sogenannte Grading unterscheidet stufenweise gut und mäßig differenzierte (G1 bzw. G2) von schlecht und undifferenzierten (G3 bzw. G4) Tumoren.

1.6. Therapie und Prognose

Das therapeutische Vorgehen in der Behandlung der Kopf-Hals-Karzinome wird immer noch kontrovers gehandhabt. Für die Behandlung stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Neben der in Abhängigkeit von der Operabilität primär chirurgischen Vorgehensweise, einschließlich notwendiger rekonstruktiver Maßnahmen bis hin zum

freien mikrovaskulären Gewebetransfer und der gleichzeitigen Sanierung der zervikalen Lymphabflusswege, bildet die primäre Strahlentherapie die zweite Säule der kurativen Behandlung dieser Tumorentität.

Bei Oropharynxkarzinomen in Frühstadien (I u. II) sehen die interdisziplinären Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft in der primären Radiotherapie eine Alternative zur Tumorresektion [8]. Gleichwertigkeit dieser beiden Therapieansätze wird auch für fortgeschrittene Tumorstadien postuliert [67]. Da dennoch beide Behandlungsverfahren allein, insbesondere bei operablen aber lokal fortgeschrittenen Tumoren, keine befriedigende lokoregionäre Tumorkontrolle erreichen konnten, hat sich eine Kombination aus Operation und adjuvanter Strahlentherapie in Deutschland als Standardbehandlung etabliert. Ein signifikanter Unterschied der Überlebensraten von chirurgischer und nicht-chirurgischer Behandlung ließ sich vielfach jedoch nicht aufzeigen [73, 89]. Die simultane Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie konnte laut einer großen Metaanalyse durch Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle im Vergleich zur alleinigen Radiatio einen Überlebensgewinn von 6,5% nach 5 Jahren erreichen [77]. Zytostatische Substanzen die hierbei vorrangig eingesetzt werden sind Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil und Mitomycin C. Neuere Studien zeigen für lokal fortgeschrittene inoperable Tumoren einen Vorteil im progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben für die Induktionschemotherapie unter Hinzunahme von Docetaxel zu Cisplatin und 5-FU [101]. Auch eine Radiatio in Kombination mit einer Blockade des EGF-Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab weisen eine Verbesserung der Überlebensraten im Vergleich mit der alleinigen Strahlentherapie auf [7].

Während bisher vorrangig das Tumorstadium, insbesondere unter Berücksichtigung histopathologischer Kriterien wie Tumorgröße, histologischer Subtyp, Grading, lymphovaskuläre Infiltration sowie der Status der Resektionsränder und der zervikalen Lymphknoten, als Prognoseparameter galt [107], stellt sich zunehmend auch der HPV-Status bzw. die p16^{INK4A}-Expression als bedeutender Prognosefaktor heraus. Obwohl HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome häufig ein fortgeschritteneres Tumorstadium zeigen, was sich vor allem in einem erhöhten Risiko für eine Lymphknotenmetastasierung ausdrückt [26, 34, 74, 93], scheint diese Tumorentität gerade bei Oropharynxkarzinomen eine bessere Prognose aufzuweisen [13, 27, 57, 58, 59, 66]. In der Mehrheit der Studien lag das Gesamtüberleben nach 5 Jahren für HPV-positive

Oropharynxmalignome bei bis zu 80% und für HPV-negative bei 30 bis 35%, scheinbar ungeachtet der spezifischen Therapie [31]. Im Vergleich mit dem PCR-basierten HPV-Nachweis konnte insbesondere für p16^{INK4a}-positive Tumore ein signifikant besseres rezidivfreies Überleben aufgezeigt werden [82].

1.7. Zielsetzung

Hauptaufgabe dieser retrospektiven Arbeit ist die Erfassung des immunhistologischen p16^{INK4a}-Status bei Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen zur Abschätzung einer möglichen HPV-induzierten Tumorgenese am Patientenkollektiv der HNO-Abteilung des Berliner Sankt Gertrauden Krankenhaus. Hierbei soll die Assoziation des p16^{INK4a}-Status mit der Nikotinanamnese und dem Alkoholkonsum untersucht werden. Weiterhin soll die Verteilung der Tumorstadien und deren Abhängigkeit von o.g. Parametern untersucht werden. Ferner ist von Interesse, ob sich die beiden Tumorlokalisationen bezüglich dieser Untersuchungskriterien unterscheiden. Mit dieser Arbeit soll in einer definierten lokalen Bevölkerungsgruppe in Deutschland untersucht werden, wie häufig HPV bzw. Rauchen und Alkohol als Ursache dieser Karzinomgruppe anzusehen sind, und wie groß die Gruppe von Patienten ist, bei der mehrere Risikofaktoren vorliegen. Darüber hinaus sollen Überlebensanalysen bezogen auf den p16^{INK4a}-Status sowie die o.g. Risikofaktoren durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Mit Hilfe der elektronischen Patientenerfassung (SAP/ITB.Med) wurden alle in dem 5 jährigen Zeitraum vom 1.1.2005 bis zum 31.12.2009 in der HNO-Abteilung des Sankt Gertrauden Krankenhauses in Berlin-Wilmersdorf wegen eines Kopf-Hals-Malignomes behandelten Patienten ermittelt. Diese wurden anhand von Aufzeichnungen in den Krankenakten, einschließlich der Operationsprotokolle und der Befundberichte der bildgebenden Untersuchungsverfahren, hinsichtlich der genauen Tumorlokalisation sowie der histopathologischen Entität bewertet.

Insgesamt wurden in diesem Zeitraum 895 Patienten mit Malignomen im Kopf-Hals-Bereich behandelt. In 239 Fällen handelte es sich um Oropharynxkarzinome.

Folgende Kriterien mussten für jeden einzelnen Fall zur Aufnahme in diese Studie erfüllt sein:

- Histologisch gesichertes Karzinom
- Tumorlokalisation im Bereich der Gaumenmandeln oder des Zungengrundes
- Bestimmung der TNM-Formel / des Tumorstadiums musste aus dem systematisch dokumentierten HNO-Untersuchungsstatus, den radiologischen Befunddokumentationen und dem endoskopischen Untersuchungsbericht (ggf. dem postoperativen histopathologischen Befundbericht) möglich sein
- Vorliegen von Anamnesedaten zum Nikotin- und Alkoholkonsum
- Verfügbarkeit von histologischem Material zur Bestimmung der p16^{INK4a}-Expression

Hierbei wurden in 60 Fällen die Gaumentonsillen und in 54 Fällen der Zungengrund als Ausgangspunkt der Karzinomerkrankung festgestellt. In den übrigen Fällen der Oropharynxkarzinome handelte es sich um andere Lokalisationen oder eine spezifische Zuordnung konnte aufgrund der ungenauen Dokumentation oder der weiten Ausdehnung der Erkrankung nicht oder nur unzureichend erfolgen.

Die Anamnesedaten wurden aus den standardisierten Anamnesebögen der ambulanten- und der stationären Patientenakten entnommen. Zusätzlich wurden die prätherapeutischen Untersuchungsbefunde, die in allen Fällen eine Beurteilung der Tumorausdehnung im Rahmen einer Panendoskopie in Narkose, eine

Schnittbilduntersuchung des Halses (CT u./o. MRT), mindestens eine Röntgenthoraxuntersuchung sowie eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens und eine histologische Untersuchung der Tumorgewebebiopsie beinhalteten, ausgewertet. Ferner wurden etwaige Operationen und die sich daraus ergebenden histopathologischen Untersuchungen der OP-Präparate erfasst. Aus diesen Daten wurde das entsprechende Tumorstadium abgeleitet. Im Falle einer sich anschließenden, in einer externen Einrichtung durchgeführten strahlentherapeutischen und ggf. internistisch-onkologischen Behandlung wurden die entsprechenden Therapieschemata aus den Behandlungsberichten entnommen. Nach abgeschlossener Therapie wurden die Patienten regelmäßig in der ambulanten Tumorsprechstunde und in der Mehrzahl auch im Rahmen einer Kontroll-Panendoskopie stationär nachuntersucht. Die entsprechenden Befundberichte wurden in die Auswertung einbezogen. Hatten sich Patienten im Verlauf länger nicht mehr in der Tumorsprechstunde vorgestellt, wurden die behandelnden Fachärzte sowie die Patienten selbst telefonisch kontaktiert und der Krankheitsverlauf, ggf. mit erneuter ambulanter Einbestellung und Untersuchung, ermittelt. Bei verstorbenen Patienten wurden, sofern kein Befundbericht vorlag, der behandelnde Hausarzt u./o. Facharzt sowie die Angehörigen telefonisch kontaktiert und das Sterbedatum sowie die Todesursache erfragt.

2.2. Elektronischer Fragebogen

Für jeden der 114 Patienten wurden die Daten mittels eines elektronischen Fragebogens (Electronic Case Report Form) gesammelt. Dieser ist am Anhang beigefügt und umfasste folgende Kriterien:

1. Geburtsdatum, Geschlecht
2. Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung
3. Nikotinanamnese
4. Alkoholkonsum
5. Zweitmalignom(e)
6. Tumorlokalisation
7. Tumorhistologie
8. Art der Histologiegewinnung
9. Lymphknotenstatus

11. Tumorstaging
12. p16^{INK4a}-Status d. Primärtumors
13. p16^{INK4a}-Status d. LK-Metastasen
14. p16^{INK4a}-Status bei Rezidiv
15. Therapieregime
16. Art / Umfang einer etwaigen Operation
17. etwaige applizierte Gesamtstrahlendosis
18. etwaige applizierte Zytostatika
19. Therapieausdauer
20. Therapieergebnis
21. etwaiges Rezidiv
22. Überlebenszeit
23. Nachbeobachtungszeit

2.3. Tumorgewebe

Das im Rahmen der Panendoskopien und ggf. durch die nachfolgenden Operationen gewonnene Tumorgewebe einschließlich etwaiger Lymphknotenmetastasen wurde unmittelbar nach der Entnahme im Operationssaal in 4%igem Formalin fixiert und in der Abteilung für Pathologie des Sankt Gertrauden Krankenhauses in Paraffin eingebettet. Die archivierten Paraffinblöcke wurden nachträglich zum Nachweis von p16^{INK4a} durch die Mitarbeiter des gleichen Instituts immunhistochemisch untersucht.

2.3.1. Immunhistochemische Untersuchung des p16^{INK4a} -Status

2.3.1.1. Prinzip

Bei Formalin fixiertem Gewebematerial muss zunächst die durch die Fixierung hervorgerufene Proteinvernetzung (Cross-Linking) und die damit verbundene Maskierung des Antigens aufgehoben werden. Das geschieht durch das sogenannte „Heat Induced Epitop Retrieval“ (HIER) mit 120°C heißem Citratpuffer (10 mM, pH 6,0).

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem monoklonalen Maus Antikörper gegen p16^{INK4a}, welcher sich spezifisch an das entsprechende Epitop im Gewebe anlagert.

Es schließt sich die Detektion des gebundenen Primärantikörpers über einen Brückenantikörper an. Bei diesem auch als *PostBlock* bezeichneten Reagenz handelt

es sich um einen Antikörper aus dem Kaninchen, der spezifisch an Maus-Immunglobuline bindet.

Bei dem darauf folgenden Inkubationsschritt lagert sich ein Ziegenantikörper, der gegen Kaninchen gerichtet ist, an den *Post Block*-Antikörper an. Dieser Ziegenantikörper ist an eine Peptidkette gekoppelt, die eine Vielzahl Moleküle des Enzyms *Alkalische Phosphatase* trägt. Die Visualisierung erfolgt schließlich über eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart eines Chromogens, das auf dem Präparat im Bereich des nachzuweisenden Antigens p16^{INKa} präzipitiert und schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht.

2.3.1.2. Färbeprotokoll (Zytomed Systems)

- Anfertigen von 2 µm dünnen Paraffinschnitten
- Trocknen der Schnitte im Trockenschrank bei 37°C über Nacht
- Entparaffinieren der Schnitte für 20 min in Xylol
- Rehydratisierung in absteigender Alkoholreihe; je 2 min pro Alkohol
- Spülen mit fließendem Leitungswasser
- Heat Induced Epitop Retrieval mit Citratpuffer pH 6,0; für 10 min im Schnellkochtopf
- Spülen mit fließendem Leitungswasser
- Spülen mit Waschpuffer
- Inkubation mit dem Primärantikörper anti p16^{INK4a} der Fa. DiagnosticBiosystems 1:150
- Spülen mit Waschpuffer
- Detektion mit dem *ZytoChem PolymerAP Kit* der Fa. Zytomed Systems
- Inkubation mit *Post Block* für 20 min
- Spülen mit Waschpuffer
- Inkubation mit *Polymer/AP* für 30 min
- Spülen mit Waschpuffer

- Inkubation mit *Permanent Red* für 12 min
- Spülen mit Leitungswasser
- Gegenfärben mit Hämatoxylin für 2 min
- Bläuen mit fließendem Leitungswasser für 10 min
- Aufsteigende Alkoholreihe 2 min je Alkohol
- Xylol 10 min
- Eindecken mit permanentem Eindeckmedium

2.3.1.3. Histopathologische Auswertung der p16^{INK4a}-Färbung

Bei der Auswertung des immunhistochemisch bearbeiteten Tumorgewebes wurde die Anfärbung des Zytoplasmas sowie des Zellkerns beurteilt und wie folgt eingeteilt:

- nukleär positiv
- zytoplasmatisch positiv
- nukleär u. zytoplasmatisch positiv
- negativ

Die Anfärbbarkeit wurde entsprechend der Angaben von Klaes et al. [45] als sporadisch positiv (5-10% der Zellen), fokal positiv (>10-30% d. Z.), diffus positiv (>30-85% d. Z.) oder negativ klassifiziert. Die Beurteilung erfolgte durch die Mitarbeiter der Abteilung für Pathologie des Sankt Gertrauden Krankenhauses.

2.4. Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe hinsichtlich des p16^{INK4a}-Status wurden 14 adoleszente Patienten, die aufgrund einer chronischen Tonsillitis im Sankt Gertrauden Krankenhaus tonsillektomiert worden waren, herangezogen. Auch dieses Gewebe wurde immunhistologisch in o.g. Weise untersucht.

2.5. Statistische Auswertung

Die retrospektiv erhobenen Krankheitsdaten wurden hinsichtlich potentieller prognostischer Parameter in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité Campus Benjamin

Franklin statistisch ausgewertet. Hierzu wurden zunächst alle Patientendaten im o.g. elektronischen Fragebogen erfasst und in ein Datenbanksystem auf der Basis von SPSS (Standardversion, SPSS 19.0) übertragen. Die Datenauswertung erfolgte zunächst deskriptiv. Als Verfahren der deskriptiven Statistik wurden der Mittelwert, absolute und relative Häufigkeitsverteilungen, der Median und die Standardabweichung verwendet. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier kalkuliert und für Unterschiede mit dem log-rank-Test ausgewertet. Die multivariaten Analysen erfolgten dabei durch Cox-Regressions Berechnungen zur Evaluation prognostischer Parameter. Als Signifikanzniveau wurde für alle Testverfahren eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Im Zeitraum vom 1.1.2005 bis 31.12.2009 wurden insgesamt 895 Patienten mit Malignomen im Kopf-Hals-Bereich in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten des Sankt Gertrauden-Krankenhaus behandelt.

In 239 Fällen handelte es sich um Oropharynxkarzinome. Hiervon wurden 114 Patienten aufgrund o.g. Einschlusskriterien der vorliegenden Arbeit als Kollektiv zugrunde gelegt. Die beiden untersuchten Tumorlokalisationen waren mit 60 (52,63%) Tonsillenmalignomen und 54 (47,37%) Karzinomen des Zungengrundes nahezu gleich verteilt.

Das Kollektiv beinhaltete 83 Männer (72,81%) und 31 Frauen (27,19%). Das Alter bei Erstdiagnose lag zwischen 36,0 und 86,0 Jahren, im Mittel bei 61,4 Jahren mit einem Median von 62,8 Jahren. Das Durchschnittsalter der Männer entsprach mit 61,7 Jahren (36,0-86,0 J.) nahezu dem der Frauen, welches bei 61,3 Jahren (41,7-80,5 J.) lag.

Die Tumorlokalisationen verteilten sich bezogen auf das Geschlecht wie folgt:

Tab. 3 - Tumorlokalisation / Geschlecht

Geschlecht	Gesamt		Tonsille		Zungengrund	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Männer	83	72,8	42	70,0	41	75,9
Frauen	31	27,2	18	30,0	13	24,1
	114	100,0	60	100,0	54	100,0

3.2. Raucher- und Alkoholanamnese

Unter den 114 untersuchten Patienten fanden sich 92 (80,7%) mit einer aktuellen oder ehemaligen Raucheranamnese. Der Risikofaktor Alkohol war in annähernd der Hälfte des Patientenkollektives zu eruieren. Während im Geschlechtervergleich unter den Männern und Frauen nahezu der gleiche Anteil an Nichtrauchern vorlag, zeigte sich hinsichtlich der Alkoholanamnese ein geschlechtsspezifischer Unterschied. So gaben mehr als Zweidrittel aller Frauen an, selten oder gar keinen Alkohol zu konsumieren.

Bei den Männern war die Alkoholanamnese in 53% d. F. positiv, in nahezu einem Viertel lag eine Alkoholkrankheit vor.

Tab. 4 - Raucheranamnese / Geschlecht

Rauchgewohnheiten	Gesamt		Männer		Frauen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Raucher	70	61,4	48	57,8	22	70,9
ehemalige Raucher*	22	19,3	19	22,9	3	9,7
Nichtraucher	22	19,3	16	19,3	6	19,4
	114	100,0	83	100,0	31	100,0

* seit ≥ 10 Jahre Nichtraucher

Tab. 5 - Alkoholanamnese / Geschlecht

Alkoholanamnese	Gesamt		Männer		Frauen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
kein/selten Alkohol	60	52,6	39	47,0	21	67,7
regelmäßig Alkohol	31	27,2	24	28,9	7	22,6
(trockene/r) Alkoholiker/in	23	20,2	20	24,1	3	9,7
	114	100,0	83	100,0	31	100,0

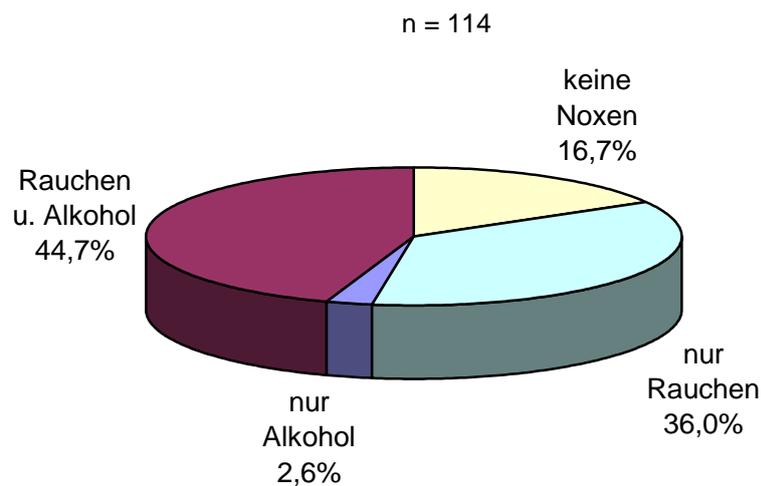


Abb. 1 - Rauchen und/oder Alkohol

3.3. TNM-Stadien

Unter den T-Stadien war das T2-Stadium im Gesamtkollektiv am häufigsten vertreten. Bei der Betrachtung der einzelnen Tumorlokalisationen zeigten sich für die Tonsillenkarzinome überwiegend frühe (T1/T2), für die Zungengrundtumore in mehr als der Hälfte späte T-Stadien (T3/T4).

Bei der Auszählung der N-Stadien war die ipsilaterale Manifestation von mehr als einer Lymphknotenmetastase kleiner 6cm (N2b) am häufigsten vertreten. In knapp über einem Viertel des Kollektivs waren keine nodalen Filiae zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachweisbar. Im Vergleich der beiden untersuchten Tumorlokalisationen zeigten die Zungengrundkarzinome häufiger eine kontra- oder bilaterale Lymphknotenmetastasierung als die Tonsillenkarzinome.

Fernmetastasen (M1-Stadium) lagen initial bei 3 Patienten vor. Hierbei handelte es sich in allen Fällen um pulmonale Filiae. In einem Fall eines Zungengrundkarzinoms lagen zusätzlich zerebrale Metastasen vor.

