

DISSERTATION

Das orale Plattenepithelkarzinom – Der prognostische und klinische Einfluss einer p16^{INK4a}- und Mib/Ki-67-Expression

The prognostic and clinical significance of p16^{INK4a} and Mib/Ki-67 in oral squamous cell carcinoma

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Richter

Erstbetreuung: PD Dr. Dr. Jan-Dirk Raguse

Datum der Promotion: 30.06.2024

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Christian Doll, Claudius Steffen, Benedicta Beck-Broichsitter, Maximilian Richter, Konrad Neumann, Anne Pohrt, Philipp Lohneis, Annika Lehmann, Max Heiland, Carmen Stromberger, Annekatriin Coordes, Korinna Jöhrens and Jan-Dirk Raguse; „The Prognostic Significance of p16 and its Role as a Surrogate Marker for Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 281 Cases“, Anticancer Research, 2022 / 18.10.2023

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
III. TABELLENVERZEICHNIS	7
IV. ABSTRACT	9
1. EINLEITUNG	11
1.1. DAS ORALE PLATTENEPITHELKARZINOM	11
1.1.1. Definition	11
1.1.2. Epidemiologie	11
1.1.3. Risikofaktoren	11
1.1.4. Symptome und Diagnostik	14
1.1.5. TNM-Klassifikation und UICC-Stadien	14
1.1.6. Therapie	17
1.1.7. Prognose	18
1.2. DAS HUMANE PAPILLOMAVIRUS	19
1.2.1. Allgemeines	19
1.2.2. Taxonomie	19
1.2.3. Einteilung der humanen Papillomaviren	19
1.2.4. Einfluss auf die Malignomentstehung	21
1.2.5. Diagnostik einer HPV-Infektion	23
1.3. KARZINOME DER KOPF-HALS-REGION UND DAS HUMANE PAPILLOMAVIRUS	25
1.3.1. Prävalenz einer HPV-Infektion bei Tumoren der Kopf-Hals-Region	25
1.3.2. Einfluss einer HPV-Infektion auf die Prognose von Tumoren der Kopf-Hals-Region	26
1.4. HPV-/p16 ^{INK4A} -NACHWEIS UND PROLIFERATION	27
1.5. ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT	28
2. MATERIAL UND METHODIK	28
2.1. PATIENT:INNENAUSWAHL UND DATENERHEBUNG	29
2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien	29
2.1.2. Beobachtungszeitraum	29
2.1.3. Datenaufbereitung	29
2.2. AUFBEREITUNG DER PRÄPARATE	30
2.2.1. Herstellung der Tissue-Micro-Arrays	30
2.2.2. Immunhistochemische Färbung für p16 ^{INK4a}	31
2.2.3. Immunhistochemische Färbung für Mib/Ki-67	31
2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion der p16 ^{INK4a} -positiven Tumoren	31
2.3. AUSWERTUNG	32
2.3.1. Auswertung der p16 ^{INK4a} -Färbung	32
2.3.2. Auswertung der Mib-Färbung	33
2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1. PATIENT:INNENKOLLEKTIV	35
3.2. GEWEBEARTEN DER PRÄPARATE	36
3.3. RISIKOFAKTOREN	37
3.4. IMMUNHISTOCHEMIE FÜR P16 ^{INK4A}	39
3.5. TUMOREN MIT EINER P16 ^{INK4A} -POSITIVITÄT	40
3.6. IMMUNHISTOCHEMIE FÜR MIB/KI-67	42
3.7. KORRELATION DER IMMUNHISTOCHEMIE FÜR MIB UND P16 ^{INK4A}	43

3.8. NACHWEIS VON HPV-DNA	44
3.9. KORRELATION VON MIB- UND HPV-STATUS	46
3.10. ÜBERLEBENSANALYSEN	47
3.10.1. Überleben in Abhängigkeit der p16 ^{INK4a} -Positivität	49
3.10.2. Überleben in Abhängigkeit der Mib-Positivität	52
3.10.3. Überleben in Abhängigkeit des HPV-Status bei p16 ^{INK4a} -positiven Tumoren	55
3.10.4. Überleben in Abhängigkeit der kombinierten p16 ^{INK4a} - und Mib-Positivität	55
3.10.5. Überleben in Abhängigkeit der kombinierten HPV- und Mib-Positivität	62
4. DISKUSSION.....	64
4.1. EINORDNUNG DES PATIENT:INNENKOLLEKTIVS	64
4.2. IMMUNHISTOCHEMIE FÜR P16 ^{INK4A}	64
4.3. IMMUNHISTOCHEMIE FÜR MIB/KI-67.....	65
4.4. ASSOZIATION VON P16 ^{INK4A} -POSITIVITÄT UND HPV-DNA-NACHWEIS	66
4.5. PROGNOSE	68
4.5.1. Prognose des Gesamtkollektivs	68
4.5.2. Einfluss der relativen p16 ^{INK4a} -Positivität auf das Überleben	69
4.5.3. Einfluss der relativen Mib-Positivität auf das Überleben	70
4.5.4. Einfluss der kombinierten p16 ^{INK4a} - und Mib-Positivität auf das Überleben	71
4.5.5. Einfluss der kombinierten p16 ^{INK4a} -/Mib-Positivität und der Therapieform.....	72
4.5.6. Einfluss des HPV-Status bei p16 ^{INK4a} -positiven Tumoren.....	73
4.5.7. Einfluss des kombinierten HPV/p16 ^{INK4a} - und Mib-Status auf das Überleben.....	74
4.6. STÄRKEN UND LIMITATIONEN	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	76
6. LITERATURVERZEICHNIS	77
7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	92
8. ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN.....	93
9. LEBENS LAUF	94
10. KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	94
11. DANKSAGUNG	96
12. BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS.....	97

I. Abkürzungsverzeichnis

a.e.	am ehesten
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	<i>engl.</i> cyclin-dependent kinase; <i>dt.</i> Cyclin-abhängige Kinasen
CI	<i>engl.</i> confidence interval; <i>dt.</i> Konfidenzintervall
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid; <i>dt.</i> Desoxyribonukleinsäure
E6AP	<i>engl.</i> E6 associated protein; <i>dt.</i> E6 assoziiertes Protein
et al.	et alia/alii/aliae
HNSCC	<i>engl.</i> head and neck squamous cell carcinoma; <i>dt.</i> Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region
HPV	humanes Papillomavirus
i.e.	id est
LCR	Long Coding Region
n	Anzahl
o.g.	oben genannt
OPSCC	<i>engl.</i> oropharyngeal squamous cell carcinoma; <i>dt.</i> oropharyngeales Plattenepithelkarzinom
ORF	opening reading frame
OSCC	<i>engl.</i> oral squamous cell carcinoma; <i>dt.</i> orales Plattenepithelkarzinom
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction; <i>dt.</i> Polymerase-Kettenreaktion
Rb	Retinoblastom-Protein
R(C)T	Radio(chemo)therapie
RNA	<i>engl.</i> ribonucleic acid; <i>dt.</i> Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
SD	<i>engl.</i> standard deviation; <i>dt.</i> Standardabweichung
TMA	Tissue-Micro-Array
u.a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control/ Union Internationale Contre le Cancer
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

Weitere Abkürzungen, die im Rahmen von Abbildungen, Tabellen oder Diagrammen zusätzlich genutzt werden, sind in den zugehörigen Legenden erläutert.

II. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Fotografie 1: Immunhistochemische Präparate p16 ^{INK4a} -Färbung.....	33
Diagramm 1: Boxplot des durchschnittlichen Alters bei Erstdiagnose gruppiert nach dem biologischen Geschlecht.....	35
Diagramm 2: Kreisdiagramm mit Darstellung der Verteilung der Therapieformen im Gesamtkollektiv.....	36
Diagramm 3: Balkendiagramm des Alkoholkonsums in absoluter Häufigkeit unterteilt nach dem biologischen Geschlecht.....	38
Diagramm 4: Balkendiagramm des Tabakkonsums in absoluter Häufigkeit unterteilt nach dem biologischen Geschlecht.....	38
Diagramm 5: Histogramm der kategorisierten Verteilung der relativen p16 ^{INK4A} -Positivität der Tumoren.....	39
Diagramm 6: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen p16 ^{INK4A} -Positivität nach dem Grading.....	40
Diagramm 7: Histogramm der kategorisierten Verteilung der relativen Mib-Positivität der Tumoren.....	42
Diagramm 8: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen Mib-Positivität unterteilt nach dem Grading.....	43
Diagramm 9: Boxplot der durchschnittlichen relativen Mib-Positivität gruppiert nach der p16 ^{INK4a} -Positivität.....	43
Diagramm 10: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	47
Diagramm 11: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier.....	48
Diagramm 12: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs unterteilt nach den verschiedenen Therapieformen bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	49
Diagramm 13: Überlebenskurven der p16 ^{INK4a} -positiven im Vergleich zu p16 ^{INK4a} -negativen Tumoren (Cut-off 70%) bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	50
Diagramm 14: Überlebenskurven der p16 ^{INK4a} -positiven im Vergleich zu p16 ^{INK4a} -negativen Tumoren (Cut-off 70%) bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier.....	51
Diagramm 15: Überlebenskurve von Patient:innen mit einer Operation und Adjuvanz unterteilt nach p16 ^{INK4a} -positiven und p16 ^{INK4a} -negativen Tumoren (Cut-off 25%) nach Kaplan-Meier.....	52

Diagramm 16: Überlebenskurven des kategorisierten relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	53
Diagramm 17: Überlebenskurven von Tumoren mit einer kategorisierten Mib-Positivität von 0-10% unterteilt nach der Therapieform bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	54
Diagramm 18: Überlebenskurven von Patient:innen mit Radiochemotherapie bei einem Cut-off Wert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 21% bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	55
Diagramm 19: Überlebenskurven von Tumoren mit niedrigen Teilungsraten (Mib-Positivität <37%) unterteilt nach der p16 ^{INK4a} -Positivität bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	56
Diagramm 20: Überlebenskurven von Tumoren mit hohen Teilungsraten (Mib-Positivität >37%) unterteilt nach der p16 ^{INK4a} -Positivität bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	57
Diagramm 21: Überlebenskurven von Tumoren mit niedrigen Teilungsraten (Mib-Positivität <37%) unterteilt nach der p16 ^{INK4a} -Positivität bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier.....	58
Diagramm 22: Überlebenskurven von p16 ^{INK4a} -positiven Tumoren bei einem Cut-off Wert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 37% bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	59
Diagramm 23: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten p16 ^{INK4a} - und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan Meier.....	60
Diagramm 24: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten p16 ^{INK4a} - und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier im Kollektiv der Patient:innen mit Operation ohne Adjuvanz.....	61
Diagramm 25: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten HPV- und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier.....	63

III. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Gegenüberstellung der T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 7. und 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (ohne Berücksichtigung von Tumoren der Lippe).....	15
Tabelle 2: N-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren.....	16
Tabelle 3: M-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren.....	16

Tabelle 4: UICC-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren.....	17
Tabelle 5: Einfluss des Nachweises von HPV-DNA oder einer p16 ^{INK4a} -Positivität auf die Prognose bei Tumoren der Kopf-Hals-Region.....	27
Tabelle 6: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten der klinischen und pathologischen T-Stadien.....	36
Tabelle 7: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten der klinischen und pathologischen N-Stadien.....	37
Tabelle 8: Auflistung der absoluten und relativen Häufigkeit der klinischen M-Stadien.....	37
Tabelle 9: Vergleich klinischer Parameter zwischen p16 ^{INK4a} -positiven und p16 ^{INK4a} -negativen Tumoren.....	41
Tabelle 10: Vergleich klinischer Parameter zwischen dem Kollektiv der p16 ^{INK4a} -positiven und HPV-positiven Tumoren (p16+/HPV+) sowie dem Kollektiv der p16 ^{INK4a} -positiven und HPV-negativen Tumoren (p16+/HPV-).....	45
Tabelle 11: Darstellung ausgewählter klinischer Charakteristika der auf den HPV-Status untersuchten p16 ^{INK4a} -positiven Tumoren sowie der korrespondierenden Mib-Positivität.....	46
Tabelle 12: Vergleichende Überlebensanalyse des kombinierten p16-/Mib-Status in Bezug auf das Overall Survival nach Kaplan-Meier.....	60
Tabelle 13: Vergleichende Analyse des Overall Survivals des kombinierten p16 ^{INK4a} - und Mib-Status von Patient:innen mit stattgehabter Operation ohne Adjuvanz.....	62
Tabelle 14: Vergleichende Überlebensanalyse des kombinierten HPV/Mib-Status in Bezug auf das Overall Survival nach Kaplan-Meier.....	63
Tabelle 15: Vergleich der p16- und HPV-Positivität in oralen Plattenepithelkarzinomen sowie Schlussfolgerungen zur Nutzung von p16 als Surrogatmarker einer HPV-Infektion.....	68

IV. Abstract

Einleitung: Der Einfluss der p16 Expression auf das biologische Verhalten und die Prognose des oralen Plattenepithelkarzinoms stellt ein kontrovers diskutiertes Thema dar. Wenngleich insbesondere für oropharyngeale Tumoren eine Verbesserung des Überlebens bei erhöhter p16-Expression als gesichert gilt, differieren die Ergebnisse in Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom stark. Aufgrund der elementaren Rolle als Tumorsuppressor gilt die Beeinflussung des p16 als integraler Bestandteil einer HPV induzierten Karzinogenese u.a. mit Einfluss auf die Teilungsrate. Primäre Zielstellung dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von p16- und Mib-Status auf das orale Plattenepithelkarzinom in einer großen Kohorte. **Material und Methodik:** Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Präparate von 339 Tumoren wurden gegen p16 und Mib/Ki67 mittels Immunhistochemie gefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte als manuelle Zählung mit Bestimmung des relativen Anteils positiver Tumorzellen. P16-positiven Präparate wurden auf das Vorhandensein von HPV-DNA mittels PCR-Testung untersucht. Die Bestimmung der primären Endpunkte erfolgte als Korrelation der erzielten Ergebnisse mit den klinischen Charakteristika. **Ergebnisse:** 23 der 339 Tumoren (6,8%) erfüllten die Kriterien einer p16-Positivität, wobei in lediglich 6 der auszuwertenden Tumoren ein HPV-DNA Nachweis gelang (positiv-prädiktiver Wert: 0,4). Kombiniert p16-/HPV-positive Tumoren zeigen sich vermehrt bei jüngeren Patient:innen ($p=0,036$) und häufiger eine extrakapsuläre Ausbreitung ($p=0,015$). Der durchschnittliche Anteil Mib-positiver Tumorzellen lag bei 28,4% ohne signifikante Unterschiede zwischen p16-positiven und -negativen Tumoren. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss des p16- und Mib-Status auf das Grading mit schlechter differenzierten Tumoren bei jeweils hoher Positivität. In der Überlebensanalyse ergaben sich lediglich in der kombinierten Betrachtung der p16- und Mib-Positivität signifikante Unterschiede, wobei p16-positive Tumoren mit niedrigen Teilungsraten allen anderen Subgruppen überlegen sind ($p=0,048$, $p=0,048$, $p=0,034$). Es zeigte sich eine Überlegenheit von p16-positiven Tumoren mit niedrigen Teilungsraten gegenüber allen anderen Subgruppen bei Patient:innen, die einer Operation ohne Adjuvanz zugeführt wurden ($p=0,005$, $p=0,014$, $p=0,006$). Diese Unterschiede finden sich nicht bei Patient:innen mit einer Operation und anschließender Adjuvanz. Während Tumoren mit einer Teilungsrate $>21\%$ von einer systemischen Therapie profitieren ($p=0,034$), zeigten Tumoren mit einer p16-Positivität $>25\%$ eine bessere Prognose unter einer Adjuvanz ($p=0,042$). **Zusammenfassung:** In dem hier untersuchten Kollektiv fand sich keine Korrelation zwischen p16-/HPV-Status und Mib-Positivität. Es zeigte sich ein entscheidender Einfluss der kombinierten Betrachtung von p16- und Mib-Positivität sowohl auf das Overall Survival im Gesamtkollektiv als auch in Bezug auf die Therapieform.

IV. Abstract (English)

Introduction: The influence of p16 expression on the biological behavior and prognosis of oral squamous cell carcinoma is a subject of controversial discussion. While an improvement in survival is well-established for the entirety of head and neck tumors, especially for oropharyngeal tumors, the results vary significantly concerning oral squamous cell carcinoma. Due to its fundamental role as a tumor suppressor, the influence of p16 is considered an integral part of HPV-induced carcinogenesis, including an impact on the rate of cell division. Therefore, the increased expression of p16 is discussed as a surrogate marker for HPV infection. The primary objective of this study is to investigate the influence of p16 and Mib status on oral squamous cell carcinoma in a large cohort. **Material and Methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of 339 tumors were stained for p16 and Mib/Ki67. Evaluation of the preparations was carried out through manual counting, determining the relative proportion of positive tumor cells. In a further step, p16-positive preparations were tested for the presence of HPV DNA using PCR testing. The primary endpoints were determined by correlating the obtained results with clinical characteristics. **Results:** Among the 339 tumors, 23 (6.8%) met the criteria for p16 positivity, with only 6 of these tumors showing HPV DNA detection (positive predictive value: 0.4). Combined p16/HPV-positive tumors were observed more frequently in younger patients ($p=0.036$) and exhibited extracapsular spread more frequently ($p=0.015$). The average proportion of Mib-positive tumor cells was 28.4%, with no significant differences between p16-positive and negative tumors. There was a significant influence of p16 and Mib status on grading, with poorly differentiated tumors showing high positivity for both. In survival analysis, significant differences were observed only in the combined evaluation of p16 and Mib positivity, with p16-positive tumors with low proliferation rates being superior to all other subgroups ($p=0.048$, $p=0.048$, $p=0.034$). When divided by treatment modality, p16-positive tumors with low proliferation rates were superior to all other subgroups in patients who underwent surgery without adjuvant therapy ($p=0.005$, $p=0.014$, $p=0.006$). These differences were not observed in patients who underwent surgery followed by adjuvant therapy. While tumors with a proliferation rate $>21\%$ benefited from systemic therapy ($p=0.034$), tumors with p16 positivity $>25\%$ showed an improved response to adjuvant therapy ($p=0.042$). **Conclusion:** In this study, no correlation was found between p16/HPV status and Mib positivity. There is a significant influence of the combined evaluation of p16 and Mib positivity on overall survival in the overall cohort as well as on overall survival related to the treatment modality.

1. Einleitung

1.1. Das orale Plattenepithelkarzinom

1.1.1. Definition

In der 2017 erschienen Novellierung der Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren definiert die World Health Organization (WHO) das orale Plattenepithelkarzinom als einen malignen Tumor mit vorwiegend squamöser Differenzierung, der dem mukosalen Epithel der Mundhöhle entspringt [1]. Mit einem Anteil von über 90% handelt es sich um die mit Abstand häufigste Entität oraler epithelialer Malignome [1-3].

Das orale Plattenepithelkarzinom wird insbesondere im angloamerikanischen Raum den Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) zugeordnet und frequent mit verschiedenen Tumoren anderer Lokalisationen unter den oralen, pharyngealen und Lippenkarzinomen subsummiert [1, 4].

1.1.2. Epidemiologie

Weltweit sind orale, pharyngeale und Lippenkarzinome zusammengenommen die sechst- bis siebthäufigste Tumorneuerkrankung und neunthäufigste tumorassoziierte Todesursache, wobei sich eine enorme globale Disparität mit einem gehäuften Vorkommen in Entwicklungsländern zeigt [4-6].

Während in Großbritannien der Anteil an den Gesamtmalignomen bei ca. 3% liegt, stellen orale Karzinome in den Hochrisikoländern wie z.B. Indien oder Sri-Lanka bis zu 25% der Malignomneuerkrankungen dar [5]. Prinzipiell nimmt die Inzidenz von oralen, pharyngealen und Lippenkarzinomen seit 1990 in Ländern mit hohen Erkrankungsraten (z.B. China oder Indien) ab und in jenen mit niedrigen (z.B. Japan) zu [4].

Nach der aktuellen „Global Cancer Statistics 2020“ liegt die Anzahl an neudiagnostizierten oralen und Lippenkarzinomen weltweit bei 377 713, was einem Anteil von ca. 2% an allen Tumor-Neuerkrankungen entspricht [7]. Die höchsten regionalen Inzidenzen finden sich demnach in Melanesien, im Süden Zentralasiens sowie Osteuropa, wobei auch in Westeuropa vergleichsweise hohe Werte beschrieben werden [7].

Die Relation von erkrankten Männern zu Frauen verhält sich wie 1,5-2:1 [5, 8].

1.1.3. Risikofaktoren

In der aktuellen Literatur wird eine Vielzahl begünstigender Faktoren für die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben [9, 10]. Die Hauptrisikofaktoren (Tabak- und/oder Alkoholkonsum) finden sich bei wenigstens 75% der Erkrankten in Industrienationen [11, 12] und wirken sowohl singular als auch synergistisch [11]. Es wird angenommen, dass ausgedehnter Alkohol- und Zigarettenkonsum das Risiko der Entstehung von oralen Tumoren um das 38-fache erhöht [11].

Tabak

Tabak beschreibt jedwede Verarbeitung der Pflanzenblätter der Gattung Nicotina [9]. Der Hauptwirkstoff Nikotin ist ein psychoaktives Alkaloid und wirkt über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren, nachdem es über die Mukosa von Lungen und Mund-/Rachenraum resorbiert wurde [9]. Je nach Aufbereitung kann Tabak geraucht (z.B. Zigaretten, Zigarren, Pfeife) oder z.B. als Kau- beziehungsweise Schnupftabak (sogenannter „smokeless Tobacco“) konsumiert werden [13]. Des Weiteren existieren sogenannte elektronische Zigaretten („E-Zigaretten“) [13], die, obgleich sie keinen Tabak enthalten [14], wohl dennoch kanzerogene und toxische Stoffe in geringeren Mengen generieren [15].

Im Jahre 2000 existierten schätzungsweise ca. 1,2 Milliarden Tabaknutzer weltweit, wobei im Durchschnitt der Anteil an Männern größer als jener der Frauen war [16]. Das entsprach in etwa einem Zigarettenverbrauch von 5,7 Billionen Stück pro Jahr [16]. In einer deutschlandweiten Erhebung von 2018 gaben ca. 28% der Befragten an, aktuell Tabak zu nutzen, wobei Männer und Personen mit fehlendem Schulabschluss im Vergleich überwogen [17].

Rauchen stellt einen der führenden Risikofaktoren für Krankheit und vorzeitiges Versterben dar [18]. Allein im Zigarettenrauch wurden bereits über 150 toxische und/oder kanzerogene Substanzen nachgewiesen [19]. Neben diversen anderen Erkrankungen ist etwa ein Viertel der oralen Karzinome dem Zigarettenkonsum zuzurechnen [20]. Hierbei besteht ein dosisabhängiges Risiko, welches sowohl von der Dauer des Rauchens als auch von den täglich konsumierten Zigaretten abhängt [20, 21].

Ebenso gilt eine kanzerogene Wirkung des „smokeless Tobacco“, insbesondere in Hinblick auf Tumoren der Kopf-Hals-Region, als gesichert [22, 23].

Alkohol

Alkoholische Getränke sind eine inhomogene Gruppe, die sich unter anderem in der Konzentration des Hauptwirkstoffes Ethanol unterscheiden [9].

Die WHO konstatiert im „Global Status Report on Alcohol 2004“, dass 2 Milliarden Menschen Alkohol konsumieren und ca. 76,3 Millionen Menschen die Diagnosekriterien eines kritischen Alkoholkonsums erfüllen [24]. Der „Global Status Report on Alcohol and Health 2018“ konstatiert eine über die Jahre stabile Rate an sog. „heavy episodic drinkers“ von 18,2% [25]. Im globalen Vergleich bleibt die besorgniserregend hohe Rate an jungen „heavy episodic drinkers“ in Europa zu nennen [25]. Insgesamt ist der Anteil von Alkohol konsumierenden Frauen geringer als jener der Männer [25].

Es ist erwiesen, dass Alkohol bzw. dessen Metabolite dosisabhängige kanzerogene Effekte auf verschiedenste Organsysteme besitzen [26-28]. Etwa 3,6% aller Karzinome werden auf Alkoholkonsum zurückgeführt [27].

Die Studienlage zu Tumoren des aerodigestiven Traktes lässt sich als sehr umfangreich bezeichnen und zeigt ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko in der Entstehung von oralen Karzinomen bei einem

Alkoholkonsum von 50g pro Tag im Vergleich zur Abstinenz (reviewed in [29]). Eine 2011 veröffentlichte Publikation postuliert, dass bis zu 44% der aerodigestiven Karzinome der Männer und bis zu 25% derer der Frauen in acht untersuchten Ländern Westeuropas auf Alkoholkonsum zurückzuführen sind [30]. Global betrachtet, scheint ausgedehnter Gebrauch von Alkohol für 7-19% der oralen Karzinome ursächlich zu sein [20, 31].

Betel-Kautabak

Erzeugnisse der „Betelnuss“ oder auch „Arekanuss“ können in Kombination mit Tabak oder ohne diesen konsumiert werden und gelten seit 2004 als humanes Kanzerogen [32, 33]. Sie werden hauptsächlich in Ländern Süd-Ost-Asiens wie z.B. Indien, China oder Taiwan genutzt [34-36]. Neben mukosalen Veränderungen der Mundhöhle wie lichenoiden Läsionen oder Leukoplakien, fördert der Konsum von Betel-Kautabak, insbesondere in Kombination mit anderen Risikofaktoren, die Entstehung von oralen Karzinomen [37-39].

Weitere Risikofaktoren

Neben den Hauptrisikofaktoren (Tabak- und Alkoholkonsum) werden zunehmend weitere Risikofaktoren in der Literatur diskutiert.

An dieser Stelle sei insbesondere auf die Rolle humaner Papillomaviren verwiesen, die in den Kapiteln 1.2 „Das humane Papillomavirus“ und 1.3. „Karzinome der Kopf-Hals-Region und humane Papillomaviren“ eingehend erörtert wird. Neuere Daten zeigen zudem eine Änderung der mikrobiellen Mundflora bei Patient:innen mit oralen Plattenepithelkarzinomen, was einerseits als mögliche Causa und andererseits als Mittel des Diagnostikums oder der Therapie diskutiert wird [40].

Neben diesen Umweltfaktoren konnten diverse genetische Veränderungen beschrieben werden, die im Sinne einer fortschreitenden Schädigung zur Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen beitragen können [41].

Weiterhin sind sog. „Lifestyle-Faktoren“ zu nennen. So wird postuliert, dass eine fleischreiche und gemüsearme Ernährung, beispielsweise über eine gesteigerte Inflammation (dietary inflammatory potential), als möglicher Risikofaktor in der Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms in Betracht kommt [42, 43]. Im Umkehrschluss scheint eine ausgewogene Ernährung mit Reduktion potentiell inflammatorisch wirkender Komponenten (z.B. Diät vom mediterranen Typ) einen geringen protektiven Effekt zu besitzen [44]. Auch das Sexualverhalten (insbesondere oraler Geschlechtsverkehr und/oder Promiskuität) kann über eine potenzielle Übertragung von humanen Papillomaviren das Auftreten von oralen Plattenepithelkarzinomen bzw. Kopf-Hals-Tumoren, vor allem in jüngeren Bevölkerungsschichten, begünstigen [45, 46].

1.1.4. Symptome und Diagnostik

Das orale Plattenepithelkarzinom ist ein Tumor der Mundhöhle, der vornehmlich an der Zunge oder im Bereich des Mundbodens lokalisiert ist [47]. Gerade in den Anfangsstadien zeigt sich der Tumor häufig asymptomatisch, wohingegen in fortgeschrittenen Verläufen Symptome wie Foetor ex ore, Sensibilitätsstörungen sowie Schmerzen auftreten [48]. Klinisch zeigt sich zumeist eine ulzerierende Raumforderung, wenngleich diese bereits Zeichen für ein fortgeschrittenes Stadium ist [47, 48].

Aufgrund der inapparenten Verläufe in Anfangsstadien ist eine suffiziente Früherkennung unabdingbar, da der Zeitpunkt der Erstdiagnose entscheidenden Einfluss auf den weiteren Therapieverlauf und die Prognose hat [49]. Nicht zuletzt ist die regelmäßige Kontrolle prämaligener Vorstufen und ggf. frühzeitige Probenentnahme im Sinne einer Exzisions- oder Inzisionsbiopsie von maßgeblicher Bedeutung [50]. Ein Großteil an Tumoren wird, unter anderem durch Patient:innenfaktoren, erst in lokal weit fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert [51].

Die Diagnostik richtet sich nach der aktuellen S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“, die zuletzt 2021 eine Überarbeitung erfuhr [52].

Nach ausführlicher ärztlicher Untersuchung stehen Diagnostika zur Erfassung der Lokalausdehnung und Diagnosesicherung im Vordergrund. Hierzu werden die Computertomographie oder Magnetresonanztomographie genutzt [52]. Des Weiteren ist sowohl die Bestimmung der klinischen Lokalausdehnung wie auch der Ausschluss synchroner Zweitkarzinome elementarer Bestandteil der Primärdiagnostik [52].

Eine Probenentnahme sollte aus dem Randbereich der suspekten Läsion und chronologisch nach Durchführung der Schnittbildgebung erfolgen, um Artefakte zu vermeiden [52].

Zum klinischen Ausschluss lokoregionärer Metastasen erfolgt eine Computertomographie oder Magnetresonanztomographie des Halses, die ggf. um weitere Verfahren, wie die ultraschallgestützte Feinnadelbiopsie, ergänzt werden kann [52].

Zum Ausschluss von Fernmetastasen oder Zweittumoren außerhalb der Kopf-Hals-Region sollte insbesondere bei lokal fortgeschrittenen Tumoren eine Computertomographie des Thorax durchgeführt werden [52]. Diese Basismaßnahme wird ggf. um eine Sonographie des Abdomens erweitert [52].

Nuklearmedizinische Verfahren wie eine Positronen-Emissions-Tomographie sind ausgewählten Fragestellungen vorbehalten und stellen keine diagnostischen Routineverfahren dar [52].

1.1.5. TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

Bis zur Zusammenführung im Jahre 1987 existierte einerseits die Tumorklassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) und andererseits die Einteilung nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) [53]. Die achte und somit aktuellste Auflage der einheitlichen TNM-Klassifikation von

Malignomen erschien 2017 [54]. Insbesondere bei den Tumoren der Kopf-Hals-Region finden sich zum Teil erhebliche Änderungen im Vergleich zur vorherigen siebten Version, was sich unter anderem in einer neuen Einteilung HPV-bedingter oropharyngealer Tumoren, den erneuerten T- sowie N-Stadien nasopharyngealer Tumoren und T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle widerspiegelt [55].