Tab. 6 - Verteilung der TNM-Stadien / Tumorlokalisation

		Tonsillen-Ca		Zungengrund-Ca		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
T-Stadium	T1	20	33,3	4	7,4	24	21,0
	T2	25	41,7	18	33,3	43	37,7
	T3	8	13,3	15	27,8	23	20,2
	T4a	6	10,0	16	29,6	22	19,3
	T4b	1	1,7	1	1,9	2	1,8
			60	100,0	54	100,0	114
N-Stadium	N0	16	26,6	14	26,0	30	26,3
	N1	9	15,0	7	13,0	16	14,0
	N2a	6	10,0	4	7,4	10	8,8
	N2b	24	40,0	16	29,6	40	35,1
	N2c	4	6,7	10	18,5	14	12,3
	N3	1	1,7	3	5,5	4	3,5
		60	100,0	54	100,0	114	100,0
M-Stadium	M0	59	98,3	52	96,3	111	97,4
	M1	1	1,7	2	3,7	3	2,6
		60	100,0	54	100,0	114	100,0

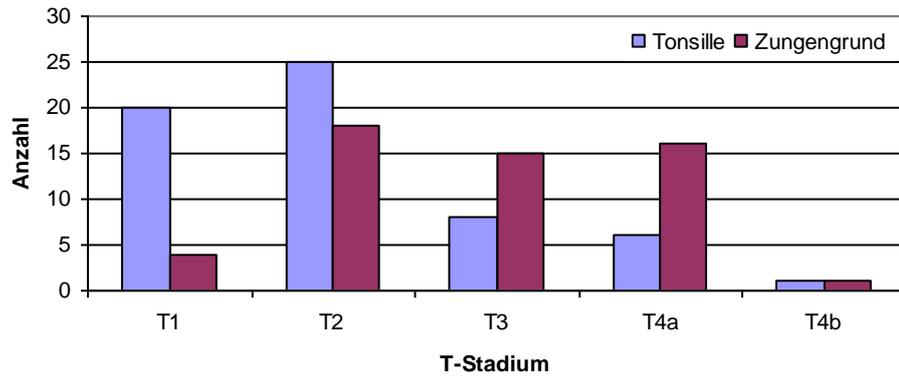


Abb. 2 - Verteilung der T-Stadien / Tumorlokalisation

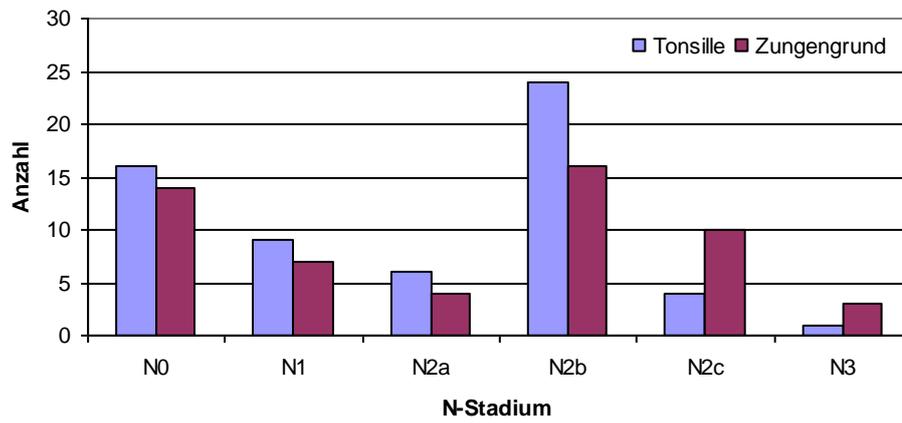


Abb. 3 - Verteilung der N-Stadien / Tumorlokalisation

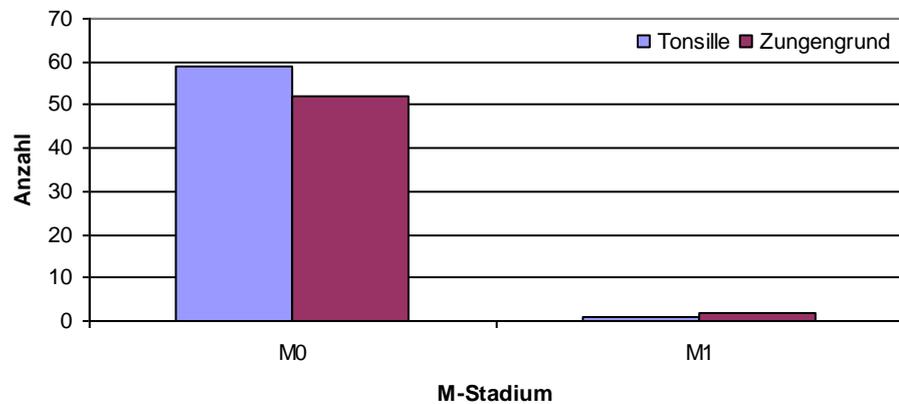


Abb. 4 - Verteilung der M-Stadien / Tumorlokalisation

3.4. Tumorstadien

Die Auswertung der Tumorstadien ergab, dass in über Zweidritteln bereits ein Stadium IV vorlag. Mit 61,4% dominierte Stadium IVa. Hinsichtlich der beiden Tumorlokalisationen bestand lediglich beim Stadium I ein deutlicher Unterschied zugunsten der Tonsillenkarzinome. Die übrigen Stadien waren hinsichtlich der beiden Tumorregionen in etwa gleichhäufig vertreten.

Tab. 7 - Verteilung der Tumorstadien / Tumorlokalisation

Stadium	Tonsillen-Ca		Zungengrund-Ca		Gesamt	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
I	6	5,3	1	0,9	7	6,2
II	6	5,3	5	4,4	11	9,7
III	10	8,7	9	7,9	19	16,6
IVa	36	31,5	34	29,8	70	61,3
IVb	1	0,9	3	2,6	4	3,5
IVc	1	0,9	2	1,8	3	2,7
	60	52,6	54	47,4	114	100,0

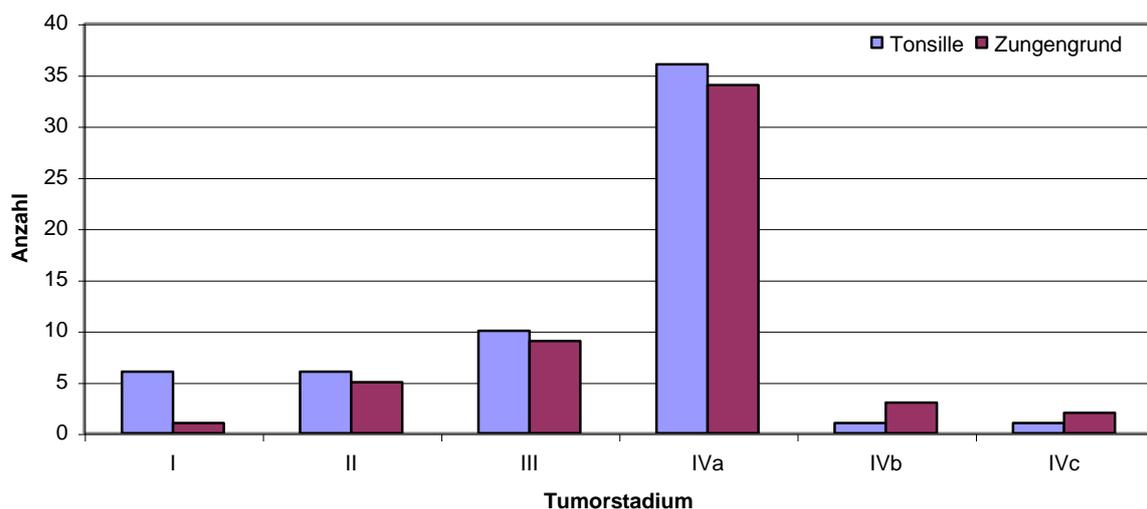


Abb. 5 - Verteilung der Tumorstadien / Tumorlokalisation

3.5. Histologie

In 67 Fällen (59%) lag eine histologische Aufarbeitung des Tumorexzidates vor. Bei 47 Patienten (41%) war lediglich die Untersuchung einer Gewebebiopsie zur Klärung des histologischen Befundes möglich gewesen.

In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um ein Plattenepithelkarzinom. Seltener lag ein basaloides Karzinom vor. Lymphoepitheliale und undifferenzierte Karzinome stellten Ausnahmen dar.

Tab. 8 - Histologieverteilung

Histologie	Anzahl	%
Plattenepithelkarzinom	93	81,5
Basaloides Karzinom	18	15,8
Lymphoepitheliales Karzinom	2	1,8
Undifferenziertes Karzinom	1	0,9
	114	100,0

3.5.1. Verhornung

Eine Verhornung wurde bei 42 Tumoren (37%) beobachtet. In 72 Fällen (63%) fanden sich unverhornende Karzinome.

3.5.2. Grading

Die Differenzierung der Tumorzellen war überwiegend mäßig, seltener schlecht. In jeweils einem Fall lag ein gut differenziertes sowie undifferenziertes Karzinom vor.

Tab. 9 - Histologisches Grading

Grading	Anzahl	%
gut differenziert	1	0,9
mäßig differenziert	91	79,8
schlecht differenziert	21	18,4
undifferenziert	1	0,9
	114	100,0

3.5.3. L-Status

Die histologische Aufarbeitung der Tumorpräparate konnte in 9 Fällen (7,9%) eine Lymphangioinvasion (L1) nachweisen. Bei 57 Patienten (50%) bestand ein L0-Status. In 48 Fällen (42,1%) war keine Beurteilung einer etwaigen Lymphangioinvasion möglich.

3.5.4. V-Status

Eine histologisch erkennbare Tumorausdehnung in venöse Gefäße (V1) lag in 3 Fällen (2,6%) vor. Bei 56,1% (64 Pat.) konnte keine Veneninvasion (V0) nachgewiesen werden. In 47 Fällen (41,2%) war eine entsprechende Untersuchung nicht erfolgt.

3.6. Halslymphknotenstatus

In 65 Fällen (56,1%) der untersuchten Tonsillen- und Zungengrundkarzinome war im Verlauf der Behandlung eine Lymphknotenausräumung im Sinne einer Neck-dissection erfolgt. Die pathologische Aufarbeitung der Resektate hatte bei 13 Patienten keine Lymphknotenmetastasen nachweisen können. Bei 52 Patienten waren histologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen worden. Bei diesen lagen durchschnittlich 3,7 Lymphknotenmetastasen (1-17) vor. Der Median lag bei 2 Lymphknotenmetastasen bezogen auf alle positiven Neck-dissection-Präparate.

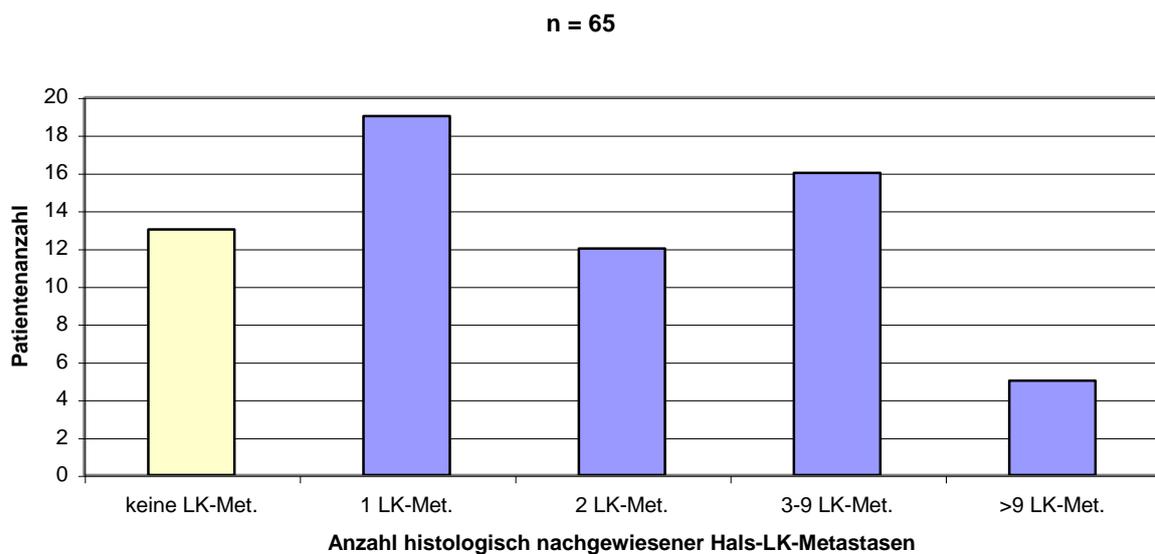


Abb. 6 - Anzahl histologisch nachgewiesener zervikaler Lymphknotenmetastasen

Bei 18 Patienten konnte ein kapselüberschreitendes Wachstum der Lymphknotenmetastasen beobachtet werden. In 33 Fällen der insgesamt 56 zervikal metastasierten Patienten war das Wachstum auf den Lymphknoten beschränkt. In einem Fall war diesbezüglich keine eindeutige Aussage möglich.

Histologisch oder bildmorphologisch fanden sich in 13 Fällen zystische Halslymphknotenmetastasen. Hierbei lagen ausnahmslos Tonsillenkarcinome als Primärtumore vor.

3.7. p16^{INK4a}-Status

3.7.1. Gesamtkohorte

In nahezu Zweidritteln der untersuchten Tumore bestand immunhistochemisch ein positiver p16^{INK4a}-Status. Hierbei lag in der Mehrzahl eine Überexpression von p16^{INK4a} nur im Zytoplasma, etwas seltener im Zytoplasma und Kern vor. Keines der Präparate zeigte einen ausschließlich nukleären p16^{INK4a}-Nachweis.

Bei 70 der 73 p16^{INK4a}-assoziierten Tumore wurde das Ausmaß der p16^{INK4a}-Positivität als diffus eingestuft, d.h. bei diesen war in mehr als 30 bis 85% der Zellen eine p16^{INK4a}-Überexpression nachweisbar. Die übrigen drei Fälle wiesen nur bei 10-30% der Tumorzellen einen immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a} auf und wurden daher als fokal positiv klassifiziert.

Tab. 10 - p16^{INK4a}-Status der Primärtumore

p16-Status			Gesamt	
	Anzahl	%	Anzahl	%
	nukleär positiv	0	0	
p16-positiv	zytoplasmatisch positiv	44	38,6	73
	nukleär u. zytoplasmatisch pos.	29	25,4	
p16-negativ		41	36,0	41
		114	100,0	114

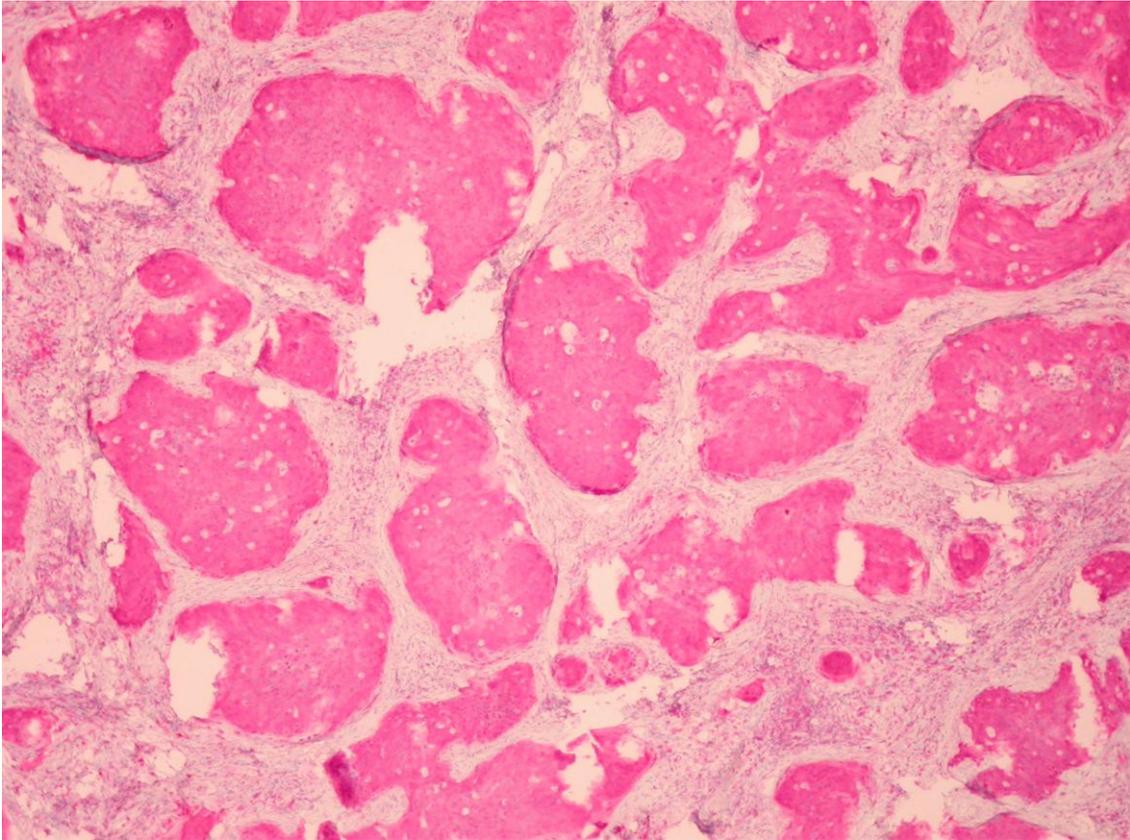


Abb. 7 - p16^{INK4a}-Immunhistologie, Plattenepithelkarzinom der Tonsille, diffus p16^{INK4a}-positive Tumorzellnester

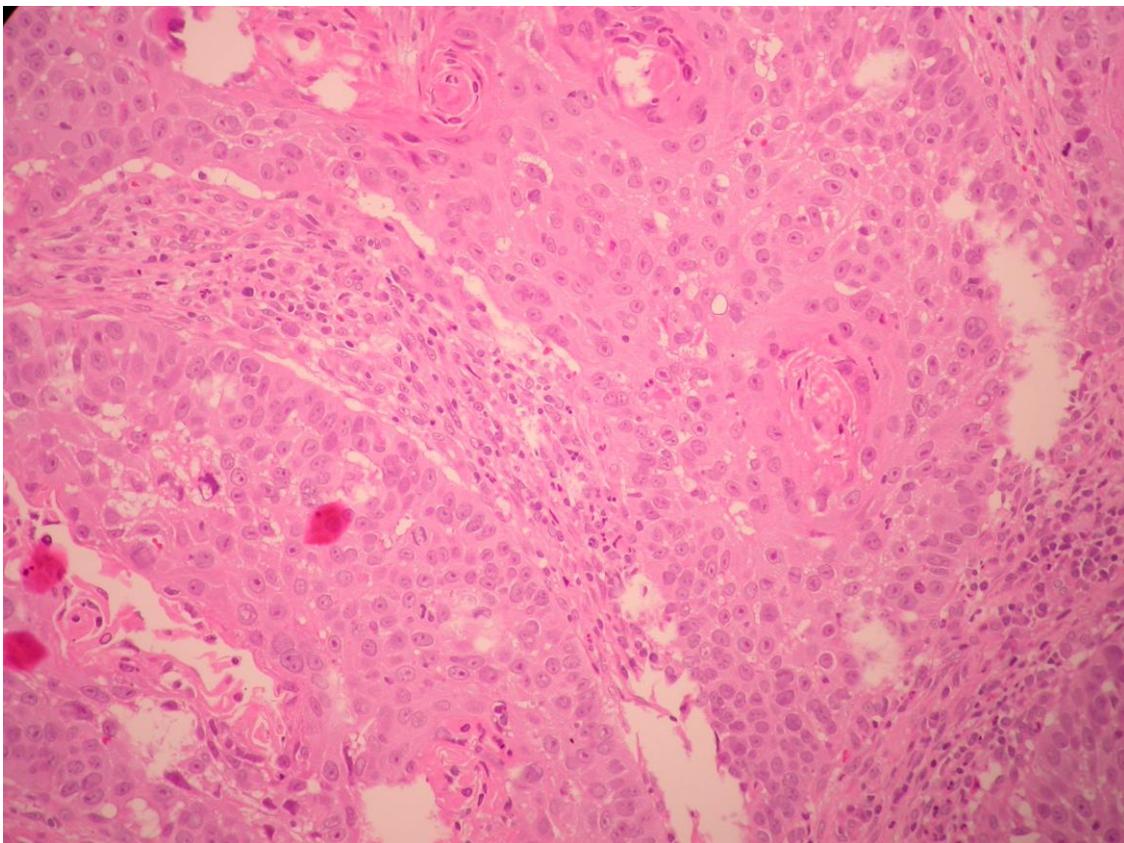


Abb. 8 - p16^{INK4a}-Immunhistologie, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom der Tonsille p16^{INK4a}-negativ

3.7.2. Histologie

Während die Plattenepithelkarzinome als häufigste histologische Entitäten in über der Hälfte als p16^{INK4a}-positiv eingeschätzt wurden, zeigten bis auf einen Fall alle basaloiden Karzinome eine p16^{INK4a}-Überexpression. Lymphoepitheliale und undifferenzierte Karzinome waren zu seltene Entitäten, um diesbezüglich Tendenzen aufzuzeigen.

Tab. 11 - p16^{INK4a}-Status / Histologie

Histologie	p16-positiv		p16-negativ		Gesamt	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Plattenepithelkarzinom	54	58,1	39	41,9	93	100,0
Basaloides Karzinom	17	94,4	1	5,6	18	100,0
Lymphoepitheliales Karzinom	2	100,0	0	0	2	100,0
Undifferenziertes Karzinom	0	0	1	100,0	1	100,0

3.7.3. L-Status

Bei den 66 Tumorpräparaten, die hinsichtlich einer Lymphangioinvasion beurteilt werden konnten, bestand in Bezug auf den p16^{INK4a}-Status kein nennenswerter Unterschied. So wiesen von den 47 p16^{INK4a}-positiven Präparaten 6 (12,8%) einen L1-Status auf. Bei den 19 Tumorpräparaten ohne p16^{INK4a}-Überexpression war in 3 Fällen (15,8%) eine Ausdehnung in Lymphgefäße nachweisbar.