T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle

Das T-Stadium beschreibt die lokale Ausdehnung des Primärtumors [54]. Mehrere Studien belegten einen Zusammenhang zwischen Tumordicke oder auch Invasionstiefe (*engl.* Depth of Invasion) und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sowie Frührezidiven von oralen Plattenepithelkarzinomen [56, 57], weshalb in der aktuellen achten Version der TNM-Klassifikation eine Anpassung der T-Stadien erfolgte [55]. Eine Gegenüberstellung der T-Stadien nach der siebten und achten Version der TNM-Klassifikation ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 7. und 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (ohne Berücksichtigung von Tumoren der Lippe)

T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 7. Edition der TNM-Klassifikation von 2010 [58]	T-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation von 2017 [54]
Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0 Kein Anhalt für Primärtumor	T0 Kein Anhalt für Primärtumor
Tis Carcinoma in situ	Tis Carcinoma in situ
T1 Tumor ≤2 cm in größter Ausdehnung	T1 Größe ≤2 cm und DOI ≤0,5 cm
T2 Tumor >2 cm, aber ≤4 cm in größter Ausdehnung	T2 Größe ≤2 cm und DOI >0,5 cm, aber ≤1,0 cm oder Größe 2-4 cm und DOI ≤1 cm
T3 Tumor >4 cm in größter Ausdehnung	T3 Größe >4 cm oder DOI >1 cm
T4a Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in die äußere Muskulatur der Zunge	T4a Größe >4 cm und DOI >1 cm oder Tumor infiltriert durch den kortikalen Knochen der Mandibula oder Maxilla oder involviert den Sinus maxillaris oder infiltriert die Haut des Gesichts
T4b Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotica interna	T4b Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotica interna

Legende Tabelle 1: A. = Arteria, DOI = Depth of Invasion (*dt.* Invasionstiefe), Proc. = Processus

Anmerkung Tabelle 1: Dargestellt sind die T-Stadien sowie deren Beschreibung von Tumoren der Mundhöhle nach der TNM-Klassifikation in der 7. und 8. Edition. In der aktuellen 8. Version findet neben der Ausdehnung auch die Invasionstiefe des Primarius Berücksichtigung.

N-Stadien von Tumoren der Mundhöhle

Die N-Stadien treffen eine Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von regionalen Lymphknotenmetastasen und beziehen sich im Rahmen von Tumoren der Mundhöhle auf die Lymphknoten des Halses [54]. Eine Zusammenfassung der N-Stadien von Tumoren der Mundhöhle liefert die Tabelle 2.

Tabelle 2: N-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (nach [54])

Nx		Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1		Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten ≤ 3 cm in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
N2	N2a	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten >3 cm, aber ≤ 6 cm in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung oder Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten bis 3cm mit extranodaler Ausbreitung
	N2c	Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ≤ 6 cm in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
N3	N3a	Metastase(n) in Lymphknoten >6 cm in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
	N3b	Metastase(n) in einem oder multiplen Lymphknoten mit klinischer extranodaler Ausbreitung

Anmerkung Tabelle 2: Dargestellt sind die N-Stadien sowie deren Beschreibung von Tumoren der Mundhöhle nach der TNM-Klassifikation in der 8. Edition.

M-Stadien von Tumoren der Mundhöhle

Die M-Stadien beschreiben das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Fernmetastasen [54]. In der Tabelle 3 sind die M-Stadien für Tumoren der Mundhöhle aufgeführt.

Tabelle 3: M-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (nach [54])

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Anmerkung Tabelle 3: Dargestellt sind die M-Stadien sowie deren Beschreibung von Tumoren der Mundhöhle nach der TNM-Klassifikation in der 8. Edition.

UICC-Stadien

Anhand der Vorgaben der UICC erfolgt die Zusammenfassung der TNM-Klassifikation in fünf Stadien (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: UICC-Stadien von Tumoren der Mundhöhle nach der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (nach [54])

Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-2	N1	M0
	T3	N0-1	M0
IV	IV A T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
	IV B jedes T	N3	M0
	T4b	jedes N	M0
	IV C jedes T	jedes N	M1

Anmerkung Tabelle 4: Dargestellt sind die UICC-Stadien sowie deren Beschreibung von Tumoren der Mundhöhle nach der TNM-Klassifikation in der 8. Edition.

1.1.6. Therapie

Entsprechend den Empfehlungen der aktuellen S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ stehen individuelle Therapiekonzepte unter Berücksichtigung einer Resektabilität und des Allgemeinzustandes der Patient:innen im Vordergrund [52]. Hierfür haben sich sogenannte Tumorboards etabliert, die alle beteiligten Fachdisziplinen involvieren [52]. Die Empfehlungen werden mit den Patient:innen diskutiert und im Sinne eines Shared-Decision-Making umgesetzt [52]. Grundsätzlich sollten resektable Tumoren bei entsprechendem Allgemeinzustand des Patienten bzw. der Patientin primär chirurgisch therapiert werden [52]. Dies beinhaltet die radikale Tumorresektion mit anschließender Rekonstruktion, bei der mikrovaskulär-anastomosierte Transplantate im Vordergrund stehen [52]. Das Management der Halslymphknoten ist kontrovers diskutiert und Gegenstand aktueller Forschung. Bei klinisch unauffälligen Halslymphknoten ist die selektive Neck-Dissection aktuell Therapie der Wahl, die ggf. um eine modifiziert radikale Neck-Dissection erweitert werden kann [52]. Moderne Konzepte wie eine Wächterlymphknotenbiopsie (*engl.* Sentinel-Lymphnode-Biopsy) werden zunehmend diskutiert, wobei aktuell eine klare Evidenz fehlt [52]. Bei klinisch positivem

cervicalem Lymphknotenbefall soll eine angemessene Lymphknotenausräumung, in der Regel eine modifiziert radikale Neck-Dissection, durchgeführt werden [52].

Eine postoperative Adjuvanz im Sinne einer Radio(chemo)therapie wird bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, knappen oder befallenen Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion oder histopathologischem Lymphknotenbefall empfohlen [52].

1.1.7. Prognose

Überlebensraten und Prognosefaktoren

Insgesamt lässt sich das orale Plattenepithelkarzinom als eine Entität mit vergleichsweise guter Prognose beschreiben. Die durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensraten belaufen sich auf ca. 50-60% [51].

Viele Publikationen beschäftigen sich mit möglichen Einflussfaktoren auf das Überleben. Beispielhaft wirken sich ein niedriges Alter bei Erstdiagnose, das weibliche Geschlecht, niedrige T-Stadien, gute Differenzierung, eine geringe Tumordicke sowie fehlende (lymphogene) Metastasierung positiv auf das Gesamtüberleben aus [59, 60].

Proliferationsrate als Prognosefaktor

Ein grundsätzliches Modell versteht Onkogenese im Allgemeinen als Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose, weshalb eine pathologisch gesteigerte Zellvermehrung einen wichtigen Faktor in der Entstehung von Tumoren darstellt [61].

Einen hohen Stellenwert besitzt hierbei das Protein Ki-67 (Genlocus auf Chromosom 10), welches vermehrt in der Mitose exprimiert wird und somit als Marker der Zellproliferation genutzt werden kann [62, 63].

Eine Fülle von Publikationen liefert zum Teil konträre Ergebnisse bezüglich der Korrelation von Ki-67 und der Prognose bei oralen Plattenepithelkarzinomen [64]. Xie et al. bündelt diese Studien im Rahmen einer Metaanalyse und beschreibt seinerseits eine verschlechterte Prognose [64]. So korreliert eine vermehrte Expression von Ki-67 mit einem geringeren Overall Survival und Disease free Survival, insbesondere in asiatischen Populationen [64]. Es imponieren stark differente Grenzwerte von 10% bis 65% für die Definition einer Mib-Positivität. Die Autor:innen führten Subgruppenanalysen bei einem Grenzwert von 21% durch, ohne eine mathematische Herleitung hierfür zu liefern.

Aufgrund der hohen Heterogenität zwischen den einzelnen Publikationen und den geringen Fallzahlen wären weitere Untersuchungen mit standardisierten immunhistochemischen Färbungen und großen Fallzahlen anzustreben [64].

1.2. Das humane Papillomavirus

1.2.1. Allgemeines

Die unbehüllten Papillomaviren gehören zu der Familie der Papillomaviridae und zeichnen sich durch ein icosahedrales Kapsid sowie eine circuläre, doppelsträngige DNA mit ca. 8000 Basenpaaren aus [65-67]. Sie zeigen ein weltweites Vorkommen, wobei sowohl Menschen, durch humane Papillomaviren, als auch andere Amnioten, durch tierische Papillomaviren, ubiquitär befallen werden [66].

1.2.2. Taxonomie

Die aktuelle Unterteilung der humanen Papillomaviren geht auf den Papillomavirus Workshop von 1995 zurück und folgt den Vorgaben des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [68-70]. Anhand von DNA-Sequenz Analysen des hoch konservierten Open-Reading Frames-Genlocus, welcher für das Kapsid-Protein L1 codiert, werden derzeit fünf Gattungen unterschieden: α -Papillomaviren, β -Papillomaviren, γ -Papillomaviren, μ -Papillomaviren und ν -Papillomaviren [69, 70]. Die weitere Nomenklatur der HPV-Typen erfolgt nach der strikten Definition des ICTV und Abgleich des kompletten Genoms mit dem international HPV Reference Center [69, 70]. Es gilt die Regel, dass sich die einzelnen HPV-Typen um mindestens 10% in der DNA-Sequenz des L1 Gens unterscheiden [69]. Die weitere taxonomische Unterteilung in Subtypen oder Varianten erfolgt bei geringerer Differenz des Genlocus [69]. Mit Einführung der Polymerase Kettenreaktion wurden Hunderte von HPV-Typen postuliert, von denen sich nach der einheitlichen Definition des ICTV bis zum Jahre 2004 lediglich 92 humane und 24 tierische Papillomavirus-Typen bestätigten [69]. Bis heute erweiterte sich die Anzahl der Typen über ca. 150 im Jahr 2010 auf mehr als 200 humane und über 60 tierische Papillomaviren [67, 70, 71].