3.7.4. V-Status

Hinsichtlich eines Einbruches in venöse Gefäße war bei insgesamt nur 3 Fällen mit einem V1-Status keine Tendenz ableitbar. Hierbei handelte es sich in zwei Fällen um p16-positive und einmal um einen p16^{INK4a}-negativen Tumor.

3.7.5. Tumorlokalisation

Mit 44 Fällen waren nahezu Dreiviertel (73,3%) aller Tonsillenkzinome p16^{INK4a}-positiv. 29 (53,7%) der 54 Zungengrundkarzinome zeigten immunhistochemisch eine p16^{INK4a}-Überexpression.

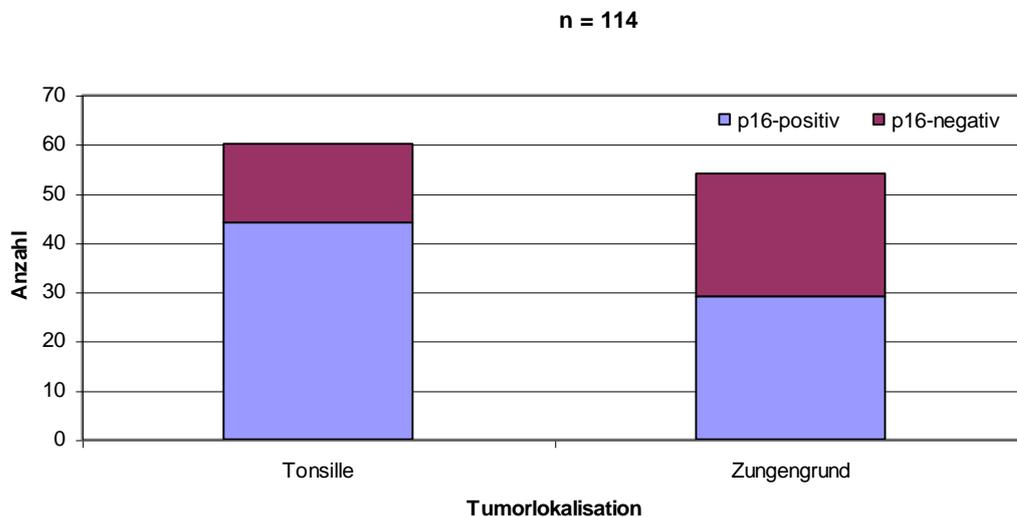


Abb. 9 - p16^{INK4a}-Status / Tumorlokalisation

3.7.6. Patientengeschlecht

Im Geschlechtervergleich bestand eine ähnliche Verteilung des p16^{INK4a}-Status. Unter den Frauen war der Anteil der p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit 21 (67,7%) von 31 noch um 5% höher als in der Gruppe der männlichen Patienten. Hier lag der Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumore bei 62,7% (52 von 83 Patienten).

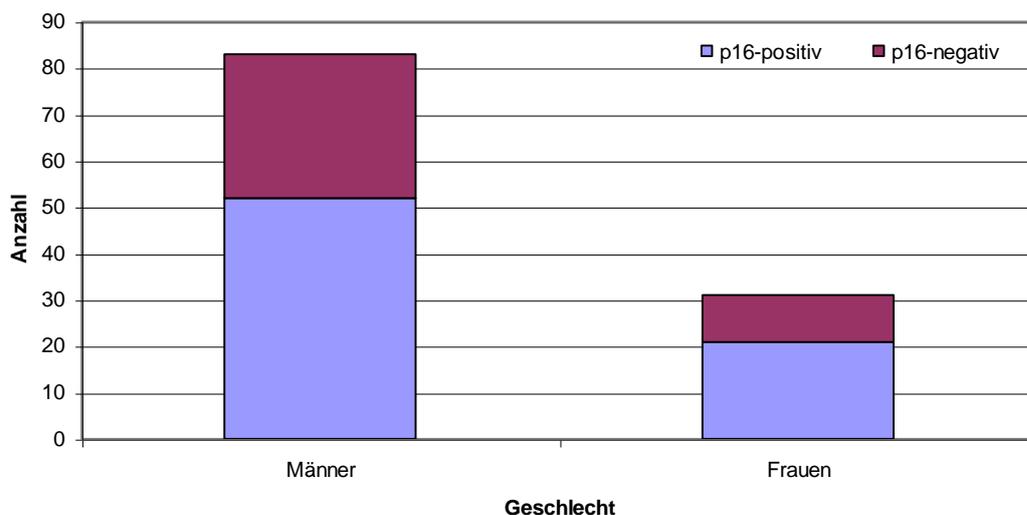


Abb. 10 - p16^{INK4a}-Status / Patientengeschlecht

3.7.7. Raucheranamnese

Alle Tumore von Nichtrauchern der untersuchten Kohorte wurden als p16^{INK4a}-positiv beurteilt. Patienten, die angaben seit mindestens 10 Jahren nicht mehr zu rauchen, zeigten in über 80% einen positiven p16^{INK4a}-Status. Bei Rauchern überwogen die p16^{INK4a}-negativen Tumore die p16^{INK4a}-positiven knapp.

Tab. 12 - p16^{INK4a}-Status / Raucheranamnese

p16-Status	Raucher		ehemalige Raucher*		Nichtraucher	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
p16-positiv	33	47,1	18	81,8	22	100,0
p16-negativ	37	52,9	4	18,2	0	0
	70	100,0	22	100,0	22	100,0

* seit ≥ 10 Jahre Nichtraucher

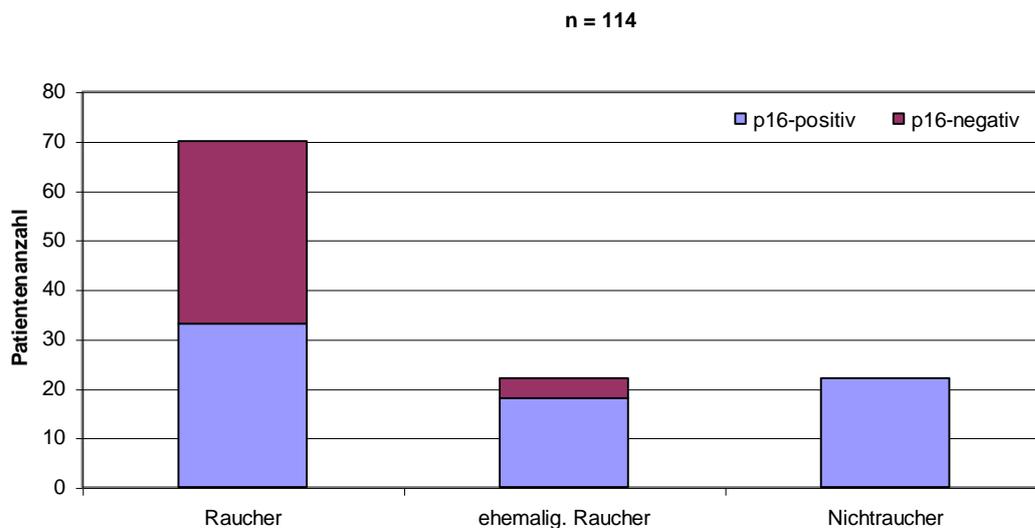


Abb. 11 – p16^{INK4a}-Status / Raucheranamnese

3.7.8. Alkoholanamnese

Tumore von Patienten, die Angaben nie oder nur selten Alkohol zu sich zu nehmen, waren in über 90%. p16^{INK4a}-positiv. Umgekehrt verhielt es sich mit den Tumoren von Patienten mit einer anamnestischen Alkoholkrankheit. In der Gruppe von Patienten mit einem regelmäßigen Alkoholkonsum ohne Suchtcharakter waren die Tumore in etwas mehr als der Hälfte p16^{INK4a}-assoziiert.

Tab. 13 - p16^{INK4a}-Status / Alkoholanamnese

p16-Status	kein/selten Alkohol		regelmäßig Alkohol		Alkoholkrankheit	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
p16-positiv	55	91,7	17	54,8	1	4,3
p16-negativ	5	8,3	14	45,2	22	95,7
	60	100,0	31	100,0	23	100,0

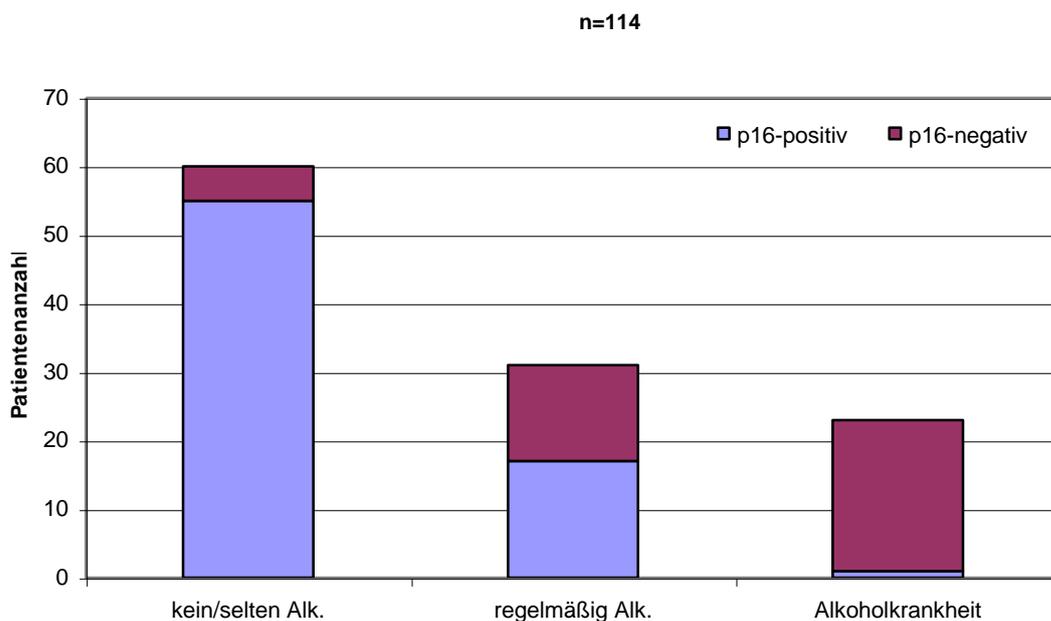


Abb. 12 - p16^{INK4a}-Status / Alkoholanamnese

3.7.9. T-Stadium

Die T-Stadien waren in beiden Gruppen im Verhältnis ähnlich verteilt. Sowohl die p16^{INK4a}-assoziierten als auch die p16-negativen Tumore waren in weit mehr als der

Hälfte im Stadium T1 oder T2 diagnostiziert worden. Der Anteil der Spätstadien (T4a/b) lag um ca. 21%.

Tab. 14 - p16^{INK4a}-Status / T-Stadium

T-Stadium	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
T1	14	19,2	10	24,4
T2	30	41,0	13	31,7
T3	14	19,2	9	22,0
T4a	14	19,2	8	19,5
T4b	1	1,4	1	2,4
	73	100,0	41	100,0

3.7.10. N-Stadium

Die p16^{INK4a}-assoziierten Tumore zeigten häufiger eine fortgeschrittene Lymphknotenmetastasierung als die p16^{INK4a}-negativen. Während etwa 44% der Patienten mit einem p16^{INK4a}-negativen Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ohne Nachweis von zervikalen Filiae waren, fand sich ein N0-Hals in der Vergleichsgruppe in nur 16,4%. Abgesehen von den Patienten mit nur einer einzelnen Halslymphknotenmetastase, waren alle N+-Stadien bei den p16^{INK4a}-assoziierten Tumoren wesentlich häufiger vertreten.

Tab. 15 - p16^{INK4a}-Status / N-Stadium

N-Stadium	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
N0	12	16,4	18	44,0
N1	9	12,3	7	17,1
N2a	9	12,3	1	2,4
N2b	29	39,8	11	26,8
N2c	11	15,1	3	7,3
N3	3	4,1	1	2,4
	73	100,0	41	100,0

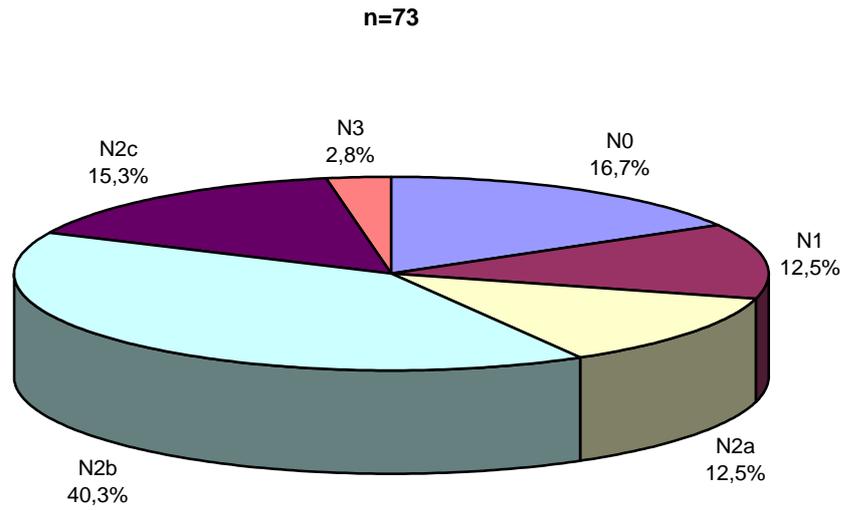


Abb. 13 - p16^{INK4a}-positive Tumore / N-Stadium

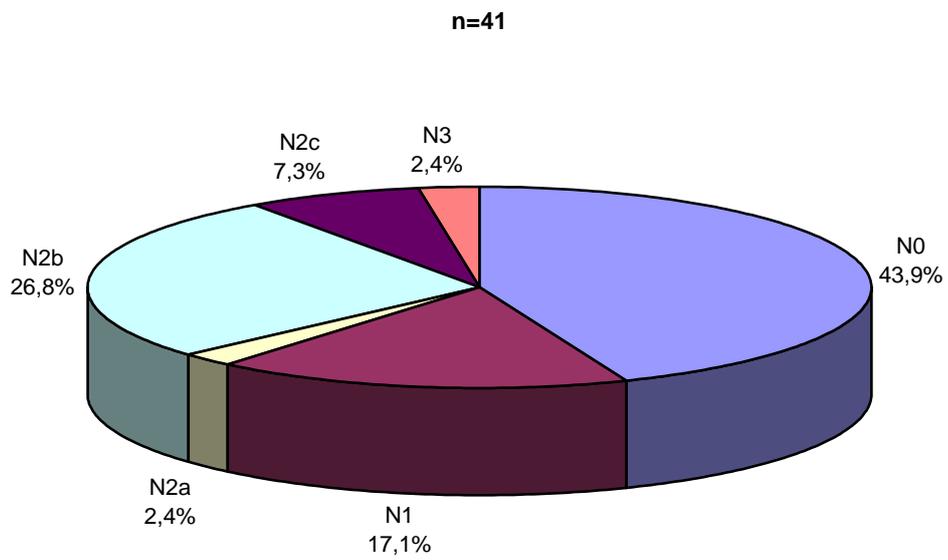


Abb. 14 - p16^{INK4a}-negative Tumore / N-Stadium

3.7.11. Tumor-Stadium

Die Verteilung der N-Stadien spiegelt sich in den aus der TNM-Klassifikation abgeleiteten Tumorstadien wider. So befanden sich fast 77% aller Patienten mit einem p16^{INK4a}-positiven Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem Tumorstadium IV. Dagegen wurde der Tumor bei knapp der Hälfte der Vergleichsgruppe bereits in einem der früheren Stadien I-III diagnostiziert.

Tab. 16 - p16^{INK4a}-Status / Tumorstadium

Tumorstadium	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
I	1	1,4	6	14,6
II	6	8,2	5	12,2
III	10	13,7	9	22,0
IVa	52	71,2	18	43,9
IVb	3	4,1	1	2,4
IVc	1	1,4	2	4,9
	73	100,0	41	100,0

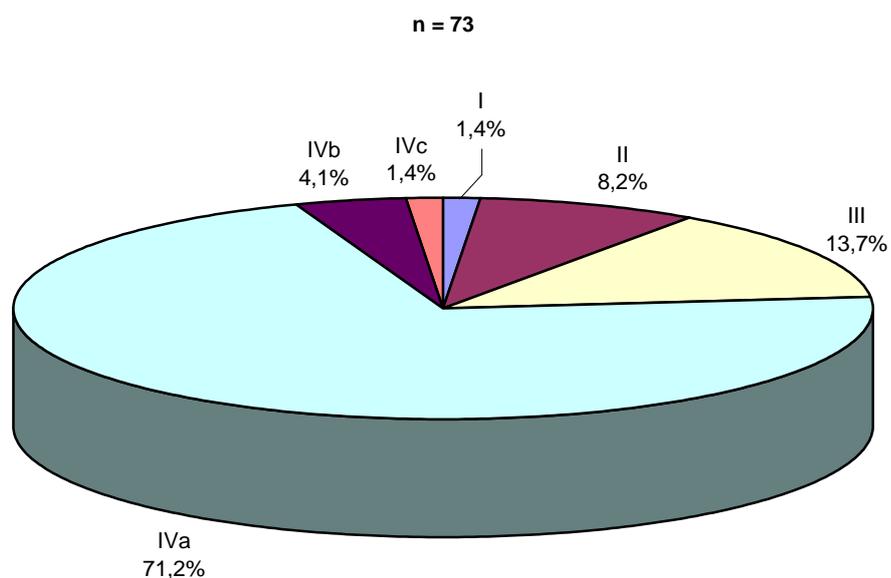


Abb. 15 - p16^{INK4a}-positive Tumore / Tumorstadium

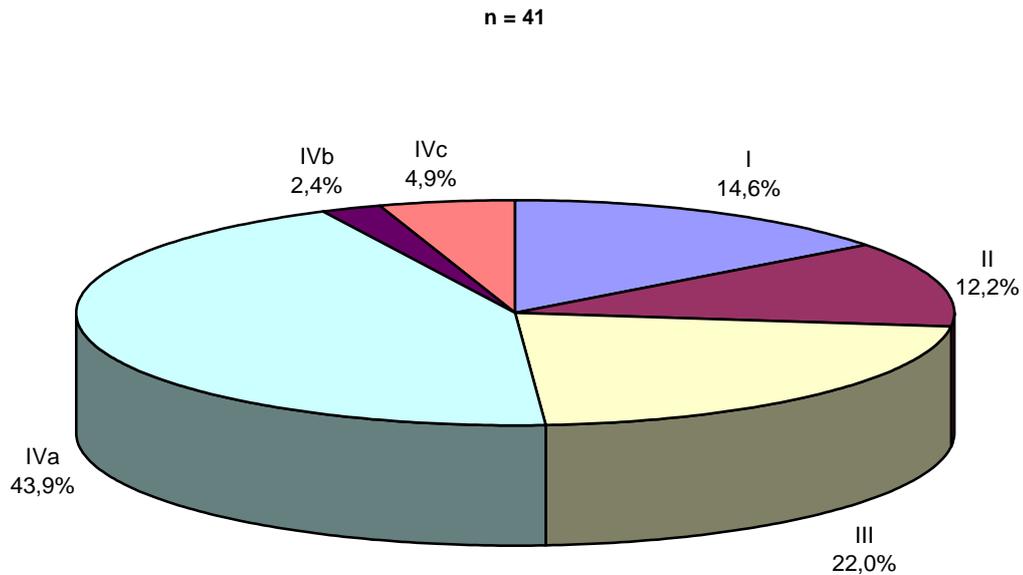


Abb. 16 - p16^{INK4a}-negative Tumore / Tumorstadium

3.7.12. Halslymphknotenmetastasen

Von den 52 histologisch gesicherten Fällen einer zervikalen Lymphknotenmetastasierung lag in 2 Fällen kein Material mehr zur immunhistochemischen Bestimmung des p16^{INK4a}-Status vor. Bei 2 Präparaten war der Befund unklar, so dass insgesamt 48 Fälle in die Auswertung gingen.

Tab. 17 - p16^{INK4a}-Status der Halslymphknotenmetastasen

p16-Status		Gesamt	
		Anzahl	%
p16-positiv	nukleär positiv	0	0
	zytoplasmatisch positiv	22	45,8
	nukleär u. zytoplasmat. pos.	17	35,4
p16-negativ		9	18,8
		48	100,0
		48	100,0

In allen Fällen war der p16^{INK4a}-Status der Halslymphknotenmetastasen mit dem der Primärtumore identisch. Lediglich hinsichtlich des p16^{INK4a}-Nachweises im Zellkern

und/oder Zytoplasma gab es in 4 Fällen Unterschiede. So waren in 2 Fällen die Halslymphknotenmetastasen lediglich zytoplasmatisch positiv, während im Primärtumorgewebe ein p16^{INK4a}-Nachweis sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma vorlag. Zweimal war dieses genau gegenteilig.

3.7.12.1. Extrakapsuläre Ausdehnung

Lagen Halslymphknotenmetastasen vor, so konnte bei den p16^{INK4a}-negativen in einem Drittel, bei den p16-positiven sogar in 39,5 % ein kapselüberschreitendes Wachstum aufgezeigt werden. In einem Fall einer p16^{INK4a}-positiven Halslymphknotenmetastase war eine eindeutige Beurteilung hinsichtlich der extrakapsulären Ausdehnung nicht möglich.

Tab. 18 - Halslymhknotenmetastasen: p16^{INK4a}-Status / extrakapsuläre Ausdehnung

Lymphknotenmetastasen	mit extrakapsulärer Ausdehnung		ohne extrakapsuläre Ausdehnung	
	Anzahl	%	Anzahl	%
p16-positiv	15	83,3	23	79,3
p16-negativ	3	16,7	6	20,7
	18	100,0	29	100,0

3.7.12.2. Zystische Lymphknotenmetastasen

Von den 13 als zystisch beschriebenen Halslymphknotenmetastasen konnten 10 einer immunhistochemischen Untersuchung zugeführt werden. Hierbei lag in 100 % ein positiver p16^{INK4a}-Status vor.

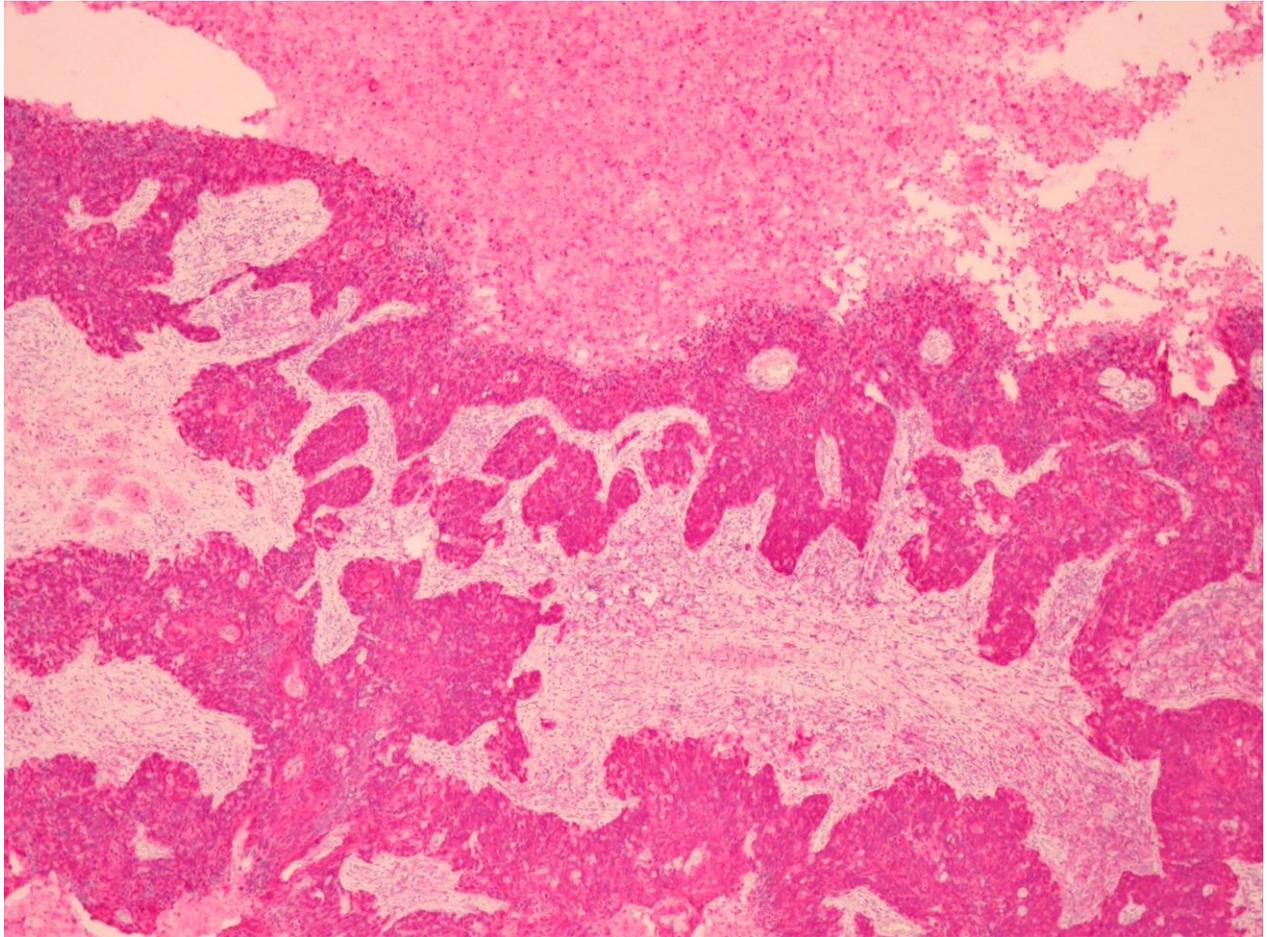


Abb. 17 - p16^{INK4a}-Immunhistologie, zystische Lymphknotenmetastase, diffus p16^{INK4a}-positiv

3.8. Therapie

Von den 114 Patienten wurden 112 einer Therapie zugeführt, 111 hiervon mit kurativem Behandlungsziel. Zwei Patienten mit einer jeweils fortgeschrittenen Tumorerkrankung lehnten jegliche Behandlung ab. Die Entscheidung zur Art der Therapie erfolgte auf Basis des Tumorstadiums, der Operabilität und der Komorbidität, nicht auf Basis des p16^{INK4a}-Status.

Tab. 19 - Therapieverteilung

Therapie	Anzahl	%
Operation	14	12,3
Operation + Radiatio	34	29,8
Operation + Radio-Chemotherapie	21	18,4
primäre Radiatio	8	7,0
primäre Radio-Chemotherapie	34	29,8
Palliative Radiatio	1	0,9
keine Therapie	2	1,8
	114	100,0

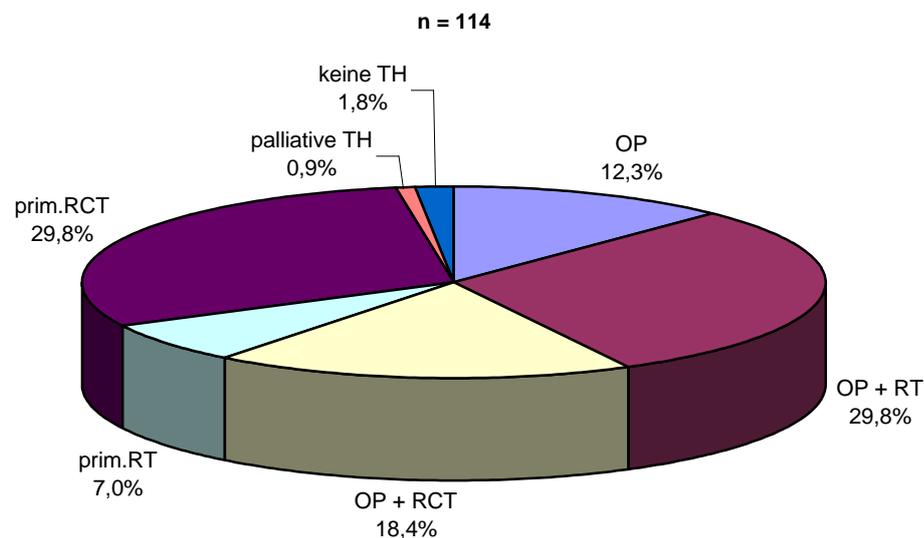


Abb. 18 - Therapieverteilung

3.8.1. Therapie / p16^{INK4a}-Status

Hinsichtlich des divergenten p16^{INK4a}-Status waren die einzelnen Behandlungsformen ähnlich verteilt.

Tab. 20 - Therapieverteilung / p16^{INK4a}-Status

Therapie	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Operation	9	12,3	5	12,2
Operation + Radiatio	26	25,6	8	19,5
Operation + Radio-Chemotherapie	14	19,2	7	17,1
primäre Radiatio	4	5,5	4	9,7
primäre Radio-Chemotherapie	20	27,4	14	34,1
Palliative Radiatio	0	0	1	2,4
keine Therapie	0	0	2	4,9
	73	100,0	41	100,0

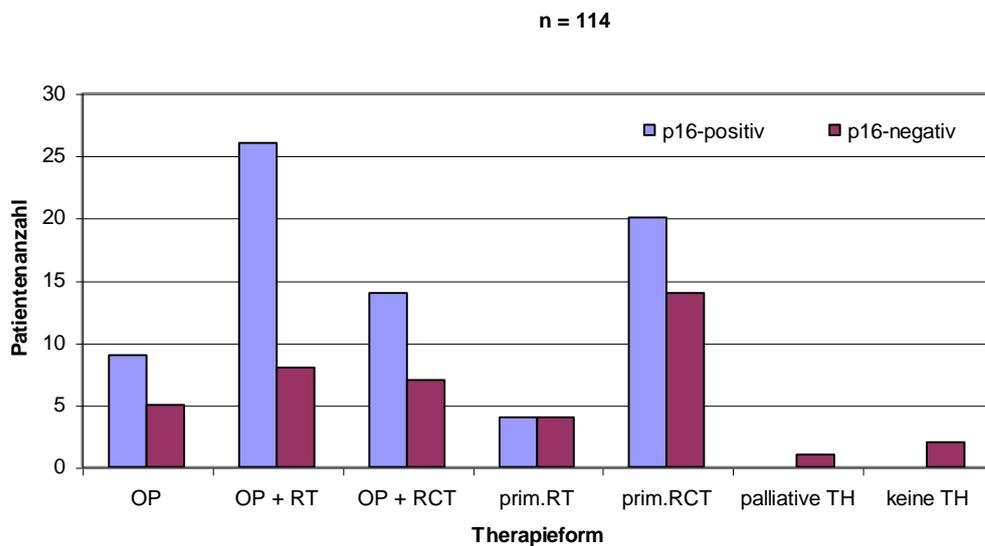


Abb. 19 - Therapieverteilung / p16^{INK4a}-Status

3.8.2. Operative Therapie

Erfolgte eine operative Behandlung allein oder in Kombination mit einer adjuvanten Therapie, bestand der Eingriff in der überwiegenden Mehrzahl (94,2%) aus einer Tumorresektion mit einer einseitigen oder beidseitigen Sanierung der zervikalen Lymphabflusswege. Dreimal erfolgte im Tumorstadium I bzw. II ausschließlich eine Tumorresektion und einmal wurde lediglich eine alleinige Neck-dissection ohne Tumorresektion im Anschluss an eine primäre Radio-Chemotherapie durchgeführt.

Tab. 21 - Operative Therapie / p16^{INK4a}-Status

Operative Therapie	Anzahl	%	p16 +	p16 -
Tumorresektion	3	4,3	1	2
Tumorresektion + Neck dissection einseitig	60	87,0	44	16
Tumorresektion + Neck dissection beidseitig	5	7,2	4	1
Neck dissection einseitig	1	1,4	0	1
	69	100,0	49	20

3.8.3. Strahlentherapie

98 Patienten (85,9%) des untersuchten Kollektivs wurden im Rahmen der Behandlung einer Strahlentherapie zugeführt.

Tab. 22 – Strahlentherapie / p16^{INK4a}-Status

Strahlentherapie	Anzahl	%	Dosis (Gy)	Dosis (Gy) Ø	p16 +	p16 -
primäre Radiatio / RCT	36	36,7	62-74	70,1	22	14
OP + Radiatio / RCT	52	53,1	55,8-72	64,3	38	14
palliative Radiatio	1	1,0	39	39	0	1
abgebroch. Rad. / RCT	9	9,2	23,2-66,4	53,5	4	5
	98	100,0			64	34

3.8.4. Chemotherapie

Insgesamt erfolgte in 55 Fällen (48,2%) im Rahmen der Erstbehandlung eine Chemotherapie. Diese kam entweder bei einer primären Radio-Chemotherapie oder im Rahmen einer postoperativen adjuvanten Radio-Chemotherapie zur Anwendung. Durchschnittlich wurden 2,2 Zyklen (1-6 Zyklen, Median 2) verabreicht.

Tab. 23 – Chemotherapien / p16^{INK4a}-Status

Chemotherapie / AK-Therapie	Anzahl	%	Cisplatin	5-FU	Cisplatin/ 5-FU	Mitomycin/ 5-FU	Cetuximab	p16 +	p16 -
primäre RCT	34	61,8	10	0	19	2	3	20	14
adjuvante RCT	21	38,2	14	1	4	1	1	14	7
	55	100,0	24	1	23	3	4	34	21

3.8.5. Therapie / Tumorlokalisation

Bezogen auf die Tumorlokalisation war eine operative Behandlung bei über 80% der Tonsillenkarzinome Bestandteil der Therapie. Dagegen wurden mehr als 60% der Zungengrundkarzinome nicht-chirurgisch behandelt.

Tab. 24 - Therapieverteilung / Tumorlokalisation / p16^{INK4a}-Status

Therapie	Tonsille				Zungengrund			
	Anzahl	%	p16 +	p16 -	Anzahl	%	p16 +	p16 -
Operation	12	20,0	8	4	2	3,7	1	1
Operation + Radiatio	24	40,0	19	5	10	18,5	7	3
Operation + Radio-Chemoth.	13	21,7	10	3	8	14,8	4	4
primäre Radiatio	2	3,3	1	1	6	11,1	3	3
primäre Radio-Chemoth.	8	13,3	6	2	26	48,1	14	12
Palliative Radiatio	1	1,7	0	1	0	0	0	0
keine Therapie	0	0	0	0	2	2,4	0	2
	60	100,0	44	16	54	100,0	29	25

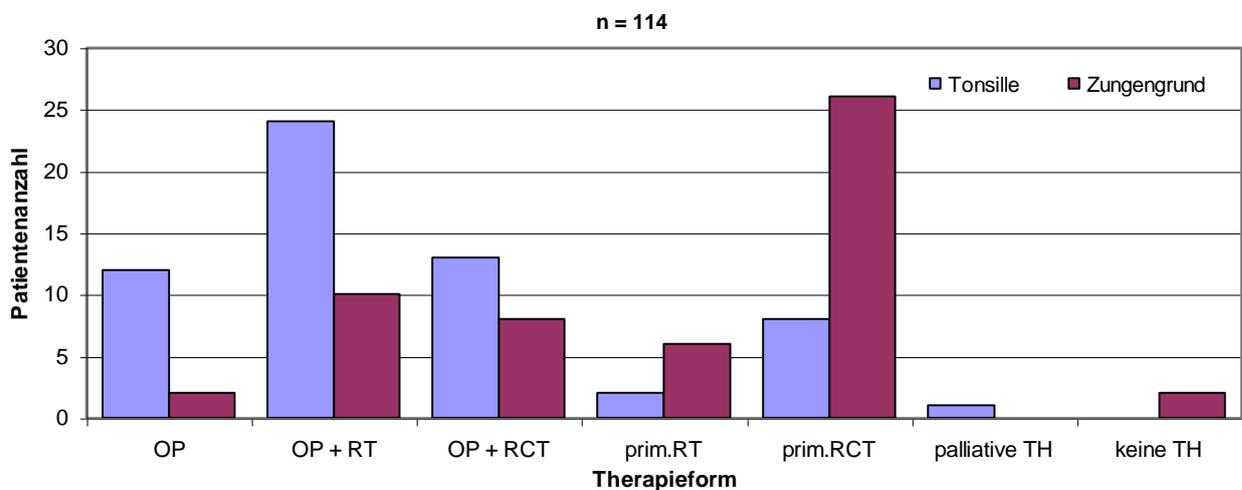


Abb. 20 - Therapieverteilung / Tumorlokalisation

3.9. Therapieausdauer

In 96 Fällen (84,2%) wurde die Therapie wie geplant abgeschlossen. Zweimal (1,8 %) wurde die Behandlung unterbrochen. 14 Patienten (12,2%) beendeten die Therapie vorzeitig. In zwei Fällen (1,8%) erfolgte keine Behandlung.

3.10. Therapieergebnis

Es wurden insgesamt 112 Patienten behandelt, die den nachfolgenden Therapieauswertungen als Kollektiv zugrunde gelegt wurden. Hierbei erfolgte die Therapie in allen Fällen bis auf einen Patienten mit kurativer Intention. Im Anschluss an die Behandlung erfolgte jeweils eine körperliche wie bildmorphologische Untersuchung zur Beurteilung des Therapieerfolges. Ein Patient verstarb unmittelbar vor Abschluss der Therapie, ohne dass das Behandlungsergebnis hinsichtlich des Tumors eingeschätzt worden war.

Tab. 25 - Therapieergebnis

Therapieergebnis	Anzahl	%
Komplette Remission	96	85,7
Partielle Remission	13	11,6
Stable disease	2	1,8
ungewiss	1	0,9
	112	100,0

3.10.1. Therapieergebnis / Tumorlokalisation

Das Therapieergebnis unterschied sich im Vergleich der beiden untersuchten Tumorlokalisationen zugunsten der Karzinome der Gaumenmandeln. Während von den 52 Patienten mit einem Zungengrundtumor 76,9% (40 Pat.) eine komplette Remission zeigten, war in der Gruppe der 60 Tonsillenkarzinome sogar in 93%. (56 Pat.) nach Abschluss der Therapie kein Tumor mehr nachweisbar.

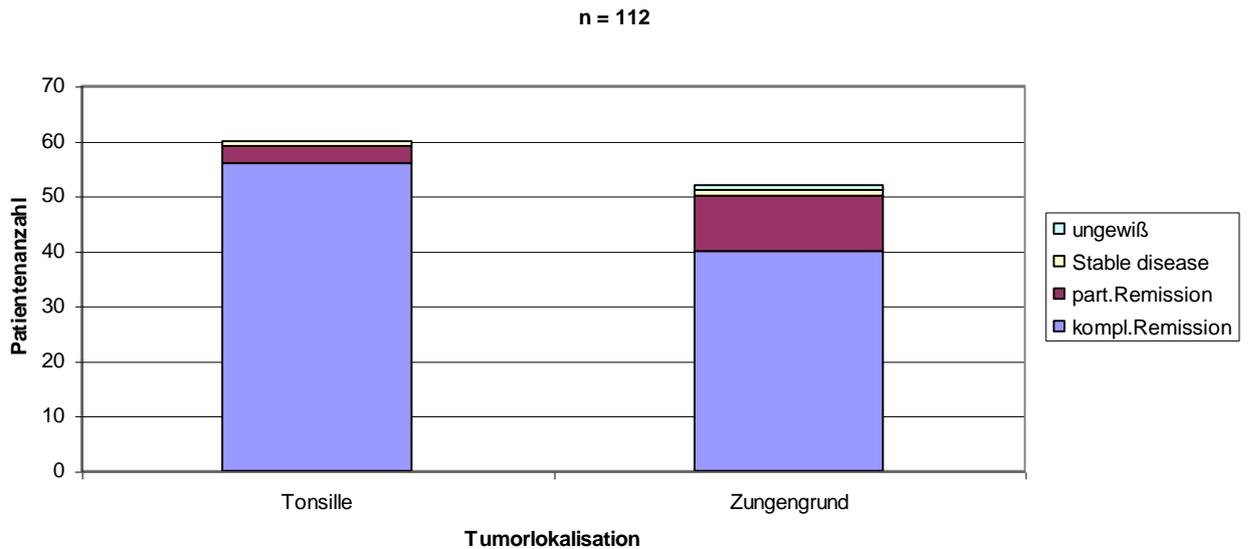


Abb. 21 - Therapieergebnis / Tumorlokalisation

3.10.2. Therapieergebnis / Raucheranamnese

Bei allen Nichtraucherern konnte durch die Behandlung eine vollständige Rückbildung der Tumorerkrankung erzielt werden. Patienten, die eine positive Raucheranamnese angaben, konnten insgesamt in 82,2% der Fälle in eine komplette Remission gebracht werden.

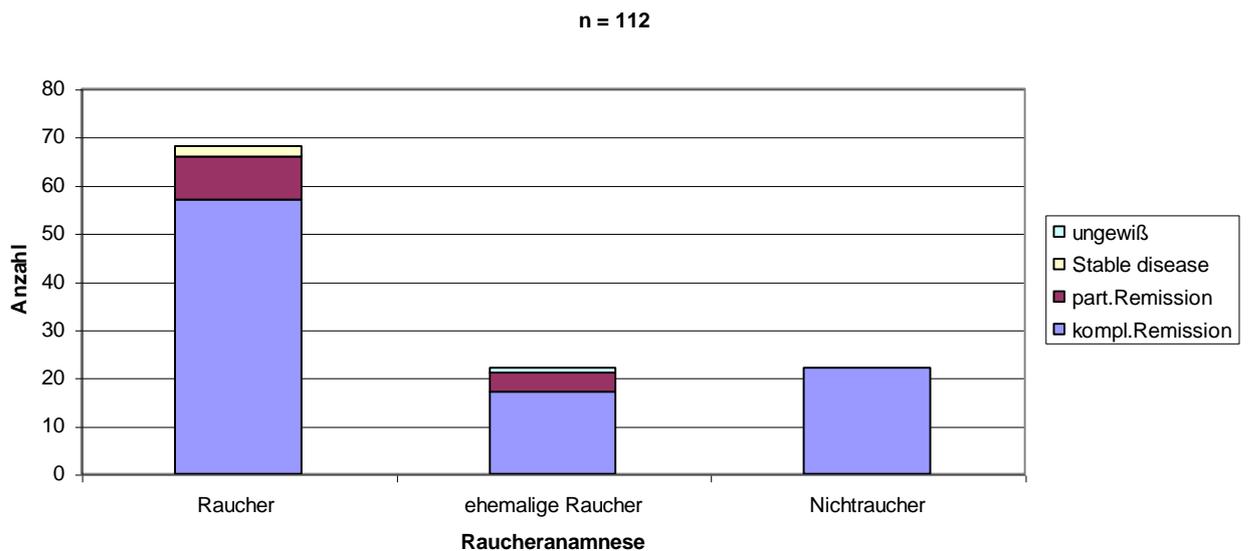


Abb. 22 - Therapieergebnis / Raucheranamnese

3.10.3. Therapieergebnis / Alkoholanamnese

Bei allen drei Gruppen, die hinsichtlich der Alkoholanamnese unterschieden wurden, lag der Anteil der Patienten, die nach Abschluss der Behandlung keinerlei Tumorzeichen mehr aufwiesen bei über 80%.