1.2.3. Einteilung der humanen Papillomaviren

Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Einteilung, die sich entweder am biologischen Verhalten im Sinne des onkogenen Potentials oder dem Ort der klinischen Manifestation orientieren [72-74].

Einteilung nach dem onkogenen Potential

Infektionen mit α -Papillomaviren finden sich sowohl bei benignen (z.B. anogenitale Genitalwarzen) als auch bei malignen Zervixpathologien (zervikale intraepitheliale Neoplasie und invasives Zervixkarzinom)[75]. Im Zuge multipler Studien gelang eine Unterscheidung in sogenannte high-risk und low-risk HPV-Typen, die sich im Risiko des Auftretens einer malignen Entartung unterscheiden [73, 75, 76]:

- high-risk HPV-Typen

Ende des 20. Jahrhunderts konnte ein bereits lang vermuteter Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und zervikalen intraepithelialen Neoplasien beziehungsweise dem invasiven Zervixkarzinomen bewiesen werden [77]. Mit der Veröffentlichung mehrerer Case-Control-Studien stufte die International Agency for Research on Cancer im Jahre 1995 die HPV-Typen 16 und 18 als humane Kanzerogene ein [78]. Weitere high-risk HPV-Typen wurden inkonstant identifiziert, wobei die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 und 58 als relativ einheitlich akzeptiert gelten [76, 79-81].

Manche Autor:innen unterteilen diese Gruppe in high-risk/HPV 16 Typen, welche zu gleichen Teilen eine zervikale intraepitheliale Neoplasie und ein invasives Karzinom verursachen und die high-risk/HPV 18 Typen (HPV-Typen 18, 45, 56), die häufiger Ätiologie eines invasiven Karzinoms sind [76].

- low-risk HPV-Typen

Die low-risk HPV-Typen stellen den Großteil der bekannten humanen Papillomaviren dar und zeichnen sich durch eine geringere Rate an malignen Entartungen aus [71]. Sie stehen in Zusammenhang mit benignen hyperproliferativen Läsionen wie z.B. der Epidermodysplasia Verruciformis und low-grade zervikalen intraepithelialen Neoplasien [71, 76].

Exemplarische Beispiele für low-risk HPV-Typen sind die HPV-Typen 8 und 11 [69].

- intermediate-risk HPV-Typen

Sie nehmen eine Zwischenstellung ein und finden sich häufiger bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien als bei invasiven Karzinomen [76].

Einteilung nach dem Ort der klinischen Manifestation

Man unterscheidet bei dieser Form der Klassifikation in HPV-Typen, die eher mukosale oder kutane Läsionen verursachen [69]:

- mukosale HPV-Typen

Die typischen Vertreter stammen aus der Gattung der γ - und α -Papillomaviren [69].

- kutane HPV-Typen

Hierzu zählen hauptsächlich die β -Papillomaviren [69]. Aber auch einige α - sowie die mu- und nu-Papillomaviren lassen sich den kutanen HPV-Typen zuordnen [69, 82].

1.2.4. Einfluss auf die Malignomentstehung

Lebenszyklus

Das Genom der humanen Papillomaviren unterteilt sich in sogenannte Early (E1, 2, 4, 5, 6 und 7) und Late (L1 und 2) Opening Reading Frames (ORF) sowie die nicht kodierenden Long Control Region (LCR), die über cis-responsible Elemente modulierenden Einfluss auf die Transkription und Replikation nimmt [83-85]. Nach Infektion der basalen Zellschicht von Haut oder Mukosa über Wunden beziehungsweise Mikrofissuren [86, 87] erfolgt die Replikation viraler DNA in niedriger Amplifikationsrate durch die viralen Genprodukte E1 („virus DNA helicase“) und E2 („virus transcription factor and genome tether“). Die weiteren Early Genes ermöglichen optimale Voraussetzungen für die DNA-Replikation des Virus durch z.B. Inaktivierung des Interferon regulierenden Faktors oder Verhinderung der Apoptose von Wirtszellen [88-91]. Mit zunehmender Migration der Tochterzellen in höhere Epithelschichten werden höhere Amplifikationsraten der viralen DNA generiert sowie die Late Opening Reading Frames transkribiert, welche für die Kapsidproteine L1 und 2 kodieren [92].

Als Causa der Entwicklung von Tumoren und letztendlich Malignomen wird vor allem das Zusammenspiel der Onkoproteine E6 und E7 angenommen [93-95]. Maßgeblich scheint hierbei eine erhöhte Expression dieser Proteine zu sein, wodurch es zu häufigeren Zellzykluseintritten [96] und einem Verlust der Differenzierung des Epithels kommt [97]. Diese Dysregulation mit erhöhtem Malignomrisiko kann z.B. als Folge einer pathologischen Integration von HPV DNA in das zelluläre Erbgut [98-100] oder eventuell durch epigenetische Modifikationen der LCR entstehen [101-103].

Virales Onkoprotein E6

Die Proteinsequenz und Anzahl der Zink-bindenden Domänen des viralen Onkoproteins E6 sind zwischen den HPV-Typen verschieden [104, 105]. Daneben existieren einige HPV-Typen, die keinen E6 ORF besitzen [106, 107]. Gemeinsame Endstrecke der E6-Proteine scheint u.a. der Tumorsuppressor p53 zu sein [108], wiewohl neuere Studien zudem eine Beeinflussung des Notch-Signalweges zeigen [109]. Im Folgenden werden ausgewählte zelluläre Veränderungen exemplarisch skizziert (modifiziert nach [88]):

Einfluss auf p-53: Das E6-Protein des HPV-16 bindet an alpha-helicale LXXLL-Sequenzen der Ubiquitinligase E6 associated Protein (E6AP) [110-114], welches durch die LXXLL-Domäne eine stabilisierende Wirkung auf das virale Onkogen besitzt [115]. Durch eine Konformationsänderung wird die Bindung an p53 ermöglicht [116], wodurch ein E6-E6AP-p53-Komplex entsteht, der eine E6 Multimerisierung fördert [117] und somit die Ubiquitinierung durch das E6AP initiiert [111, 118]. Der daraus folgende Abbau des p53 erfolgt durch Proteasomen [111, 118].

Im Gegensatz dazu scheinen HPV-Typen mit Replikation in der Haut an die LXXLL-Sequenz der Transkriptionsfaktoren Mastermind-Like Proteins (MAML) zu binden [109].

Einfluss auf die Transkription: Eine elementare Rolle nehmen hierbei die „histone acetyltransferases“ (HATs) ein, die als Kofaktoren für p53 und Transkriptionsfaktoren fungieren und von E6 affektiert werden (reviewed in [88]). So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine E6-E6AP abhängige Degradation des ADA3 stattfindet, was unter anderem zu einer nachgewiesenen Aufhebung der stabilisierenden Wirkung auf das p53 sowie einer Inhibierung des p14ARF-p53-Weges mit folgender Immortalisierung der Zellen führt [119-121].

Einfluss auf den Notch-Signalweg: Die Rolle des Notch-Signalweges in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen ist gut erforscht und zeigt sich bei komplettem knock-out [122], aber auch bei der Deletion von z.B. Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region (RBPJ) [123]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Aktivierung des Signalweges in Kombination mit E6 und 7 [124] als auch die Missensmutation in Notch1 zur Malignomentstehung beitragen kann [125, 126].

Einfluss auf die Apoptose: Die Bindung von HPV-16 E6 an die Procaspase 8 führt zu einer verminderten Komplexbildung mit dem Fas-Associating Death Domain-Containing Protein [127], was in einer Reduktion des Ansprechens auf apoptotische Stimuli mündet [128]. Des Weiteren wurde eine vermehrte Degradation des pro-apoptotischen Bak durch den HPV-18 E6-E6AP-Komplex beschrieben [129].

Virales Onkoprotein E7

Das Onkoprotein E7 ist ein sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch vorkommendes Phosphoprotein [130, 131], welches mehrere konservierte Anteile enthält und zu einer Multimerbildung neigt [132, 133]. Es zeigt eine partielle Strukturähnlichkeit zum E1A-Protein von Adenoviren [134].

Zu der bis dato beschriebenen Vielzahl zellulärer Strukturen, die eine Beeinflussung durch das Onkoprotein E7 erfahren, zählen unter anderem das Rb-Protein (siehe unten), Lysin-Demethylase 6A [135], E2F Transcription Factor 2 [136], p300 [137], p16^{INK4A} (siehe unten), mikro-RNA-203 [138], M Phase Phosphoprotein 2 [139] und Matrix-Metalloprotease 9 [140].

Im Weiteren soll beispielhaft die grundlegende Interaktion mit der Rb-Protein-Familie und dem p16^{INK4a} dargestellt werden (modifiziert nach [89]):

Einfluss auf die Rb-Protein-Familie: Dem Rb-Protein, wie auch weiteren Mitgliedern der Rb-Familie, kommt eine entscheidende Rolle im physiologischen Zellzyklus zu, da es im hypophosphorylierten Zustand mit Transkriptionsfaktoren, wie z.B. der E2F-Familie, Komplexe bildet [141-144]. Dadurch wird der proteasomale Abbau der gebundenen Strukturen verhindert [145] und die Transkription von Genen, die beispielsweise eine Zellzyklusprogression bewirken [146, 147], unterbunden [148, 149]. Findet im Gegensatz dazu eine Phosphorylierung des Rb-Proteins durch cyclinabhängige Kinasen statt, werden die gebundenen Transkriptionsfaktoren abgegeben und die Zelle tritt aus der G1- in die S-Phase über [150-152].

Das Onkoprotein E7 greift in den beschriebenen physiologischen Ablauf ein, indem es über die LXCXE-Domäne an das hypophosphorylierte Rb-Protein bindet und somit die Bildung des Rb-E2F-Komplexes konsekutiv verhindert, wodurch es zu vermehrtem freien E2F mit folgendem Eintritt in die S-Phase kommt [153-156]. Weiterhin wurde eine E7-assoziierte Degradation des Rb-Proteins durch das Proteasom beschrieben [157].

Einfluss auf das p16^{INK4a}: Eine Cyclin D abhängige Phosphorylierung des Rb-Proteins durch CDK4/6 führt zu einer vermehrten Expression von p16^{INK4a} [158, 159]. Das p16^{INK4a} ist ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, der CDK4/CDK6 bindet [160], wodurch eine Komplexbildung mit Cyclin D verhindert wird, was wiederum zu einem Abbau von letzterem führt [161]. Die Folge ist ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase [159].

Neben dieser physiologischen existiert die pathologische Erhöhung des p16^{INK4a}-Proteins bei HPV-infizierten Zellen, welche sich in der Inaktivierung des Rb-Proteins durch das Onkoprotein E7 zu erklären scheint [161]. Entgegen der beschriebenen Wirkung führt die simultane Expression von E7 und p16^{INK4a} nicht zu einem Zellzyklusarrest, sondern zu einer Immortalisierung der Zelle [162].

1.2.5. Diagnostik einer HPV-Infektion

HPV-Antikörper

Es existieren Ansätze, die Antikörper gegen HPV-Antigene als Mittel zur Erueierung einer Infektion und Diagnostik bei Zervixkarzinomen oder Tumoren der Kopf-Hals-Region postulieren [163, 164]. Vor allem für Malignome des Oropharynx scheinen die Immunglobuline gegen das virale Onkoprotein E6 eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis HPV-induzierter Karzinome zu besitzen, wohingegen Malignome anderer Lokalisationen eine geringere Assoziation zeigen [165].

Diverse Studien befassten sich mit dem Zusammenhang von HPV-Antikörpern und dem Auftreten von Karzinomen der Kopf-Hals-Region. Exemplarisch sei auf prospektive Studien aus Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) verwiesen, die bei ca. 35-42% der Patient:innen mit oropharyngealen Karzinomen prädiagnostische Serum-Antikörper gegen das HPV16 E6 nachweisen konnten, wohingegen die Kontrollgruppe in weniger als einem Prozent der Fälle seropositiv war [166, 167]. Hierbei scheint es, als wären bereits über zehn Jahre vor der Tumordiagnose die HPV-spezifischen Immunglobuline nachweisbar [166, 167].

Weiterhin wurde eine Assoziation von HPV-Antikörpern in Serum sowie Speichel und Rezidiv einer Tumorerkrankung untersucht. Hierbei finden sich Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen, die von einer positiven, negativen und keiner statistisch signifikanten Korrelation berichten [168-170]. Eine Arbeit mit großer Patient:innenzahl von Lang Kuhs et al. aus dem Jahre 2017 erklärt diese Unterschiede mit der divergenten Methodik und beschreibt ihrerseits eine erhöhte Rezidivrate bei prätherapeutischer Seronegativität [171].

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass HPV-Antikörper sowohl zur Klärung der Ätiologie von HPV-assoziierten Karzinomen als auch zur Prognoseabschätzung und Bestimmung der Rezidivwahrscheinlichkeit von Tumoren der Kopf-Hals-Region einen Stellenwert besitzen könnten [171, 172]. Weiterhin scheinen Serumantikörper gegen bestimmte HPV-Antigene als Diagnostikum einer HPV-Infektion verwendbar zu sein [163, 164].

Immunhistochemische Färbung für p16^{INK4a}

In Kapitel 1.2.4. „Einfluss auf die Malignomentstehung“ wurde bereits die Rolle des viralen Onkoproteins E7 in der Überexpression des p16^{INK4A} erklärt. Dieser Zusammenhang bietet die Möglichkeit, einen vermehrten immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a} (p16^{INK4a}-Positivität) als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion z.B. im Rahmen von Zervixpathologien und Karzinomen der Kopf-Hals-Region zu nutzen [164, 173-175].

Hierbei ist zu beachten, dass die Definition einer p16^{INK4a}-Positivität zwischen den Studien variiert, sich aber in der Regel an der relativen Anzahl gefärbter Tumorzellen orientiert [176]. Daneben lassen manche Autor:innen zusätzlich oder isoliert die Intensität der Färbung einfließen [176]. Nach Prigge et al. finden sich v.a. zwei gängige Definitionen einer p16^{INK4a}-Positivität, wobei auf eine große Diversität abseits dieser relativ einheitlichen Auslegung verwiesen sei (modifiziert nach [176]):

1. 8 der 24 untersuchten Studien (ca. 33%) definierten eine p16^{INK4a}-Positivität bei einem Anteil p16^{INK4a}-positiver Zellen von >70%. Die meisten dieser Publikationen verlangten zusätzlich eine diffuse, cytoplasmatische sowie nukleäre Färbung und eine starke Färbungsintensität.
2. 6 der 24 untersuchten Studien (25%) definierten eine p16^{INK4a}-Positivität bei >50% p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen, ggf. erweitert um weitere Bedingungen wie z.B. cytoplasmatische und/oder nukleärer Färbung und/oder einer mindestens mittleren Färbungsintensität.

Aus diesen differenten Definitionen ergeben sich Limitationen, die in der Tendenz zu erhöhten Raten an falsch positiven Ergebnissen führen können [177]. Weiterhin existieren virusunabhängige Mechanismen, die eine p16^{INK4a} Überexpression induzieren und daher in der Auswertung bedacht werden sollten [177-179]. Für oropharyngeale Tumoren werden Raten von 15 bis 20% von diesen HPV-negativen/p16^{INK4a}-positiven Karzinomen angenommen [180], die sich in der Überlebensrate nicht von den HPV-negativen Karzinomen unterscheiden [181]. Daneben wurden HPV-positiv/p16^{INK4a}-negative Tumoren beschrieben [175].

Trotz dieser Aspekte gilt die immunhistochemische Färbung für p16^{INK4a} als akzeptierte, kostengünstigere Alternative bzw. Ergänzung zu den PCR-Verfahren und zeigt eine Sensitivität von 94% sowie Spezifität von 83% [176, 177, 182]. Es wird empfohlen, diese Basismaßnahme ggf. um andere Verfahren der HPV-Detektion zu erweitern [176, 183, 184].

Detektion von HPV-DNA

Die Detektion von HPV-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion findet fortlaufende Innovationen und ist Gegenstand der Forschung, wobei sich insbesondere Gefrierschnitte zum Nachweis eignen [185]. Die initial durchgeführten Assays mittels radioaktiver Nukleotide wurden im Verlauf stetig weiterentwickelt [186]. Heutige Tests bedienen sich hauptsächlich chemilumineszenter Nachweismethoden [186].

Aktuell erhältliche Produkte können sowohl high-risk wie auch low-risk HPV-Typen mittels eines simultanen Prozesses abbilden [186]. Lediglich wenige Kopien von HPV-DNA genügen zum positiven Nachweis, was sich in der sehr hohen Sensitivität der DNA-PCR widerspiegelt [187]. Ein grundsätzlicher Kritikpunkt ist die fehlende Unterscheidung zwischen HPV-Assoziation und -Induktion bei singulärem Nachweis von HPV-DNA ohne die entsprechenden viralen Onkogene [185]. So zeigten beispielsweise van Houten et al., dass lediglich 50% der HPV-DNA-positiven Tumoren eine Expression der viralen Onkogene E6/E7 aufwiesen [185]. Der Anteil von Tumoren, die tatsächlich durch HPV induziert sind, ist nach aktueller Meinung somit deutlich geringer als es Analysen eines HPV-DNA Nachweises vermuten ließen [188].

Moderne Konzepte nutzen eine Kombination von p16-Färbung, HPV-DNA- sowie Onkogen-Nachweis [164]. Hierdurch lassen sich laut Smeets et al. sowohl bezüglich der Sensitivität wie auch der Spezifität Detektionsraten einer HPV-Induktion von 100% erzielen [164].

Detektion der Onkoproteine E6 und E7

Bereits 1990 gelang der Nachweis transkribierter mRNA von E6 und E7 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [189]. Da die beiden Onkoproteine elementarer Bestandteil in den HPV assoziierten zellulären Veränderung sind, gilt deren Nachweis mittels PCR als Goldstandard in der Diagnostik von HPV induzierten Karzinomen [190, 191]. Vor allem die real-time PCR für das E6*I (splice-Produkt des E6 ORF) zeigt gute Ergebnisse [192].

Die üblicherweise genutzten Formalin-fixierten Paraffin Präparate bergen hierbei das Risiko einer RNA-Fragmentation oder -Modifikation, was es mit ggf. differenter Methodik zu beheben gilt [193, 194].

1.3. Karzinome der Kopf-Hals-Region und das humane Papillomavirus

1.3.1. Prävalenz einer HPV-Infektion bei Tumoren der Kopf-Hals-Region

Für die Allgemeinheit der Kopf-Hals-Tumoren findet sich in der Literatur ein klar herausgestellter Zusammenhang zu einer HPV-Infektion, wobei insbesondere die oropharyngealen Plattenepithelkarzinome eine hohe Assoziation von 40-80% zeigen [195].

Diese Ergebnisse sind aber nicht unbedingt auf orale Plattenepithelkarzinome übertragbar. Angaben zu HPV-Infektionen bei oralen Plattenepithelkarzinomen variieren stark von 0 bis 100%, was an unterschiedlichen Nachweismethoden, verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle oder den geographischen

Unterschieden liegen mag [196]. Manche Autor:innen postulieren einen vollständig fehlenden Zusammenhang und vermuten Karzinome primär anderer Regionen des Kopf-Halses, insbesondere oropharyngeale Tumoren, als fälschlicherweise HPV-positiv angenommene orale Karzinome [197].

Grundsätzlich scheint die Prävalenz einer HPV-Infektion in oralen Plattenepithelkarzinomen (HPV-Assoziation) größer zu sein als bei gesunden Probanden, wobei ein kausaler Zusammenhang (HPV-Driven) lediglich bei einem Bruchteil dieser Tumoren gegeben ist [185, 198].

1.3.2. Einfluss einer HPV-Infektion auf die Prognose von Tumoren der Kopf-Hals-Region

In Kapitel 1.2.5. „Diagnostik einer HPV-Infektion“ wurde bereits die Rolle der p16^{INK4a}-Färbung als Surrogatmarker einer HPV-Infektion erörtert. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss einer möglichen HPV-Infektion über den Nachweis von HPV-DNA, der p16^{INK4a}-Positivität oder einer Kombination aus den beiden Verfahren auf die Prognose bei Tumoren der Kopf-Hals-Region.

Einfluss des Nachweises von HPV-DNA

Prinzipiell scheint der Nachweis von HPV-DNA, im Sinne einer HPV-Infektion, einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Tumoren der Kopf-Hals-Region zu besitzen [199, 200]. Dieser Effekt zeigt sich insbesondere bei Patient:innen mit oropharyngealen Karzinomen [199]. Im Gegensatz dazu beeinflusst der Nachweis von HPV-DNA in oralen Plattenepithelkarzinomen die Zeit bis zur Progression, das Überleben oder das progressionsfreie Überleben in der Mehrzahl der Studien nicht [201-203]. Eine detaillierte Übersicht bietet die Tabelle 5 „Einfluss des Nachweises von HPV-DNA oder einer p16^{INK4a}-Positivität auf die Prognose bei Tumoren der Kopf-Hals-Region“.