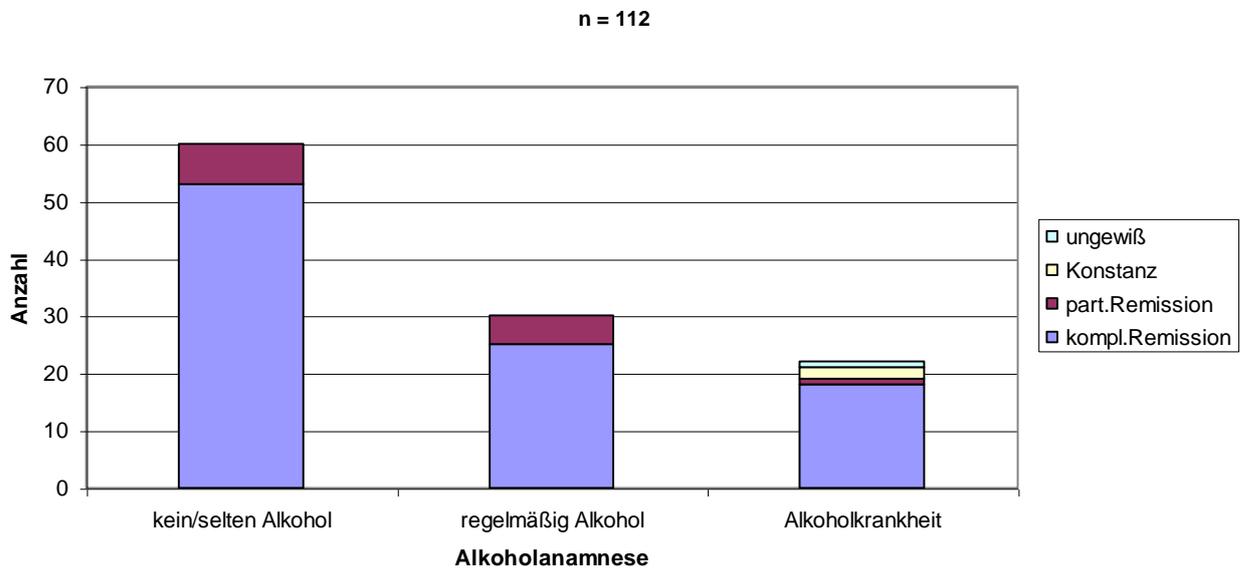


Abb. 23 - Therapieergebnis / Alkoholanamnese

3.10.4. Therapieergebnis / p16^{INK4a}-Status

Fast 80% aller Patienten mit einem p16^{INK4a}-negativen Tumor konnten durch die Behandlung in eine komplette Remission gebracht werden. In der Gruppe der p16^{INK4a}-positiven Tumorpatienten war dieser Anteil sogar noch um knapp 10% höher.

Tab. 26 - Therapieergebnis / p16^{INK4a}-Status

Therapieergebnis	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Komplette Remission	65	89,0	31	79,5
Partielle Remission	8	11,0	5	12,8
Konstanz	0	0	2	5,1
ungewiss	0	0	1	2,6
	73	100,0	39	100,0

3.11. Verlauf

3.11.1. Nachbeobachtung

Die Nachbeobachtungszeit betrug 1-66 Monate und lag durchschnittlich bei 28,4 Monaten (Median 26 Monate).

3.11.2. Rezidivfreiheit

Zum Ende der Nachbeobachtungszeit waren 82 Patienten (71,9%) rezidivfrei. In 17 Fällen (14,9%) bestand nach Abschluss der Behandlung ein Residualtumor. Bei 13 Patienten (11,4%) war im Verlauf ein Rezidiv aufgetreten. Hierbei handelte es sich mehrheitlich um Lokalrezidive (6 Fälle) bzw. das Auftreten von Fernmetastasen (5 Fälle). Darüber hinaus wurde jeweils ein Fall eines Lokalrezidives mit einer gleichzeitigen regionären Tumormanifestation bzw. Fernmetastasierung beobachtet.

Ein Patient war zum Ende der Behandlung verstorben, ohne dass das tumorbezogene Therapieergebnis eingeschätzt worden war.

Die Durchschnittliche Rezidivfreiheit lag im Gesamtkollektiv bei 23,5 Monaten (0-64 Monate / Median 21 Monate). Ein etwaiges Rezidiv war durchschnittlich 13,1 Monate nach Beendigung der Ersttherapie aufgetreten.

3.11.3. Verlauf / Tumorlokalisation

Im Vergleich der beiden untersuchten Tumorlokalisationen im Oropharynx zeigte sich für die Tonsillenkarzinome ein günstigerer Krankheitsverlauf.

Tab. 27 - Verlauf / Tumorlokalisation

Verlauf	Tonsille		Zungengrund	
	Anzahl	%	Anzahl	%
rezidivfrei	51	85,0	32	59,2
Residualtumor	4	6,7	13	24,1
Rezidiv	5	8,3	8	14,8
ungewiss	0	0	1	1,9
	60	100,0	54	100,0

3.11.4. Verlauf / Raucheranamnese

Während Raucher und ehemalige Raucher in etwa 70% der Fälle rezidivfrei blieben, waren sogar über 90% der Nichtraucher im Nachbeobachtungszeitraum ohne Nachweis eines erneuten Auftretens der Tumorerkrankung.

Tab. 28 - Verlauf / Raucheranamnese

Verlauf	Raucher		ehemalige Raucher*		Nichtraucher	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
rezidivfrei	47	67,1	16	72,8	20	90,9
Residualtumor	13	18,6	4	18,2	0	0
Rezidiv	10	14,3	1	4,5	2	9,1
ungewiss	0	0	1	4,5	0	0
	70	100,0	22	100,0	22	100,0

* seit ≥ 10 Jahre Nichtraucher

3.11.5. Verlauf / Alkoholanamnese

Bezogen auf die Trinkgewohnheiten war der Krankheitsverlauf in der Gruppe der Patienten, die anamnestisch nie oder selten Alkohol konsumierten, mit einem Anteil von mehr als 78% der Fälle Rezidivfreiheit am günstigsten. Bei regelmäßigem Alkoholgenuss konnte in nahezu 30%., in der Gruppe der Patienten, die eine Alkoholkrankheit angaben, sogar in mehr als einem Drittel keine dauerhafte Tumorfreiheit erreicht werden.

Tab. 29 - Verlauf / Alkoholanamnese

Verlauf	kein/selten Alkohol		regelmäßig Alkohol		(trockene/r) Alkoholiker/in	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
rezidivfrei	47	78,3	22	70,9	14	60,9
Residualtumor	7	11,7	6	19,4	4	17,4
Rezidiv	6	10,0	3	9,7	4	17,4
ungewiss	0	0	0	0	1	4,3
	60	100,0	31	100,0	23	100,0

3.11.6. Verlauf / p16^{INK4a}-Status

In der Gruppe der Patienten, die an einem p16^{INK4a}-positiven Tumor erkrankt waren, blieben 82,2% im Nachbeobachtungszeitraum ohne Hinweis auf ein Rezidiv. In der Vergleichsgruppe waren es dagegen nur wenig mehr als die Hälfte.

Tab. 30 - Verlauf / p16^{INK4a}-Status

Verlauf	p16-positiv		p16-negativ	
	Anzahl	%	Anzahl	%
rezidivfrei	60	82,2	22	53,7
Residualtumor	8	11,0	10	24,4
Rezidiv	5	6,8	8	19,5
ungewiss	0	0	1	2,4
	73	100,0	41	100,0

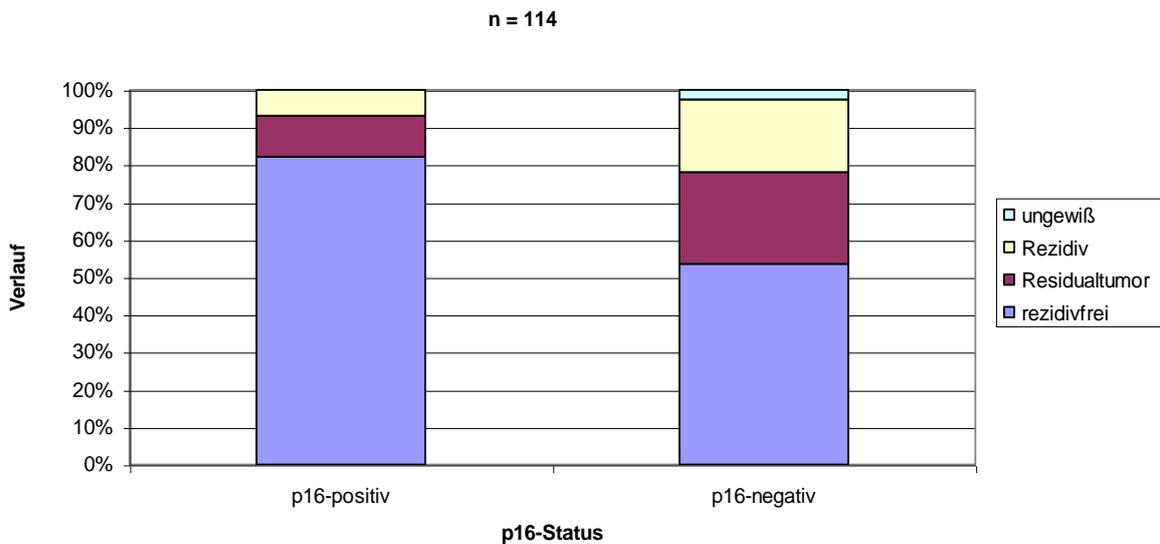


Abb. 24 - Verlauf / p16^{INK4a}-Status

3.12. Überleben

3.12.1. Überleben / Gesamtkohorte

Am Ende des Nachbeobachtungszeitraumes waren von den 114 untersuchten Patienten noch 75 (65,8%) am Leben. 32 Patienten (28,1%) waren im Zusammenhang mit der Tumorerkrankung und 7 Patienten (6,1%) tumorunabhängig verstorben.

3.12.2. Überleben / Tumorlokalisation

46 der 60 Patienten mit einem Tonsillenkarzinom überlebten im Beobachtungszeitraum. Von den 54 Zungengrundtumoren waren noch 29 am Leben. Mit 4 bzw. 3 Patienten war der Anteil der tumorunabhängig Verstorbenen annähernd gleich.

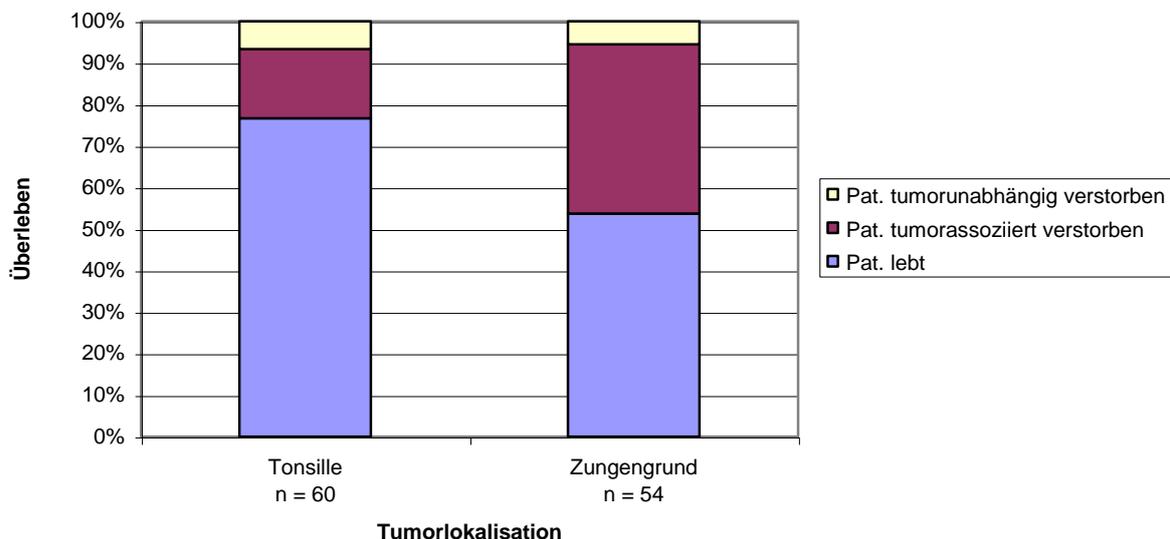


Abb. 25 - *Überleben / Tumorlokalisation*

3.12.3. Überleben / Raucheranamnese

Von den 70 Rauchern waren 42 zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch am Leben. Bei den ehemaligen Rauchern bzw. Nichtraucher waren dies 15 bzw. 18 der jeweils 22 Patienten. Während bei den Patienten mit einer aktuellen bzw. ehemaligen Nikotinanamnese 6 bzw. ein Patient tumorunabhängig verstorben waren, standen alle beobachteten Todesfälle unter den Nichtrauchern im Zusammenhang mit der Tumorerkrankung.

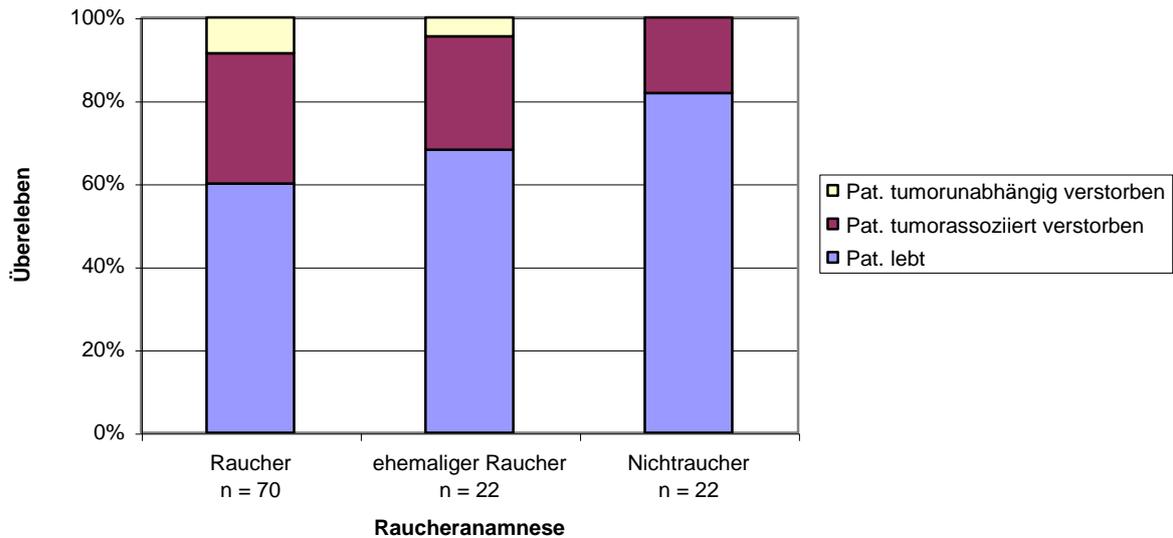


Abb. 26 - Überleben / Raucheranamnese

3.12.4. Überleben / Alkoholanamnese

Bei der Betrachtung der hinsichtlich der Alkoholanamnese unterschiedenen 3 Gruppen waren 43 der 60 Patienten, welche keinen oder seltenen Alkoholkonsum angaben, am Ende der Untersuchung am Leben. In der Gruppe der regelmäßig Alkohol Konsumierenden (31) bzw. der Patienten mit einer Alkoholkrankheit (23) überlebten 20 bzw. 12 Patienten. Die Anzahl der tumorunabhängig Verstorbenen war mit jeweils 2 (kein/selten Alkohol, Alkoholkrankheit) bzw. 3 Patienten (regelmäßig Alkohol) nahezu gleich.

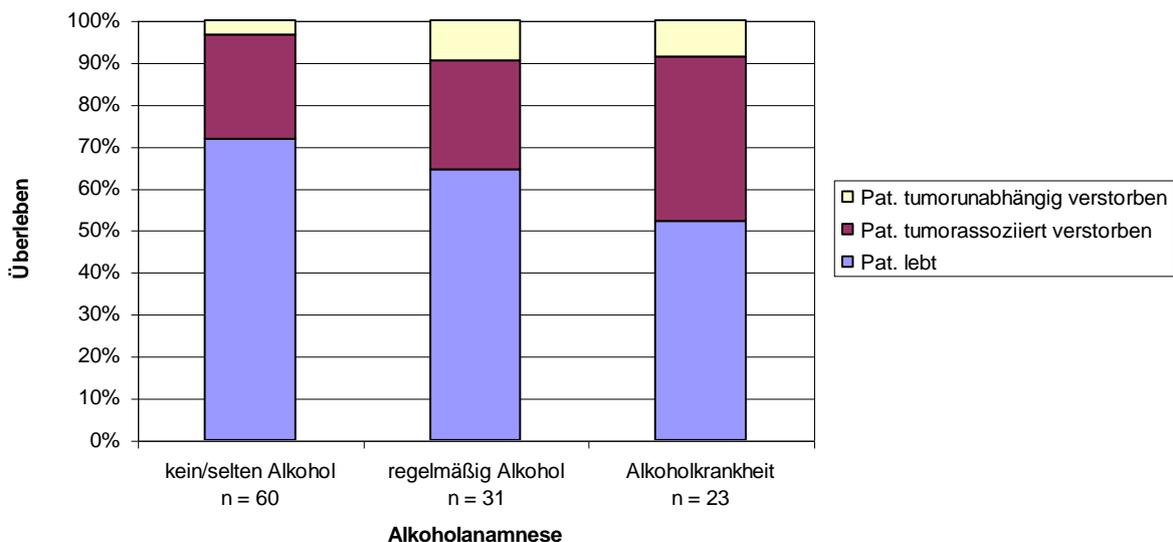


Abb. 27 - Überleben / Alkoholanamnese

3.12.5. Überleben / p16^{INK4a}-Status

Im Vergleich der p16^{INK4a}-Status konnte für die Gruppe der an einem p16^{INK4a}-positiven Tumor erkrankten Patienten ein wesentlich häufigeres krankheitsspezifisches Überleben aufgezeigt werden.

Tab. 31 - Überleben / p16^{INK4a}-Status

Überleben		p16-positiv		p16-negativ	
		Anzahl	%	Anzahl	%
Patient lebt		57	78,1	18	43,9
Patient verstorben	tumorunabhängig	2	2,7	5	12,2
	tumorassoziiert	14	19,2	18	43,9
		73	100,0	41	100,0

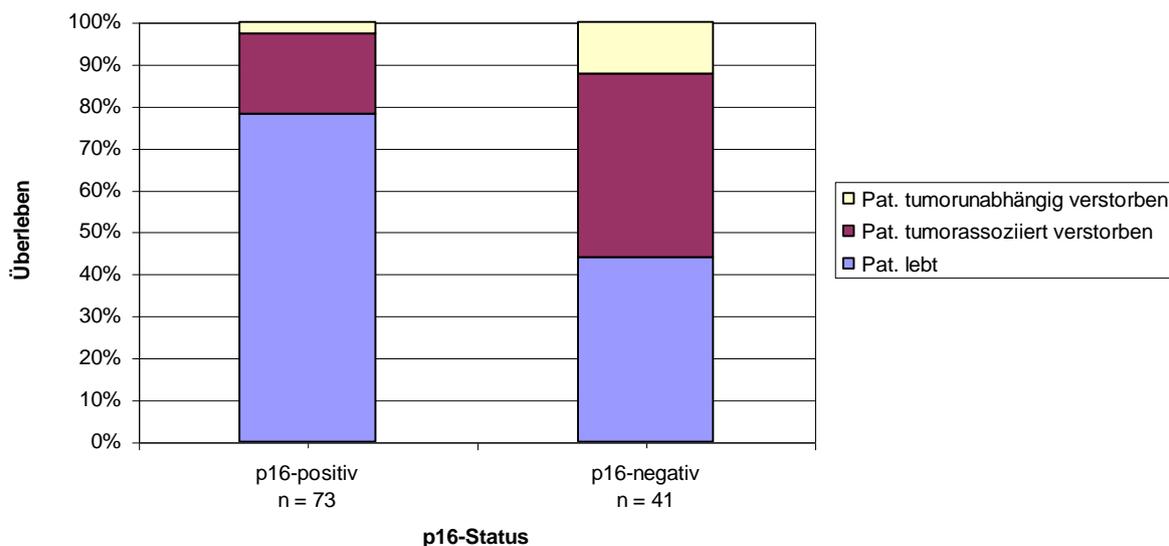


Abb. 28 - Überleben / p16^{INK4a}-Status

3.12.6. Überleben / Tumorlokalisation und p16^{INK4a}-Status

Bei der Betrachtung des Krankheitsverlaufes in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation getrennt nach dem p16^{INK4a}-Status zeigte sich, dass in der Gruppe der p16^{INK4a}-positiven Tumore 84% der Tonsillen- im Gegensatz zu 68% der Zungengrundkarzinom-Patienten lebten. Bei p16-negativem Status waren dies nur noch 56% bzw. 36%.

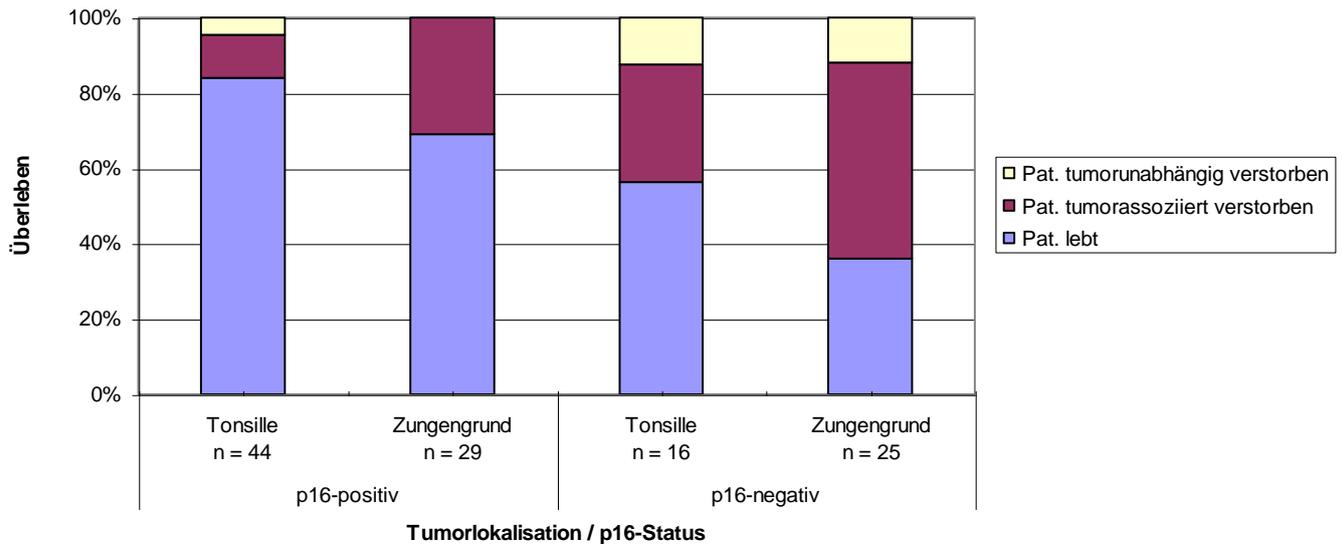


Abb. 29 - Überleben / Tumorlokalisation und p16^{INK4a}-Status

3.12.7. Überlebenszeitanalyse

Die Analyse der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Raucheranamnese (Raucher, ehemaliger Raucher, Nichtraucher) mittels des Logrank-Tests konnte weder für das progressionsfreie Überleben noch für das Gesamtüberleben einen signifikanten Unterschied aufzeigen ($p=0,304$ bzw. $p=0,534$). Auch in Bezug auf die Alkoholanamnese ergab sich lediglich eine Tendenz ($p=0,173$ bzw. $p=0,234$). Der Vergleich der Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Tumorstadium (I und II vers. III und IV) konnte hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens einen Trend aufzeigen ($p=0,072$). Dagegen hatte der p16^{INK4a}-Status einen hochsignifikanten Einfluss. Nach 3 Jahren lag das progressionsfreie Überleben bei 79% und 52% für Patienten mit einem p16^{INK4a}-positiven gegenüber einem p16^{INK4a}-negativen Tumor ($p=0,001$). Die Rate für das 3-Jahres-Gesamtüberleben lag bei p16^{INK4a}-assoziierten Tumoren bei 78% gegenüber 39% in der Gruppe der p16^{INK4a}-negativen Malignome ($p<0,001$). Der p16^{INK4a}-Status assoziierte Unterschied im Überleben blieb auch unter Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren (Rauchen/Alkohol) hochsignifikant ($p<0,001$). In der Cox-Regressions-Analyse waren lediglich der p16^{INK4a}-Status und das Tumorstadium unabhängige prognostische Faktoren. So lag bezogen auf den p16^{INK4a}-Status die Hazard-Ratio für das progressionsfreie Überleben bei 0,44 (95% Konfidenzintervall, 0,25 – 0,78) und für das Gesamtüberleben ebenso bei 0,44 (95% Konfidenzintervall, 0,24 – 0,78).

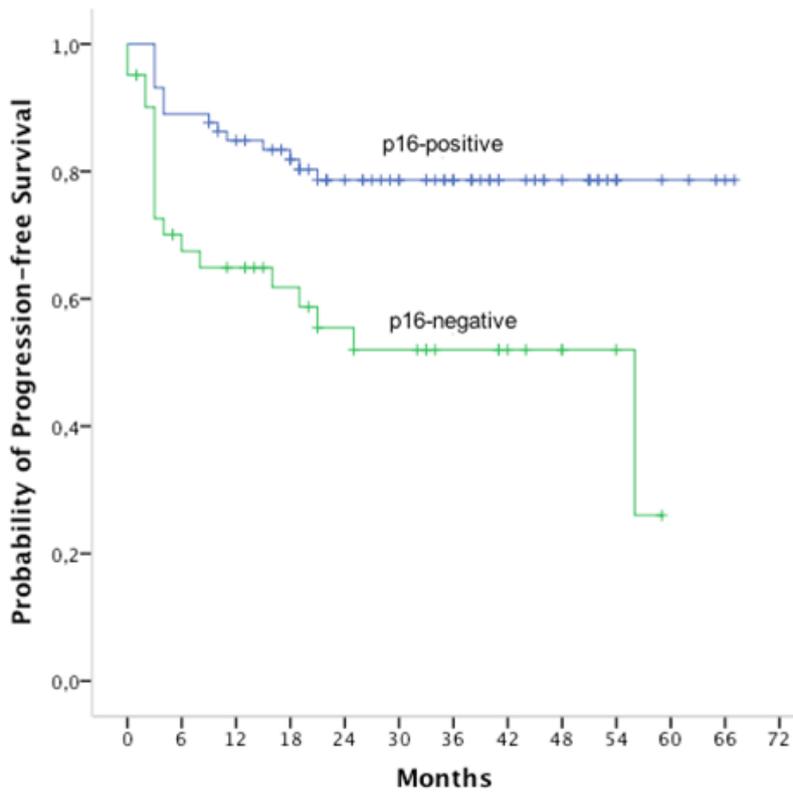


Abb. 30 – Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Status

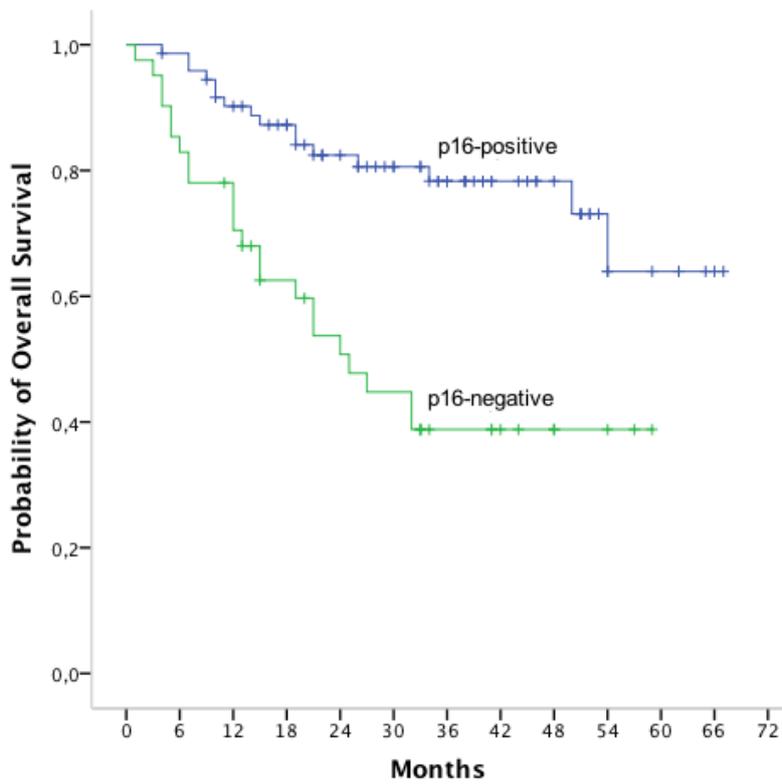


Abb. 31 – Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Status

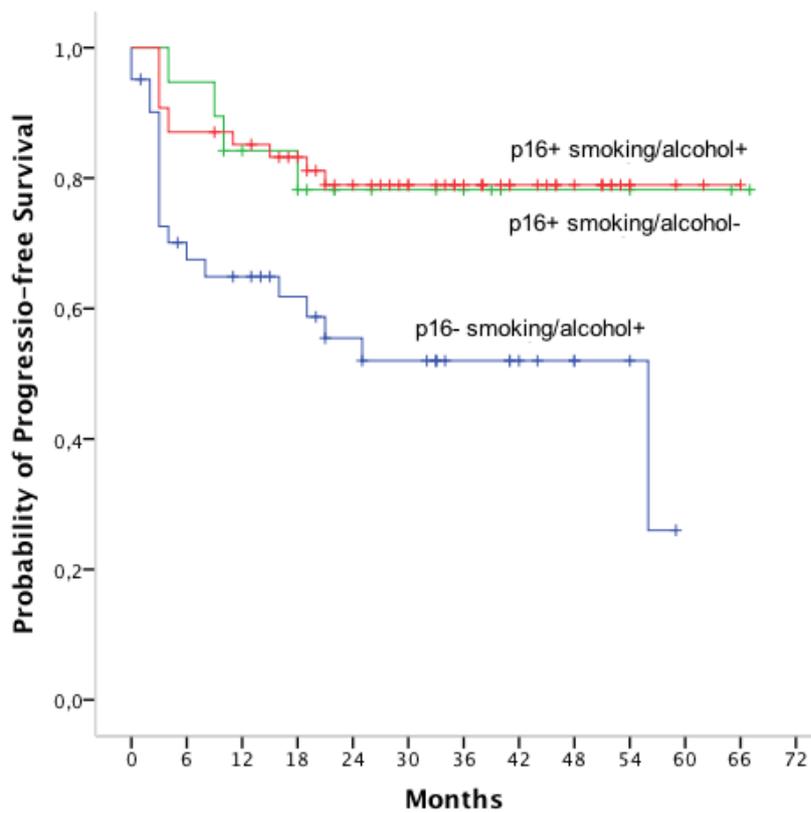


Abb. 32 – Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von $p16^{INK4a}$ -Status und Rauchen/Alkohol

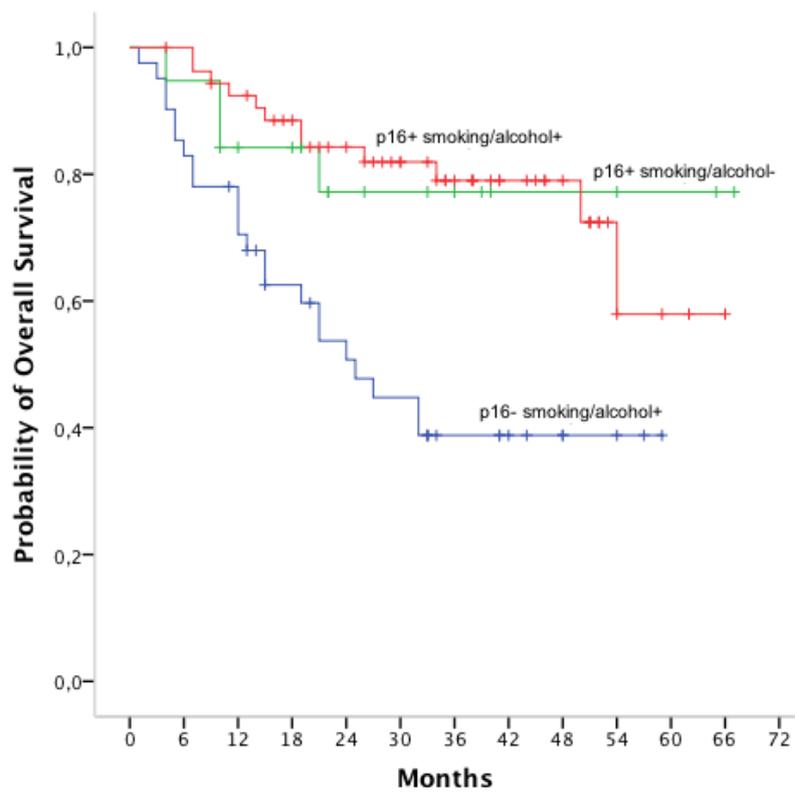


Abb. 33 – Gesamtüberleben in Abhängigkeit von $p16^{INK4a}$ -Status und Rauchen/Alkohol

4. Diskussion

Tabak- und Alkoholkonsum gelten als anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen [102]. Ein kleiner Anteil von ca. 15-20% dieser Karzinome tritt jedoch bei Nichtrauchern und Patienten ohne Alkoholanamnese auf, was das Vorliegen anderer Risikofaktoren suggeriert [27]. Seit nahezu 3 Jahrzehnten wird die Rolle der Hochrisiko-HPV-Typen, vorrangig HPV 16 und 18, auch im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Malignomen untersucht. Die Daten unterstützen zunehmend die Annahme, dass Humane Papillomaviren bei einer Untergruppe dieser Tumore bei der Karzinomentstehung ursächlich sind [28, 32]. Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei die viralen Onkoproteine E6 und E7 zu sein. Durch Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 sowie pRb unterbrechen diese funktionell die gleichen Regulatoren des Zellzyklus sowie DNA-Reparaturmechanismen, wie sie regelmäßig bei den genetisch bzw. epigenetisch bedingten Kopf-Hals-Karzinomen beobachtet werden [30]. Es kommt zur Akkumulation von Mutationen mit chromosomaler Instabilität bei gleichzeitiger Apoptoseresistenz [69].

Eine Unterscheidung dieser scheinbar eigenständigen Entitäten wird vorrangig durch den Nachweis von HPV-DNA im Tumorgewebe geführt. Als technische Methoden kommen hierbei insbesondere die Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie die in-situ-Hybridisierung (ISH) zur Anwendung. Bei der PCR-Methode, die bisher als Goldstandard angesehen wird, handelt es sich jedoch um eine zeit- und kostenintensive Technik, wodurch dieses Verfahren bisher für den Einsatz in der alltäglichen Routinediagnostik nicht geeignet erscheint. Die vorliegende Arbeit bestätigt eindrucksvoll, dass durch ein vergleichsweise einfaches histologisches Verfahren zwei insbesondere hinsichtlich der Prognose divergente Gruppen unter den Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen differenziert werden können. Die Unterscheidung der beiden Entitäten wurde durch die immunhistochemische Untersuchung einer Überexpression des zelleigenen Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a}, einem Inhibitor der für den Zellzyklus progressiven Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) aus der INK4a-Familie vorgenommen. P16^{INK4a} hemmt die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins Retinoblastom (pRb), während hypophosphoryliertes pRb im Gegenzug die p16^{INK4a}-Expression negativ rückreguliert [56]. Wie bereits bei den Zervixkarzinomen beschrieben, führt daher eine Inaktivierung von pRb durch das virale Onkoprotein E7 zu einer Überexpression von p16^{INK4a} infolge des Wegfalls der hemmenden Rückregulierung

[45]. Paradoxerweise konnte aufgezeigt werden, dass bei der Mehrzahl von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches infolge der epigenetischen Alteration sogar eine Inaktivierung des p16-Gens mit demzufolge ausbleibender Anfärbbarkeit vorliegt [34, 81, 108]. Entsprechend dieser Beobachtung wird die p16^{INK4a}-Immunhistologie als Ersatzmarker zum Nachweis einer HPV-Assoziation bei Kopf-Hals-Karzinomen vorgeschlagen [51, 92]. Zur Beschreibung der Färbereaktion hat sich die Graduierung nach Klaes, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kam und eine Abgrenzung grenzwertiger Fälle sowie eine differenziertere Betrachtung der Ergebnisse ermöglicht, als praktikabel erwiesen [45]. Hierbei wird je nach quantitativem Ausmaß zwischen negativer, sporadischer, fokaler und diffuser Anfärbung unterschieden.

In einer Untersuchung von Klusmann et al. wurden die Ergebnisse der p16^{INK4a}-Immunhistochemie von 34 Tonsillenkarzinomen mit denen der PCR-Analyse korreliert. Von den 18 als HPV-positiv gewerteten Karzinomen zeigten 16 eine diffuse und 2 eine nur fokale bzw. sporadische Anfärbung. 16 Tonsillentumore waren mittels PCR als HPV-negativ eingestuft worden. Von diesen waren bis auf ein Karzinom, welches fokal positiv war, alle p16^{INK4a}-negativ [48]. Laco und Mitarbeiter verglichen die Untersuchungsergebnisse von PCR, in-situ-Hybridisierung und p16^{INK4a}-Immunhistologie bei 46 Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen [55]. Die Sensitivität und Spezifität der p16^{INK4a}-Expression als Marker für die Präsenz von HPV-DNA im Tumorgewebe, sofern sie mit der PCR verglichen wurde, lagen in dieser Studie bei 0,95 und 0,85 und waren dabei der in-situ-Hybridisierung noch überlegen. Auch Hoffmann et al. wiesen für die p16^{INK4a}-Immunhistologie eine hochsignifikante Korrelation mit dem PCR-bezogenen HPV-Status bei der Untersuchung von 12 Karzinomen der Tonsillenregion nach [40]. In einer niederländischen Studie bestand sogar eine vollständige Übereinstimmung von PCR und immunhistochemischer Untersuchung [33]. Die vorliegenden Literaturangaben erlauben die Schlussfolgerung, dass die in dieser Arbeit als p16^{INK4a}-positiv klassifizierten Karzinome als HPV-assoziierte Tumore anzusehen sind. Ferner zeigt ein positiver p16^{INK4a}-Status eine biologisch aktive Infektion an, was auch durch die Beobachtung einer hochgradigen Korrelation zwischen viraler mRNA-Expression und der p16^{INK4a}-Immunhistochemie untermauert wird, während die PCR ohne Nachweis der Transkriptionsaktivität keinen Beweis für die HPV-induzierte Onkogenese darstellt [20, 40]. Inwieweit der Nachweis einer p16^{INK4a}-Überexpression bei mittels PCR als HPV-negativ klassifizierten Tumoren das Ergebnis

von onkogen bedingter Zellalterung oder einer Infektion mit anderen Viren, welche pRb herunterregulieren, ist, bleibt ungewiss [34]. Gegen die Annahme einer anderen als einer tumorassoziierten p16^{INK4a}-Überexpression spricht die Tatsache, dass sämtliche in der vorliegenden Arbeit untersuchten tumorfreien Tonsillen der adoleszenten Kontrollgruppe keine entsprechende Anfärbbarkeit aufzeigten, auch wenn die Gruppe mit 14 Patienten deutlich kleiner als die analysierte Kohorte ausfiel. Im Gegensatz hierzu ergab laut einer holländischen Studie die Untersuchung von tumorfreien Tonsillen von 262 Patienten in 28% eine entsprechende p16^{INK4a}-assoziierte Immunfärbung [46]. Die Autoren nehmen andere Mechanismen als eine HPV-Infektion als Ursache an.