Einfluss des Nachweises einer p16^{INK4a}-Positivität

Neben dem Nachweis von HPV-DNA untersuchen einige Studien den Einfluss der p16^{INK4a}-Expression auf die Prognose. Eine p16^{INK4a}-Positivität zeigt hierbei einen günstigen Effekt auf das Überleben bei oropharyngealen Tumoren und wird mitunter als stärkster Prognosefaktor tituiert [204, 205]. Bei oralen Plattenepithelkarzinomen zeigen sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, wobei die meisten Studien einen generell fehlenden Einfluss des p16^{INK4a}-Status auf das Überleben beschreiben [201, 202, 206]. Wang et al. berichten sogar von einem tendenziell negativen Einfluss, allerdings ohne Signifikanz [204]. Für bestimmte Subgruppen wie beispielsweise einem Patient:innenkollektiv im Norden Israels wurde ein signifikanter positiver Einfluss auf die Prognose bzw. das Überleben beschrieben [207]. Aufgrund der geringen Prävalenz einer HPV-Assoziation bei oralen Plattenepithelkarzinomen und der daraus folgenden geringen Raten an HPV-/p16^{INK4a}-positiven Tumoren empfehlen viele Autor:innen weiterführende Analysen mit größeren Fallzahlen [201, 204].

Tabelle 5: Einfluss des Nachweises von HPV-DNA oder einer p16^{INK4a}-Positivität auf die Prognose bei Tumoren der Kopf-Hals-Region

Erstautor:in [Publikation]	ST	Jahr	Tumor	n	Nachweis HPV-DNA			Nachweis p16 ^{INK4a} -Pos.		
					OS	PFS/TTP	P	OS	PFS/TTP	P
Blahak [201]	RA	2019	OSCC	78	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Palve [202]	RA	2018	OSCC	153	+/-			+/-		
Loeschke [203]	RA	2016	OSCC	91	+/-	+/-				
Malerova [208]	RA	2020	OSCC	120				-		-
Ghantous [207]	RA	2018	OSCC	82	+/-			+		
Hernandez et al. [209]	PBS	2019	OSCC	122	+/-			+/-		
Ni et al. [210]	RA	2021	OSCC	147				+/-		+/-
Nauta et al. [211]	RA	2021	OSCC	940	+/-			+/-		
Duray [212]	RA	2012	OSCC	162				-		+/-
Elango [213]	CCS	2011	OSCC	60				+		
Lee [214]	PA	2012	OSCC	173				-		
Annertz [215]	PBS	2014	OSCC/OPSCC	128				-		
Wang [204]	RA	2017	OSCC	95				(-)		
			OPSCC	93				+		
Ragin [199]	MA	2007	OPSCC/HNSCC		+					
			Non-OPSCC		+/-					
Fischer [205]	RA	2010	OPSCC	102						+
Kida [206]	RA	2018	OPSCC	64						+/-
Liang [200]	PBS	2012	HNSCC	722	+					

Legende Tabelle 5: ST = Studientyp, n = Patient:innenanzahl (entfällt bei Metaanalysen), p16^{INK4a}-Pos. = p16^{INK4a}-Positivität, OS = Overall Survival, TTP = Time to Progression, PFS = Progression Free Survival, P = Prognose, RA = retrospektive Analyse, MA = Metaanalyse, PBS = Population Based Study“, CCS = Case-Control-Study, OSCC = orales Plattenepithelkarzinom, OPSCC = oropharyngeales Plattenepithelkarzinom, HNSCC = Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, + = positiver Einfluss, +/- = fehlender Einfluss, (-) = nicht signifikanter negativer Einfluss, - = negativer Einfluss

Anmerkung Tabelle 5: Dargestellt sind eine Metaanalyse sowie später publizierte Studien, die eine Aussage bezüglich HPV-DNA- und/oder p16^{INK4a}-Positivitäts-Nachweis sowie der Prognose bei verschiedenen Tumoren der Kopf-Hals-Region treffen. Während der Nachweis von HPV-DNA bzw. einer p16^{INK4a}-Positivität bei oropharyngealen und Kopf-Hals-Tumoren einen positiven Einfluss auf die Prognose besitzt, variieren die Ergebnisse beim oralen Plattenepithelkarzinom, wobei die meisten Studien einen fehlenden Einfluss postulieren.

1.4. HPV-/p16^{INK4a}-Nachweis und Proliferation

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln erörtert, führt eine erhöhte Expression von p16^{INK4a} im physiologischen Zustand zu einem Zellzyklusarrest und ggf. Einleitung der Apoptose. Entgegen dieser

Zellseneszenz zeigen HPV infizierte Zellen eine maligne Transformation mit entsprechender Genese von Präkanzerosen bis hin zu invasiven Karzinomen (siehe hierzu Kapitel 1.2.4. „Einfluss auf die Malignomentstehung“).

Diese nahezu pathognomonische „Entkopplung“ von Tumorsuppressor und pathologisch erhöhter Zellteilung wird in moderneren Nachweismethoden eines Zervixkarzinoms genutzt.

So zeigte sich eine verbesserte Früherkennung von intraepithelialen zervikalen Neoplasien unter Nutzung einer kombinierten p16^{INK4a}-/Mib-Färbung (sog. „Dualstaining“) im Vergleich zur alleinigen p16^{INK4a}-Färbung [216, 217]. Ähnliche Effekte lassen sich auch im Bereich der Kopf-Hals-Tumoren finden [218].

Bezüglich der Prognose zeigen orale Plattenepithelkarzinome mit einer erhöhten p16^{INK4a}-Positivität ohne eine pathologische Mib-Erhöhung ein tendenziell besseres Überleben (ohne statistische Signifikanz) [219].

Eine Assoziation zu humanen Papillomaviren ließ sich im Kopf-Hals-Bereich nicht zeigen [219].

Der Umfang aktueller Publikationen, die einen konkreten, i.e. quantitativen, Bezug zwischen p16-/Mib-Nachweis und der Proliferation herstellen, lässt sich als unzureichend bezeichnen.

1.5. Zielstellung dieser Arbeit

Wie bereits erörtert finden sich z.T. widersprüchliche Angaben bezüglich der Prävalenz und Prognose von p16^{INK4a}-positiven oralen Plattenepithelkarzinomen in der Literatur. Studien mit größeren Fallzahlen werden frequent empfohlen. Bezüglich der Rolle einer Mib-Positivität existieren diverse Grenzwerte, wobei ein prinzipieller Einfluss der Teilungsrate auf die Prognose postuliert wird. Wenngleich HPV-assoziierte Veränderungen der Teilungsraten pathophysiologisch herleitbar sind, finden sich keine Studien, die einen quantitativen Einfluss der p16^{INK4a}-Erhöhung oder HPV-Assoziation auf die Teilungsrate von oralen Plattenepithelkarzinomen untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung des Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumoren sowie des Einflusses einer p16-Positivität auf klinische Parameter insbesondere die Prognose. Weiterhin werden der Einfluss der Teilungsrate sowie die Kombination aus Teilungsrate und p16^{INK4a}-Positivität erörtert. Als Nebenfragestellung untersucht diese Arbeit den Anteil HPV-positiver Tumoren im Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven Tumoren.

2. Material und Methodik

Diese Arbeit wurde unter Beachtung der „Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ sowie der gesetzlichen Richtlinien und Bestimmungen im Sinne des Tier- und Datenschutzes erstellt. Ein zustimmendes Ethikvotum der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (EA2/028/15) liegt vor.

2.1. Patient:innenauswahl und Datenerhebung

2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden alle volljährigen Patient:innen mit der Erstdiagnose eines oralen Plattenepithelkarzinoms im Zeitraum vom 01.01.2005 bis zum 31.12.2011, die in der Charité - Universitätsmedizin Berlin (standortübergreifend) behandelt wurden. Ein „Cancer of Unknown Primary“-Syndrom oder Tumoren primär anderer Lokalisation (insbesondere oropharyngeale Karzinome) führte zum Ausschluss. In die abschließende Datenanalyse wurden Patient:innen eingeschlossen, die o.g. Kriterien erfüllen und von denen ein ausreichend großes Tumorpräparat zur histopathologischen Aufarbeitung vorlag.

2.1.2. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom 01.01.2005, bzw. dem Datum der Erstdiagnose, bis zum 31.05.2017.

2.1.3. Datenaufbereitung

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte von allen eingeschlossenen Patient:innen. Hierzu wurden sowohl elektronische Datenverarbeitungssysteme (SAP) als auch die archivierten Akten der Patient:innen genutzt.

Mittels dieser Quellen wurden die folgenden klinischen Daten erhoben:

- Geschlecht
- Tumorassoziierter Tod
- Todesdatum
- Datum der Erstdiagnose
- Datum der letzten Nachuntersuchung
- Datum des letzten Kontaktes
- Größe
- Gewicht
- Alkohol-/Tabakkonsum
- Ausgewählte Laborwerte bei Erstdiagnose (C-reaktives-Protein, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozytenzahl)
- Klinische TNM-Formel, Grading sowie UICC-Stadium (nach der 7. Edition)
- CT-morphologischer Durchmesser
- Histologischer Durchmesser
- CT-morphologische und histopathologische Knocheninfiltration
- Lokalisation sowie Bezeichnung der Seite

- Durchgeführte Therapie
- Diagnostik (Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Orthopantomogramm, Panendoskopie, Röntgen, Sonographie, Probenentnahme, Positronenemissionstomographie, Angiographie, Szintigraphie, Transösophageale Echokardiographie, Bronchoskopie, Endoskopie)
- Autopsie

Im Falle einer Operation:

- Datum der ersten Operation
- Bezeichnung der ersten Operation
- Sofortrekonstruktion
- Pathologische TNM-Formel, Resektionsstatus, UICC-Stadium
- Intraoperativer Close-margin-Status
- Notwendigkeit einer intraoperativen Nachresektion
- Extrakapsuläre Ausbreitung
- Nodalstatus (Größe, extrakapsuläre Ausbreitung)
- Neck-Dissection

Im Falle einer adjuvanten Therapie:

- Chemotherapie
- Datum Erstgabe der Chemotherapie
- Bestrahlung
- Datum erste Bestrahlung

Im Falle eines Rezidivs oder Zweitkarzinoms

- Rezidiv/Residualtumor
- Rezidivtyp (Lokalrezidiv, lokoregionäres Rezidiv)
- Datum der Erstdiagnose eines Rezidivs
- Lokalisation Rezidiv
- Zweitkarzinom
- Datum der Erstdiagnose eines Zweitkarzinoms
- Lokalisation des Zweitkarzinoms

2.2. Aufbereitung der Präparate

2.2.1. Herstellung der Tissue-Micro-Arrays

Die Auswahl und Aufarbeitung der histopathologischen Präparate erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

In einem ersten Schritt wurden die Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Präparate aus dem Archiv bereitgestellt und anhand der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte der Tumor markiert. Nach Übertragung der so ermittelten repräsentativen Tumoranteile auf das Ursprungsgewebe erfolgte eine Erstellung von Tissue-Micro-Arrays (TMA), bei der 1,2 mm durchmessende Stenzen in einen Paraffinblock übertragen wurden.