Bei der Untersuchung des HPV-Status von Kopf-Hals-Karzinomen werden z.T. erheblich variierende Detektionsraten von 0 bis 100 % angegeben [96]. In einer umfangreichen Metaanalyse von Kreimer et al. aus dem Jahre 2005, in die insgesamt 60 Studien mit 5046 Patienten aus fünf Kontinenten mit ausschließlich PCR-basiertem Nachweis eingingen, wurde insgesamt eine HPV-Prävalenz von knapp 26 % aller Kopf-Hals-Malignome ermittelt [54]. Eine genauere Analyse der einzelnen Tumorlokalisationen konnte aufzeigen, dass der Anteil der HPV-positiven Tumore im Bereich des Oropharynx, mit Akzentuierung des Waldeyer'schen Rachenrings, am höchsten ist. Die ausgeprägte Assoziation von HPV mit den Tonsillenkarzinomen bleibt unklar, auch wenn die leichte Erreichbarkeit des invaginierten, einschichtigen Kryptenepithels und die Präsenz von Zytokinen produzierendem lymphoiden Gewebe, welches die Transkription sowie die zelluläre Transformation stimuliert, als Ursache angenommen wird [46]. In Abhängigkeit von unterschiedlichen geographischen Regionen werden z.T. erheblich variierende HPV-Prävalenzen angegeben. Vor diesem Hintergrund konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung von Tumoren der Gaumen- und Zungengrundtonsillen in dem zugrunde liegenden unselektierten Berliner Patientenkollektiv. Hierbei lag der Anteil der p16^{INK4a}-positiven Tumore in der Gesamtkohorte mit 64% im Vergleich mit anderen Studien recht hoch und variierte hinsichtlich der beiden untersuchten Tumorlokalisationen deutlich. So waren sogar 73,3% der Tonsillenkarzinome p16^{INK4a}-positiv, während der Anteil der p16^{INK4a}-assoziierten Zungengrundkarzinome mit 53,7% geringer ausfiel. In einer internationalen multizentrischen Studie wurde der Anteil HPV-assoziiierter Oropharynxkarzinome mit 18,3% und für Tonsillenkarzinome gesondert mit 24,7% angegeben [38]. Die Literaturübersicht von Kreimer et al., ermittelte für Europa 28% und

für Nordamerika sogar 47% HPV-positive Oropharynxkarzinome ohne Unterscheidung der einzelnen oropharyngealen Lokalisationen [54]. In einer US-amerikanischen Fall-Kontrollstudie von Gillison et al. wurde sogar bei 72% der 114 untersuchten Oropharynxkarzinome HPV-DNA im Tumorgewebe mittels in-situ-Hybridisierung nachgewiesen [30]. Der lange Zeit postulierte deutliche Unterschied des HPV-assoziierten Anteils zwischen Oropharynxtumoren in Nordamerika und Europa zugunsten des amerikanischen Subkontinents lässt sich nicht uneingeschränkt aufrechterhalten. So zeigen insbesondere Studien aus Schweden einen deutlichen Anstieg HPV-positiver Tonsillenkzinome in den vergangenen Jahrzehnten [70]. Näsman und Mitarbeiter untersuchten retrospektiv 98 Plattenepithelkarzinome der Gaumenmandeln des Zeitraumes 2003 bis 2007. Die mittels PCR erhobene Quote HPV-assoziiierter Tumore lag hierbei mit 85% sogar noch über dem in dieser Arbeit ermittelten Anteil p16^{INK4a}-positiver Tonsillenkzinome. Im Vergleich mit 23% HPV-positiven Tonsillenkzinomen in den 1970iger, 29% in den 1980iger und 57% in den 1990iger Jahren sowie 68% im Zeitraum 2000-2002 konnte die schwedische Arbeitsgruppe eine stete Zunahme dieser Entität aufzeigen. Einen ähnlichen Anstieg erbrachte eine der wenigen Studien, welche ausschließlich die HPV-Prävalenz in Zungengrundkarzinomen untersuchte [4]. Inwieweit allerdings das sehr unterschiedliche Alter des aufgearbeiteten Materials Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchungen hatte, bleibt ungewiss. Eine derartige Tendenz kann für die analysierte Berliner Kohorte in Ermangelung von älteren Untersuchungen jedoch nicht abgeleitet werden. In anderen europäischen Studien wurde von weniger HPV- bzw. p16-positiven Oropharynxkarzinomen berichtet. Eine holländische Arbeit wies mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in 41% der 81 untersuchten Tonsillenkzinome HPV-DNA nach, wobei es sich um eine HPV-16-spezifische Technik handelte [34]. Der Anteil p16^{INK4a}-assoziiierter Tumore lag mit 46% etwas höher. Fischer et al. berichteten von ähnlichen Ergebnissen in deren immunhistologisch untersuchten Schweizer Kohorte, die 40% p16^{INK4a}-positive Oropharynxkarzinome beinhaltete [21]. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit ergab der Vergleich der beiden anatomischen Unterregionen jedoch eine höhere Quote p16^{INK4a}-assoziiierter Tumore unter den Zungengrundkarzinomen (50%) als unter den Malignomen der Gaumenmandeln (40%). Für Deutschland existieren bisher nur sehr wenig veröffentlichte Daten. Klusmann et al. konnten in einer Kölner Untersuchung von 98 Kopf-Hals-Karzinomen mittels PCR in 26% HPV-DNA nachweisen [47]. Die höchste Prävalenz bestand unter den 24 Tonsillenkzinomen mit

58%. Nur eines (17%) von 6 Zungengrundkarzinomen war HPV-positiv. Von ähnlichen Ergebnissen berichten Hoffmann et al., die in der untersuchten Kieler Kohorte einen Anteil von 53% (21/39) HPV-positive Tonsillenkarcinome ermittelten [40]. Beide Arbeitsgruppen zeigen eine signifikante Korrelation ihrer PCR-basierenden Ergebnisse mit dem p16^{INK4a}-Status auf, so dass ein Vergleich mit den vorliegenden Berliner Daten möglich erscheint. Als Grund für die zum Teil erheblichen Unterschiede der ermittelten HPV-Prävalenzen werden neben tatsächlichen regionalen Unterschieden die teilweise kleinen untersuchten Kollektive, unterschiedliche Materialien und Nachweismethoden sowie ungenaue Angaben zur untersuchten anatomischen Region angeführt [20, 39, 95, 97]. Da für die Übertragung einer HPV-Infektion auch oral-genitale Sexualpraktiken angenommen werden, sind ethno-geographische Ungleichheiten sexueller Gewohnheiten in verschiedenen Kulturen ebenso denkbar [30]. Ob der Abweichung der in der vorliegenden Arbeit für Berlin ermittelten Zahlen zu den beiden angeführten deutschen Untersuchungen eine möglicherweise spezielle Bevölkerungsstruktur oder eine regionale Konzentration prädisponierender Lebensformen und soziokultureller Risikofaktoren zugrunde liegen, kann derzeit nur spekuliert werden.

Nach Gillison et al. unterscheiden sich HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome von den HPV-negativen nicht nur durch molekulargenetische Merkmale sondern auch histopathologisch sowie durch klinische Parameter und ein divergentes Risikoprofil [30]. So wird vielfach bei HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen eine basaloide und auch schlecht differenzierte Morphologie beobachtet [1, 34, 104]. In dieser Untersuchung war eine derartige Tendenz ebenso erkennbar, obgleich ca. 80% der Tumore eine mäßige Differenzierung (G2) sowie das histologische Bild eines klassischen Plattenepithelkarzinoms aufwiesen. Dennoch waren allein 17 (81%) der 21 schlecht differenzierten Karzinome und sogar 17 (94%) der 18 Tumore mit einer basaloiden Morphologie p16^{INK4a}-positiv. Auch wenn eine schlechtere Differenzierung eines Tumors häufig mit einem rascheren Wachstum assoziiert ist, konnte in der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich des T-Stadiums kein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden im p16^{INK4a}-Status divergenten Gruppen festgestellt werden. Dagegen zeigten die p16^{INK4a}-positiven Karzinome meist eine wesentlich fortgeschrittenere Lymphknotenmetastasierung als die Vergleichsgruppe. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen von Hafkamp et al., die in ihrer Studie für die signifikant kleineren HPV-assoziierten Tonsillenkarcinome eine etwas ausgeprägtere zervikale Lymphknotenmetastasierung aufzeigen konnten und daraus eine frühzeitige Tendenz

zur regionalen Metastasierung für HPV-positive Tumore ableiteten [34]. Im Gegensatz hierzu fanden anderer Autoren keine Korrelation von N-Stadium und HPV- bzw. p16^{INK4a}-Status [21, 27].

Den vielfach erwähnten Trend, dass HPV-positive Tumorpatienten jünger sind als die Vergleichsgruppe [66, 70, 94], konnten wir in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Kohorte nicht beobachten. So lag das Durchschnittsalter der p16^{INK4a}-assoziierten Gruppe mit annähernd 62 Jahren sogar noch knapp ein Jahr über dem der p16^{INK4a}-negativen. Trotz des Postulates zweier verschiedener Tumorentitäten, fand sich bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten hinsichtlich der konsumierten Noxen in der Mehrzahl das klassische Risikoprofil. So bestand in über 80% eine aktuelle (61,4%) oder ehemalige (19,3%) Raucheranamnese und knapp die Hälfte der Patienten gab regelmäßigen Alkoholkonsum oder sogar eine Alkoholkrankheit an. Dieses überrascht auf den ersten Blick insofern, da nahezu Zweidrittel der Gesamtkohorte p16^{INK4a}-positiv war. Die genauere Betrachtung zeigt jedoch die Tendenz einer inversen Korrelation zwischen p16^{INK4a}-Status und Tabak- und Alkoholkonsum. So waren alle Nichtraucher p16^{INK4a}-positiv und die Mehrzahl der Raucher ohne eine p16^{INK4a}-Assoziation. Ähnlich verhielt es sich bezüglich der Alkoholanamnese. Diese Ergebnisse stehen mit den Beobachtungen einer Vielzahl von Autoren in Übereinstimmung [27, 33, 35, 49, 84]. So berichten Gillison et al., dass die Wahrscheinlichkeit eines negativen HPV-Status mit der zunehmenden Anzahl an Raucherjahren anstieg bzw. sich mit der zunehmenden Anzahl an Jahren der Nikotinkarenz wieder reduzierte [30]. Auch in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bei ehemaligen Rauchern, die angaben länger als zehn Jahre nicht mehr zu rauchen, in nahezu 82% ein positiver p16^{INK4a}-Status.

Möglicherweise liegt der in dieser Arbeit nachgewiesenen hohen Prävalenz sowohl der p16^{INK4a}-Positivität als auch des Nikotin- und Alkoholabusus ein synergistischer Effekt in der Pathogenese der Oropharynxkarzinome zugrunde und ist nicht Ausdruck einer strengen Trennung zweier Entitäten. Nach einer experimentellen Untersuchung ergab die Tabak- und Alkoholexposition von durch HPV 16 oder 18 immortalisierte Zelllinien menschlicher Keratozyten substantiell größere genetische Veränderungen, die zu einer Transformation führten, als dieses bei durch Niedrig-Risiko-HPV-Typen oder gar nicht infizierte Keratozyten der Fall war [27]. In einer Studie von Schwarz et al. bestand für HPV-16-seropositive Raucher ein 15-fach erhöhtes Risiko an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken, während bei HPV-16-seronegativen Rauchern ein solches Risiko nur um das 5-fache im Vergleich zu seronegativen Nichtrauchern erhöht war

[88]. Einen derartigen Synergismus konnten D'Souza und Mitarbeiter in ihrer Fall-Kontroll-Studie jedoch nicht aufzeigen [16].

Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass schon wegen der alkohol- und tabakassoziierten Komorbiditäten neben dem krankheitsspezifischen gerade das Gesamtüberleben für diese Patientenklentel reduziert ist [29]. Des Weiteren besteht aufgrund einer Feldkanzerisierung für Patienten mit einer Raucher und /oder Alkoholanamnese ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zweitkarzinomen [62]. Gleichzeitig wird Kopf-Hals-Karzinomen, insbesondere im Bereich des Oropharynx, in welchen HPV-DNA nachweisbar ist bzw. welche als p16^{INK4a}-positiv klassifiziert werden, eine signifikant bessere Prognose im Vergleich mit HPV- bzw. p16^{INK4a}-negativen Tumoren nachgesagt [19, 21, 57, 66, 82, 83, 103]. In einer Meta-Analyse von Ragin et al. konnte für HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome eine Reduktion des Sterberisikos um 18%, krankheitsspezifisch sogar um 38% aufgezeigt werden. Allein bezogen auf Oropharynxkarzinome wurde sogar eine Reduktion um 28% bzw. 49% ermittelt [79]. Strome et al. beobachteten keine signifikante HPV-assoziierte Prognoseverbesserung der untersuchten Tonsillenkarzinome [94]. Umso interessanter ist daher die Analyse der dieser Arbeit zugrunde liegenden Kohorte hinsichtlich der Prognose aufgrund der bereits o.g. hohen Koexistenz von klassischen Risikofaktoren und einem positiven p16^{INK4a}-Status. Zwar war das progressionsfreie Überleben der Nichtraucher im Vergleich zu Patienten mit einer Raucheranamnese im Nachbeobachtungszeitraum insgesamt besser, jedoch ergab sich diesbezüglich keine Signifikanz ($p=0,304$). Ähnlich verhielt es sich im Hinblick auf die Trinkgewohnheiten. Patienten ohne Alkoholanamnese waren in 78% der Fälle rezidivfrei, während dieses 71% bzw. 60,9% der Patienten mit regelmäßigem Alkoholkonsum bzw. einer Alkoholkrankheit waren. Dagegen konnte bezogen auf die Prognose in Abhängigkeit von dem p16^{INK4a}-Status ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. 79% der p16^{INK4a}-assoziierten und nur 52% der p16^{INK4a}-negativen Tumore überlebten 3 Jahre progressionsfrei ($p=0,001$). Noch deutlicher war der Unterschied im Gesamtüberleben (78% vs. 39%, $p<0,001$). Auch in der multivariaten Analyse war der p16^{INK4a}-Status neben dem Tumorstadium der einzige unabhängige prognostische Faktor. Die vorliegende Untersuchung ergab, dass p16^{INK4a}-positive Patienten ungeachtet ihrer Rauch- und Trinkgewohnheiten ein signifikant besseres progressionsfreies und Gesamtüberleben als die p16^{INK4a}-negative Vergleichsgruppe aufwiesen. Dieses erscheint zusätzlich vor dem o.g. Hintergrund einer bereits meist ausgeprägteren Lymphknotenmetastasierung in der Gruppe der

p16^{INK4a}-assoziierten Tumore bemerkenswert. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Beobachtungen von Hafkamp et al. überein, die bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 30 Monaten ein signifikant besseres krankheitsspezifisches als auch Gesamtüberleben der HPV-positiven Tonsillenkarzinome aufzeigen konnten [34]. Bei hochgradiger Korrelation des mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermittelten HPV-Status mit dem p16^{INK4a}-Status waren die Überlebensanalysen hinsichtlich der beiden Stratifizierungen vergleichbar. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie waren jedoch in der multivariaten Analyse die Rauchgewohnheiten neben der Tumorgroße der wichtigste prognostische Faktor. Alkoholkonsum und Lymphknotenstatus hatten in Übereinstimmung mit dieser Arbeit keinen Vorhersagewert im Hinblick auf das Überleben. Ähnlich berichten Lindquist und Mitarbeiter von einer günstigeren Prognose bei HPV-Prävalenz in den untersuchten Tonsillenkarzinomen ungeachtet der ausgeprägteren Lymphknotenmetastastasierung als in der Vergleichsgruppe [59]. Aber auch in dieser schwedischen Studie zeigte sich anders als in der vorliegenden Untersuchung ein besseres Überleben für HPV-positive Nichtraucher als für Raucher unabhängig von deren HPV-Status. Auch eine retrospektive Analyse von 19 Zungengrundkarzinomen konnte in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen ein signifikant besseres Überleben der HPV-positiven im Vergleich mit den HPV-negativen Tumoren aufzeigen [13]. Bemerkenswert erscheint, dass nach Angabe der Autoren das Tumorstadium keinen Einfluss auf die Überlebensrate hatte.

Verschiedene Hypothesen werden für das verbesserte Überleben HPV-assoziiierter Kopf-Hals-Karzinome vorgeschlagen. Unter anderem scheint die virusinduzierte Herabsetzung von p53 funktionell nicht mit einer noxeninduzierten inaktivierenden p53-Mutation gleichgesetzt werden zu können [29] und HPV-positive Tumore weisen offenbar eine intakte Apoptose unter Radiatio auf [15]. Dagegen ergaben Untersuchungen von Licitra und Mitarbeitern ein verbessertes Überleben für HPV-positiv im Vergleich zu HPV-negativen Oropharynxkarzinomen ungeachtet einer etwaigen p53-Mutation [57].

Hoffmann et al. beobachteten, daß im alleinigen Nachweis von HPV-DNA mittels PCR keine günstigere Prognose abgeleitet werden konnte [40]. Ein Trend zum besseren Gesamtüberleben ergab sich erst bei gleichzeitigem Nachweis einer Expression von E6- oder E7-mRNA und/oder einer p16^{INK4a}-Überexpression. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine Radiatio sowie Zytostatika die Kapazität der HPV-

assoziierten Onkoproteine E6 und E7, mit p53 und pRb zu interagieren, reduzieren, so dass der Tumor empfindlicher für die Therapie wird.

Untersuchungen von Ang et al. ergaben ein signifikant besseres Überleben sowohl p16^{INK4a}- als auch HPV-positiver Oropharynxkarzinome im Vergleich mit der p16^{INK4a}- bzw. HPV-negativen Vergleichsgruppe unter einer primären kombinierten Radio-Chemo-Therapie [2]. Auch in einer prospektiven Studie wurde für HPV-positive Oropharynxkarzinome eine wesentlich höhere Ansprechrate auf eine Induktionschemotherapie (82% vs. 55%) sowie eine Radio-Chemotherapie (84% vs. 57%) aufgezeigt werden [19].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die multivariate Analyse kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Therapieregime in Abhängigkeit von dem p16^{INK4a}-Status herausgestellt werden. Bei insgesamt ähnlicher Verteilung der verschiedenen Behandlungsformen, einschließlich chirurgischer und nicht-chirurgischer Therapieregime auf die beiden p16^{INK4a}-divergenten Gruppen scheint der deutliche Prognosevorteil für die p16^{INK4a}-assoziierten Tumore unabhängig von der Art der Behandlung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen retrospektiven Untersuchungen, in denen sowohl operative als auch nicht-chirurgische Verfahren in die Auswertung eingingen [22, 82]. Gerade aber im Hinblick auf die Entscheidung für oder gegen eine mutilierende Operation oder mögliche Reduktion einer Strahlendosis in Abhängigkeit von einer primären oder adjuvanten Strahlentherapie bzw. kombinierten Radiochemotherapie erscheinen prospektive randomisierte Studien, welche hinsichtlich des HPV-Status sowie der Tumorstadien stratifiziert werden, angezeigt. Die vorliegende Arbeit konnte deutlich machen, dass sich hierfür die p16^{INK4a}-Immunhistologie hervorragend eignet und daher grundsätzlich routinemäßig bei der histologischen Aufarbeitung von Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen angewendet werden sollte. Es scheint ferner angezeigt, dass das gängige Stagingssystem bei diesen Tumorlokalisationen um den p16^{INK4a}-Status erweitert werden sollte, da dieser von eindrucksvollem Vorhersagewert für den Krankheitsverlauf ist.

5. Zusammenfassung

Neben den für die Entwicklung von Kopf-Hals-Malignomen anerkannten Risikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum werden nach jüngeren Untersuchungen zunehmend auch Humane Papillomaviren vom Hochrisikotyp bei der Karzinomentstehung, v.a. im Oropharynx mit besonderer Betonung der Gaumen- und Zungengrundmandeln, als ursächlich angesehen. Auch weil für die HPV-assoziierten Tumore eine z.T. bessere Prognose als für die durch die klassischen Noxen ausgelösten Karzinome beobachtet wurde, werden zwei unterschiedliche Entitäten angenommen. Die für die Bestimmung des HPV-Status als Goldstandard geltende Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion ist für die klinische Routinediagnostik bisher nicht praktikabel. Mehrere vergleichende Studien konnten in dem immunhistochemischen Nachweis einer Überexpression des zelleigenen Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a} einen verlässlichen Ersatzmarker für eine HPV-Prävalenz aufzeigen. Zur Abschätzung der Inzidenz und Prognose HPV-assoziiierter Oropharynxtumore wurde in der vorliegenden Arbeit im Tumorgewebe von 114 Patienten, bei denen 2005-2009 ein Tonsillen- (60) bzw. ein Zungengrundkarzinom (54) im Berliner Sankt-Gertrauden Krankenhaus diagnostiziert worden war, retrospektiv der p16^{INK4a}-Status mittels monoklonalem Maus-Antikörper bestimmt und dieser mit den zugehörigen klinischen Parametern sowie dem Krankheitsverlauf korreliert. In Abhängigkeit vom Tumorstadium sowie der Komorbidität war eine chirurgische und /oder eine strahlen- sowie chemotherapeutische Behandlung erfolgt. Mittels Logrank-Test und Cox-Regressions-Analyse wurden die verschiedenen Risikofaktoren hinsichtlich des Einflusses auf die Krankheitsprognose verglichen. Unter den 114 Patienten hatten 81% eine positive Raucher- und knapp die Hälfte eine positive Alkoholanamnese. 64% der Tumore, 73% der Tonsillen- und 54% der Zungengrundkarzinome, waren p16^{INK4a}-positiv. Bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 28 Monaten zeigten 31 Patienten einen Krankheitsprogress bzw. 39 Patienten waren verstorben. Der p16^{INK4a}-Status hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf das Überleben. Nach 3 Jahren lag das progressionsfreie Überleben bei 79% und 52% (p=0,001) und das Gesamtüberleben bei 78% und 39% (p=0,001) für Patienten mit einem p16^{INK4a}-positiven gegenüber einem p16^{INK4a}-negativen Tumor. In der Cox-Regressions-Analyse waren lediglich der p16^{INK4a}-Status und das Tumorstadium unabhängige prognostische Faktoren. Ein

positiver p16^{INK4a}-Status war ungeachtet der Raucher- und Alkoholanamnese ein günstiger Prognoseparameter. Die vorliegende Arbeit zeigt eindrucksvoll, dass durch ein einfaches immunhistologisches Verfahren zwei insbesondere hinsichtlich der Prognose divergente Gruppen unter den Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen differenziert werden können und diese Methode daher grundsätzlich bei der histologischen Aufarbeitung von Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen Anwendung finden sollte.

6. Literaturverzeichnis

1. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 1998;58:5-13.
2. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human Papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35.
3. Annertz K, Anderson H, Biorklund A, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002;101:95-99.
4. Attner P, Du J, Näsman A, et al. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 2010;126:2879-84.
5. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5694-9.
6. Blot WJ, Mc Laughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282-7.
7. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010;11:21-8.
8. Bootz F. Bericht der Leitlinien-Konsensus-Konferenz am 7.8.1998 und 4.6.1999 im Auftrag des Präsidiums der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Leipzig

9. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheuerlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-7.
10. Bouwes Bavnick JN, Feltkamp M, Struijk L, ter Schegget J. Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001;6:207-11.
11. Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer* 1986;57:391-5.
12. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:157-60.
13. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:1015-9.
14. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985;36:575-8.
15. DeWeese TL, Walsh JC, Dillehay LE, et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter cell cycle progression but not radiosensitivity of carcinoma cells treated with low-dose-rate radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:145-54.
16. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.
17. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:3812-5.

18. Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer* 1984;34:603-12.
19. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261-69.
20. Feller L, Wood NH, Khammissa R, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and hpv-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal scc. *Head & Face Med* 2010;6:15.
21. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: ist impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol* 2010;21:1961-6.
22. Fischer CA, Zlobec I, Green E, et al. Is the improves prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 2010;126:1256-62.
23. Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 1990;50:6502-7.
24. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* 2000;11:489-95
25. Galloway DA, McDougall JK. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin Cancer Biol* 1996;7:309-15.

26. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 1999;11:191-99.
27. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.
28. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004;363:1488-9.
29. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic clinical and molecular entity. *Semin Oncol* 2004;31:744-54.
30. Gillison ML, D'Souza G, Westra W et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:407-20.
31. Gillison ML. HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer* 2009;1:383-5.
32. Goon P, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. HPV and head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol* 2009;1:36.
33. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107:394-400.
34. Hafkamp H, Manni J, Haesevoets A, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122:2656-64.

35. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2:755-62.
36. Harrison LB. Oropharyngeal Cancer. In: Harrison LB, Roy B, Hong WK. *Head and Neck Cancer - A Multidisciplinary Approach*, Lippincot-Raven Philadelphia, New York, 1999:445-80
37. Harwood CA, McGregor JM, Proby CM, Breuer J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *J Clin Pathol* 1999;52:249-53.
38. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
39. Hobbs CG, Stern JA Baily M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31:459-466.
40. Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, et al. p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2010;127:1595-1602.
41. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 1995;211:227-33.
42. Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M. The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* 1999;79:865-7.
43. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440.

44. Kim SH, Koo BS, Kang S, et al. HPV intergration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGRF and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer* 2007;120:1418-25.
45. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16INK4 as specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.
46. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, et al. p16(INK4A) overexpression is frequently detected in tumor-free tonsillar tissue without association with HPV. *Histopathology* 2010;56:957-67.
47. Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92:2875-84.
48. Klusmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-53.
49. Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 2003;192:129-32.
50. Klusmann JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, et al. HPV-assozierte Tonsillenkarcinome. *HNO* 2004; 52:208-18.
51. Klusmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res* 2009;15:1779-86.
52. Klusmann JP, Preuss SF, Speel EJ. Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. *HNO* 2009;57:113-22.

53. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7.Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010
54. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide:a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-75.
55. Laco J, Vosmikova H, Novakova V, et al. The role of high-risk human papillomavirus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients: a clinicopathological and molecular study of 46 cases. *Virchows Arch* 2011;458:179-187
56. Li Y, Nichols MA, Shay JW, et al. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994;54:6078-82.
57. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5630-6.
58. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-13.
59. Lindquist D, Romanitan M, Hammerstedt L, et al. Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol* 2007;1:350-5.
60. Löning T, Ilkenberg H, Becker J, et al. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA . *J Invest Dermatol* 1985;84:417-20.

61. Maier H, Weidauer H, Zöller J, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:387-91.
62. Maier H, Weidauer H. Alkohol- und Tabakkonsum sind Hauptrisikofaktoren für HNO-Tumore. *Fortschr Med* 1995;113:157-60.
63. Maier H, Tisch M, Kryberg H, Conradt C, Weidauer H. Berufliche Schadstoffexposition und Ernährung. Risikofaktoren für Mundhöhlen-, Rachen- und Kehlkopfkarzinome? *HNO* 2002;50:743-52.
64. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001;20:7874-87.
65. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72:1369-75.
66. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89:300-4.
67. Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, et al. Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2006;29:290-7.
68. Mork J, Lie AK, Glattre E, et al. Human Papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125-31.
69. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-28.
70. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125:362-66.

71. Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers* 2007;23:247-59.
72. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Psiani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108
73. Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx: surgery, radiation therapy, or both. *Cancer* 2002;94:2967-80.
74. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.
75. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev* 2008;17(4):340-4.
76. Pfister H, ter Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997;15:335-47.
77. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 trials and 17.346 patients. *Radiother Oncol* 2009;92:4-14.
78. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:24-31.
79. Ragin CCR, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121:1813-20

80. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrri A. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:412-23.
81. Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 1996;56:3630-33.
82. Reimers N, Kasper HU, Soenke J, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1713-38.
83. Rischin D, Young R, Fischer R, et al. Prognostic significance of HPV and p16 status in patients with oropharyngeal cancer treated on a large international phase III trial. *J Clin Oncol* 2009;27(suppl):15s.
84. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104:336-44.
85. Rossing MA, Vaughan TL, McKnight B. Diet and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 1989;44:593-7.
86. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999;18:5311-7.
87. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741-8.
88. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1926-36.

89. Sessions DG, Lenox J, Spectator GJ, Chao C, Chaudry OA. Analysis of treatment results for base of tongue cancer. *Laryngoscope* 2003;113:1252-61.
90. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27:6213-21.
91. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
92. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121:2465-72.
93. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KS, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-72.
94. Strome SE, Savva A, Brissett AE, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002;8:1093-100.
95. Syrjänen S. Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005 Mar;32 Suppl 1:S 59-66.
96. Syrjänen S. Human Papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med* 2007;356:1993-95.
97. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008;19:1681-90.
98. U.S. National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) 2011.
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html#incidence-mortality>

99. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-58.
100. Vander Ark W, DiNardo LJ, Oliver DS. Factors affecting smoking cessation in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 1997;107:888-92.
101. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and doxorubicin in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-1704.
102. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-194.
103. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus - associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Ann Oncol* 2008;19:1681-90.
104. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152:145-56.
105. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. UICC: TNM Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5.Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York 2005
106. Wittekind C, Meyer HJ. UICC: TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 7.Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 2010
107. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;42:221-330.
108. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002;55:58-60.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - Rauchen und/oder Alkohol.....	17
Abb. 2 - Verteilung der T-Stadien / Tumorlokalisation	19
Abb. 3 - Verteilung der N-Stadien / Tumorlokalisation.....	19
Abb. 4 - Verteilung der M-Stadien / Tumorlokalisation	19
Abb. 5 - Verteilung der Tumorstadien / Tumorlokalisation.....	20
Abb. 6 - Anzahl histologisch nachgewiesener zervikaler Lymphknotenmetastasen	22
Abb. 7 - p16 ^{INK4a} -Immunhistologie, Plattenepithelkarzinom der Tonsille, diffus p16 ^{INK4a} - positive Tumorzellnester.....	24
Abb. 8 - p16 ^{INK4a} -Immunhistologie, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom der Tonsille p16 ^{INK4a} -negativ.....	24
Abb. 9 - p16 ^{INK4a} -Status / Tumorlokalisation	26
Abb. 10 - p16 ^{INK4a} -Status / Patientengeschlecht.....	26
Abb. 11 – p16 ^{INK4a} -Status / Raucheranamnese	27
Abb. 12 - p16 ^{INK4a} -Status / Alkoholanamnese.....	28
Abb. 13 - p16 ^{INK4a} -positive Tumore / N-Stadium.....	30
Abb. 14 - p16 ^{INK4a} -negative Tumore / N-Stadium.....	30
Abb. 15 - p16 ^{INK4a} -positive Tumore / Tumorstadium.....	31
Abb. 16 - p16 ^{INK4a} -negative Tumore / Tumorstadium.....	32
Abb. 17 - p16 ^{INK4a} -Immunhistologie, zystische Lymphknotenmetastase, diffus p16 ^{INK4a} - positiv	34
Abb. 18 - Therapieverteilung	35
Abb. 19 - Therapieverteilung / p16 ^{INK4a} -Status	36
Abb. 20 - Therapieverteilung / Tumorlokalisation	38
Abb. 21 - Therapieergebnis / Tumorlokalisation	40
Abb. 22 - Therapieergebnis / Raucheranamnese	40
Abb. 23 - Therapieergebnis / Alkoholanamnese.....	41
Abb. 24 - Verlauf / p16 ^{INK4a} -Status.....	44
Abb. 25 - Überleben / Tumorlokalisation	45
Abb. 26 - Überleben / Raucheranamnese	46
Abb. 27 - Überleben / Alkoholanamnese	46
Abb. 28 - Überleben / p16 ^{INK4a} -Status.....	47
Abb. 29 - Überleben / Tumorlokalisation und p16 ^{INK4a} -Status.....	48

<i>Abb. 30 – Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Status</i>	49
<i>Abb. 31 – Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p16^{INK4a}-Status</i>	49
<i>Abb. 32 – Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Status und Rauchen/Alkohol</i>	50
<i>Abb. 33 – Gesamtüberleben in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Status und Rauchen/Alkohol</i>	50

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 - TNM-Klassifikation der Oropharynxkarzinome	6
Tab. 2 - UICC-Tumorstadien	7
Tab. 3 - Tumorlokalisation / Geschlecht	16
Tab. 4 - Raucheranamnese / Geschlecht.....	17
Tab. 5 - Alkoholanamnese / Geschlecht.....	17
Tab. 6 - Verteilung der TNM-Stadien / Tumorlokalisation.....	18
Tab. 7 - Verteilung der Tumorstadien / Tumorlokalisation	20
Tab. 8 - Histologieverteilung.....	21
Tab. 9 - Histologisches Grading	21
Tab. 10 - p16 ^{INK4a} -Status der Primärtumore	23
Tab. 11 - p16 ^{INK4a} -Status / Histologie.....	25
Tab. 12 - p16 ^{INK4a} -Status / Raucheranamnese	27
Tab. 13 - p16 ^{INK4a} -Status / Alkoholanamnese.....	28
Tab. 14 - p16 ^{INK4a} -Status / T-Stadium.....	29
Tab. 15 - p16 ^{INK4a} -Status / N-Stadium	29
Tab. 16 - p16 ^{INK4a} -Status / Tumorstadium	31
Tab. 17 - p16 ^{INK4a} -Status der Halslymphknotenmetastasen	32
Tab. 18 - Halslymhknotenmetastasen: p16 ^{INK4a} -Status / extrakapsuläre Ausdehnung..	33
Tab. 19 - Therapieverteilung.....	35
Tab. 20 - Therapieverteilung / p16 ^{INK4a} -Status.....	36
Tab. 21 - Operative Therapie / p16 ^{INK4a} -Status.....	37
Tab. 22 – Strahlentherapie / p16 ^{INK4a} -Status	37
Tab. 23 – Chemotherapien / p16 ^{INK4a} -Status	38
Tab. 24 - Therapieverteilung / Tumorlokalisation / p16 ^{INK4a} -Status.....	38
Tab. 25 - Therapieergebnis	39
Tab. 26 - Therapieergebnis / p16 ^{INK4a} -Status	41
Tab. 27 - Verlauf / Tumorlokalisation.....	42
Tab. 28 - Verlauf / Raucheranamnese.....	43
Tab. 29 - Verlauf / Alkoholanamnese	43
Tab. 30 - Verlauf / p16 ^{INK4a} -Status.....	44
Tab. 31 - Überleben / p16 ^{INK4a} -Status.....	47

9. Erklärung

Ich, Andre Zakarneh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inzidenz und Prognosep16^{INK4a}-assoziierter Tonsillen- und Zungengrundkarzinome in einer unselektierten Patientenkohorte in Berlin“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

10. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Sein erfrischendes Engagement sowie die stets unkomplizierte Resonanz und konstruktive Kritik haben mich fortwährend motiviert und die zügige Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. med. Ulrike Zimmermann und Frau Dr. med. Katharina Wölke, die die immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt haben und mir mit der Beantwortung meiner histopathologischen Fragen eine große Hilfe waren.

Zudem danke ich Frau Bettina Pehle für deren Erläuterung der immunhistochemischen Färbung.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. med. Maren Knödler bedanken.

Ferner gilt ein großer Dank meinem Chef, Herrn Prof. Dr. med. Oliver Kaschke, der mir immer die nötige Freiheit zur fachlichen Weiterentwicklung gewährte und gleichzeitig stets als letzte ratgebende Instanz zur Verfügung stand. Die Durchsicht des Manuskriptes sowie die gedanklichen Anstöße waren sehr hilfreich.

Des Weiteren möchte ich meinem Freund Ulf Szatkowski für die Hilfe bei der endgültigen Formgebung dieser Arbeit sowie den fortwährend moralischen Beistand danken.

Mein innigster Dank gilt meiner Frau Silke für ihre allumfassende Unterstützung, Aufmunterung, insbesondere ihre Geduld und ihr Verständnis.

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Vorabveröffentlichungen

Zakarneh A. Humane Papillomaviren in der HNO. Vortrag, Frühjahrstagung 2011 der Oto-laryngologischen Gesellschaft zu Berlin am 5.3.2011

Zakarneh A. Inzidenz und Prognose p16-assoziiertes Tonsillen- und Zungengrundkarzinome in einer unselektierten Patientenkohorte in Berlin. Vortrag, 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. 2.-5.6.2011, Freiburg

Knoedler M, Zakarneh A, Zimmermann U, Woelke K, Kaschke O, Keilholz U. Effects of human papillomavirus (HPV) and other potential risk factors on survival in patients with oropharyngeal cancer. Postervortrag, ASCO Annual Meeting 3.-7.6.2011, Chicago, IL, USA

Kaschke O, Zimmermann U, Woelke K, Knoedler M, Keilholz U, Zakarneh A. HPV and other risk factors – oropharyngeal tumor survival. Postervortrag, American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery Annual Meeting 11.-14.9.2011, San Francisco, CA, USA.

Anhang

Elektronischer Fragebogen

1. Daten zum Patienten selbst:
 - Geburtsdatum
 - Geschlecht
2. Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung
3. Nikotinanamnese:
 - Nichtraucher
 - Raucher
 - ehemaliger Raucher

Anhand der standardisierten Anamnesebögen konnte lediglich zwischen Rauchern und Nichtrauchern sowie ehemaligen Rauchern, die eine Nikotinabstinenz von 10 Jahren oder länger zum Zeitpunkt der Erstdiagnose angegeben hatten, unterschieden werden. Aussagen zu sogenannten Packungsjahren waren aus den Krankenunterlagen nur unregelmäßig zu erfassen und wurden daher in die Untersuchung nicht mit einbezogen.

4. Alkoholkonsum:
 - nie / selten
 - regelmäßig
 - (trockene/-r) Alkoholiker/-in

Als regelmäßiger Alkoholabusus wurden Angaben von einem Alkoholkonsum von mehreren Gläsern Bier, Wein oder Schnaps täglich oder an jedem / nahezu jedem Wochenende gewertet. Davon gesondert aufgeführt wurden Patienten aus deren Anamnese oder aus deren klinischem / stationärem Verlauf eine Alkoholkrankheit ersichtlich war.

5. Zweitmalignom(e):
 - ja / nein
 - synchron / metachron
 - Lokalisation

Es wurde eruiert, ob weitere Tumorerkrankungen vorbestanden oder zeitgleich auftraten. Hierbei war von besonderem Interesse, ob Zweit-Karzinome im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes bestanden oder im Rahmen der Panendoskopie und Bildgebung diagnostiziert werden konnten.

6. Tumorlokalisation:
 - Tonsille / Zungengrund
 - links / rechts / beidseitig / mittig
7. Tumorhistologie:
 - Plattenepithelkarzinom / lymphoepitheliales Karzinom
 - Subtyp (verhornend, nicht verhornend, basaloid)
 - Differenzierungsgrad / Grading (gut, mäßig, schlecht, undifferenziert)
 - Resektionsstatus im Falle einer OP (R0, R1, R2, Rx)
 - Lymphangioinvasion (L0, L1, Lx)
 - Veneninvasion (V0, V1, Vx)

8. Ursprung der Histologie:

- Biopsie / Tumorexzidat

Zur Einschätzung des Umfanges der histologischen Untersuchung wurde unterschieden, ob der feingewebliche Befund auf einer meist kleinen Biopsie oder Aufarbeitung des gesamten Tumorpräparates beruht.

9. Lymphknotenstatus:

- klinisch (c) / pathohistologisch (p) bestimmt
- Nachweis / kein Nachweis von LK-Filiae
- max. Größe etwaiger LK-Filiae
- zystische / nichtzystische LK-Filiae
- Anzahl der Lymphknotenmetastasen (0 - ∞)
- extrakapsuläre Ausbreitung

Die Beurteilung des Lymphknotenstatus erfolgte anhand der klinischen und radiologischen Befunde (CT/MRT) und im besten Fall durch eine pathohistologische Untersuchung anhand des im Rahmen einer Neck dissection gewonnen Materials. Die Zuverlässigkeit der Befundsicherung wurde durch die entsprechende Unterscheidung (c / p) kenntlich gemacht. Gleiches gilt für die Ermittlung des maximalen Durchmessers der größten nachweisbaren Lymphknotenmetastase. Zusätzlich wurde der bei zervikalen Metastasen von Tonsillenkarzinomen häufig beobachtete zystische Aspekt beurteilt. War eine Ausräumung der Halslymphknoten erfolgt, wurde die Anzahl der nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen sowie eine etwaige lymphknotenkapselüberschreitende Ausdehnung in die Auswertung eingebracht.

11. Tumorstaging:

- TNM
- Tumorstadium

Die Tumorstadien wurden gemäß der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aktuellen TNM-Klassifikation (UICC 2002) eingeteilt. Gleiches gilt für das sich daraus abgeleitete Tumorstadium. Die Zuverlässigkeit der Befundsicherung wurde ebenfalls durch eine Differenzierung von klinischer (c) und pathohistologischer (p) Stadieneinteilung aufgezeigt.

12. p16-Status d. Primärtumors:

- negativ / positiv
- nukleär / zytoplasmatisch / nukl. u. cytopl.

Die p16 (INK4A)-Überexpression im Primärtumorgewebe wurde hinsichtlich des Nachweises im Zellkern, im Zytoplasma oder in beidem unterschieden.

13. p16-Status d. LK-Metastasen:

- s. o.

Waren im Rahmen einer erfolgten Neck dissection Lymphknotenmetastasen nachgewiesen worden, wurden diese ebenso auf einen p16-Nachweis überprüft.

14. p16-Status d. Rezidives:

- s. o.

Hatte sich im Verlauf ein Rezidiv entwickelt und wurde dieses histologisch gesichert,

erfolgte auch an diesem Gewebe eine Überprüfung des p16-Status, um einen Vergleich mit dem ursprünglichen Tumor durchzuführen.

15. Therapie:

- ausschließlich OP / OP u. adjuvante Strahlentherapie
- OP u. adjuvante Radio-Chemo-Therapie / primäre Radiatio
- primäre Radio-Chemo-Therapie / palliative Therapie / keine Therapie

Zum Vergleich der Krankheitsverläufe wurden deren zugrunde liegenden unterschiedlichen Behandlungsregime erfasst.

16. Art der Operation:

- keine / ausschließlich Tumorresektion (TR) /
- TR und Neck dissection (ND) einseitig /
- TR und ND beidseitig

Zur Abschätzung des Umfanges der operativen Behandlung wurde diese wie o.g. aufgeschlüsselt. Das spezielle operative Verfahren (transorale laserchirurgische Tumorsektion vs. offenem Zugang, mit oder ohne Rekonstruktion) wurde nicht weiter unterschieden, da dieses nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein soll.

17. Strahlentherapie:

- nicht erfolgt / erfolgt / empfohlen aber abgelehnt / abgebrochen
- Strahlendosis in Gray

Das Ausmaß der Strahlentherapie wurde durch die Angabe der Strahlendosis festgelegt. Eine Unterscheidung der applizierten Einzeldosen erfolgte nicht. Aufgrund von z.T. undetaillierten Therapieberichten gingen Angaben zu akzelerierter oder hyperfraktionierter Applikationsform ebenso nicht in die Untersuchung ein.

18. Zytostatika:

- Cisplatin (CP) / 5-Fluorouracil (5-FU) / CP + 5-FU /
- Mitomycin + 5-FU / Cetuximab
- Anzahl der verabreichten Zyklen

19. Therapieausdauer:

- Therapie (TH) abgeschlossen / TH unterbrochen / TH abgebrochen

20. Therapieergebnis:

- komplette Remission / partielle Remission / Konstanz / Progression

Nach abgeschlossener Therapie erfolgte spätestens nach 3 Monaten ein Restaging, welches immer ein CT/MRT des Kopf-Hals-Bereiches beinhaltete. In 87 v. 115 Fällen (75,6%) wurde im Verlauf zur Beurteilung des Lokalbefundes eine endoskopische Untersuchung in Narkose mit erneuter Gewebeprobengewinnung durchgeführt.

21. Rezidiv:

- Rezidiv / kein Rezidiv
- lokales R. / regionäres R. / R. in Form von Fernmetastase(n)
- Zeitpunkt des Rezidives in Monaten nach Therapieende

22. Exitus letalis:

- Pat. lebt / Pat. tumor- bzw. therapieassoziiert verstorben /
- Pat. tumorunabhängig verstorben
 - o etwaiges Sterbedatum

23. Nachbeobachtungszeit

Die Nachbeobachtungszeit wurde in Monaten nach Abschluss der Primärbehandlung angegeben.

24. Überleben

Das Überleben wurde in Monaten nach Erstdiagnose des Primärtumors festgelegt.