Auf diese Weise entstanden insgesamt 15 TMAs mit je 66 Stenzen, von denen jeweils 2 Leerschnitte von 2-4µm Dicke für die immunhistologischen Untersuchungen gegen p16^{INK4a} Mib/Ki-67 erstellt wurden.

2.2.2. Immunhistochemische Färbung für p16^{INK4a}

Zur immunhistochemischen Färbung diente das CINtec Histology V-Kit (Fa. Roche, Schweiz) – ein Antikörper gegen das Epitop E6H4. Der Färbungsprozess erfolgte vollautomatisiert mittels der Ultraview DAB-Prozedur des Färbesystems VENTANA BenchMark ULTRA (Fa. Roche, Schweiz).

2.2.3. Immunhistochemische Färbung für Mib/Ki-67

Nach Konditionierung der Zellen mittels ULTRA Cell Conditioning Solution (Fa. Ventana, USA; Fa. Roche, Schweiz) erfolgte die immunhistochemische Färbung mittels des MIB-1 Antikörpers (Fa. Agilent, USA) im Verhältnis 1:50. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen ein Fragment von 1002 bp der Ki-67 cDNA. Der Färbungsprozess erfolgte vollautomatisiert mittels der Ultraview DAB-Prozedur des Färbesystems VENTANA BenchMark ULTRA (Fa. Roche, Schweiz).

2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion der p16^{INK4a}-positiven Tumoren

Präparate mit einer p16-Positivität von mindestens 70% der Tumorzellen und mittlerer bis kräftiger zytoplasmatischer oder nukleärer Expression wurden auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Maxwell RSC DNA FFPE Kit (Fa. Promega, Deutschland) von Formalin-fixierten Präparaten. Zur Amplifizierung der DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Denaturierung für 5min bei 95°C, Amplifikation mit insgesamt 45 Zyklen, Elongation bei 72°C für 7min). Die anschließende HPV-Typisierung erfolgte mittels HPV 3.5 LCD-Array Kit (Fa. Chipron, Deutschland; Fa. TIB Molbiol, Deutschland) zum Nachweis von spezifischen Regionen des L1-Gens. Auf diese Weise können die HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 90, und 91 spezifiziert werden.

2.3. Auswertung

2.3.1. Auswertung der p16^{INK4a}-Färbung

Die Herstellung der TMAs sowie die immunhistochemische Färbung wurden bereits in den vorherigen Kapiteln erläutert.

Folgende Daten wurden für jeden einzelnen histologischen Schnitt ermittelt:

- J-Nummer (deskriptiver Wert mit eindeutiger Zuordnung eines Präparates)
- Gewebeart (Probe, Primärtumor, Lymphknoten, Rezidiv, Zweitkarzinom, Metastase)
- Relativer Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen
- Färbungsintensität
- Anfärbungsmuster

Auf die einzelnen Definitionen und Erhebungsmethoden wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Nicht klar zuzuordnende Präparate gingen nicht in die statistische Analyse ein.

Ermittlung des relativen Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen

Die Auswertung der p16^{INK4a} gefärbten Präparate erfolgte als manuelle Zählung eines Gesichtsfeldes bei 400facher Vergrößerung. In vier für das Präparat repräsentativen Regionen wurde jeweils der Anteil positiver Tumorzellen auf 100 Tumorzellen bestimmt. Tumorzellen galten hierbei als p16^{INK4a}-positiv, wenn sich eine kräftige Färbung von Nukleus und/oder Zytoplasma zeigte. Von den so ermittelten Werten erfolgte die Bestimmung des arithmetischen Mittels eines Präparates.

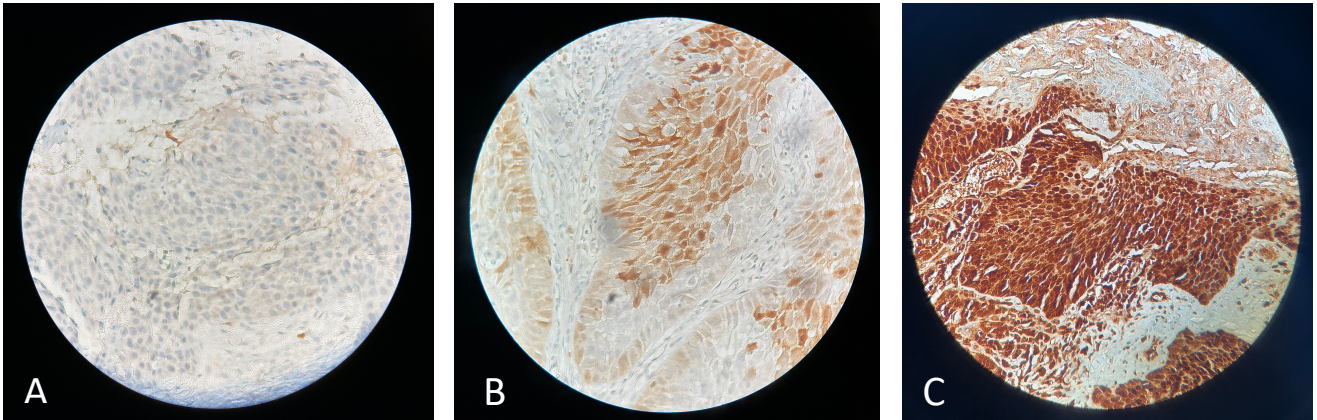
$$\text{relativer p16 Anteil (in \%)} = \bar{x} \left(100 \frac{\text{Anzahl positiver Tumorzellen 1}}{100 \text{ Tumorzellen}} + \dots + 100 \frac{\text{Anzahl positiver Tumorzellen 4}}{100 \text{ Tumorzellen}} \right)$$

Des Weiteren wurde die Färbungsintensität (schwach, schwach-mittel, mittel, mittel-stark, stark) und das Anfärbungsmuster (diffus, randbetont) eines Präparates bestimmt.

Definition der p16^{INK4a}-Positivität eines Präparates

Die p16^{INK4a}-Positivität eines Präparates ist gegeben, wenn sich über 70% der gezählten Tumorzellen positiv in der p16^{INK4a}-Färbung darstellten und die Färbung eine mindestens mittlere Intensität zeigte.

Fotografie 1: Immunhistochemische Präparate p16^{INK4a}-Färbung



Dargestellt sind Ausschnitte von drei Präparaten (A-C) verschiedener Patient:innen (immunhistochemische Färbung für p16^{INK4a}, 400fache Vergrößerung, Eigenfotografie):

A: Zu erkennen ist eine Ansammlung von Tumorzellen, die sich in der p16^{INK4a}-Färbung nicht darstellen lassen.

B: Es imponieren sowohl p16^{INK4a}-positive als auch -negative Tumorzellen. Der Anteil p16^{INK4a}-positiver Zellen liegt unter 50% bei schwacher bis mittlerer Färbungsintensität.

C: Im gezeigten Ausschnitt sind ausschließlich stark angefärbte Tumorzellen mit sowohl nukleärem als auch cytoplasmatischem Anfärbungsmuster zu erkennen.

Definition der p16^{INK4a}-Positivität eines Tumors

Falls lediglich ein Präparat für einen Tumor gefärbt wurde, gilt für die Positivität des Tumors die gleiche Definition wie für die Positivität des Präparates.

Im Falle mehrerer gefärbter Präparate erfolgte die Bestimmung des arithmetischen Mittels des Anteils p16^{INK4a}-positiver Zellen und der Färbungsintensität. Die p16^{INK4a}-Positivität eines Tumors ist dann gegeben, wenn sich im Durchschnitt über 70% der gezählten Tumorzellen positiv in der p16^{INK4a}-Färbung darstellten und die Färbung durchschnittlich eine mindestens mittlere Intensität zeigte. Weitere Untersuchungen erfolgten nach Prigge et al. bei Grenzwerten eines relativen Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen von 50% bzw. 25% und mindestens mittlerer Färbungsintensität [176].

2.3.2. Auswertung der Mib-Färbung

Die Herstellung der TMAs sowie die immunhistochemische Färbung wurden bereits in den vorherigen Kapiteln besprochen.

Folgende Daten wurden für jeden einzelnen histologischen Schnitt ermittelt:

- J-Nummer
- Gewebeart (Probe, Primärtumor, Lymphknoten, Rezidiv, Zweitkarzinom, Metastase)
- Relativer Anteil Mib-positiver Tumorzellen
- Färbungsintensität
- Anfärbungsmuster

Die Auswertung der Mib/Ki-67 gefärbten Präparate erfolgte als manuelle Zählung eines Gesichtsfeldes bei 400facher Vergrößerung. In vier für das Präparat repräsentativen Regionen wurde jeweils der Anteil positiver Tumorzellen auf 100 Tumorzellen bestimmt. Zellen galten hierbei als Mib/Ki-67-positiv, wenn sich eine deutliche Anfärbung des Nukleus zeigte. Die Bestimmung der Mib-Positivität des Präparates ergibt sich aus dem Durchschnitt der vier ermittelten Raten an Mib-positiven Tumorzellen.

$$\text{relativer Mib Anteil (in \%)} = \bar{x} \left(100 \frac{\text{Anzahl positiver Tumorzellen 1}}{100 \text{ Tumorzellen}} + \dots + 100 \frac{\text{Anzahl positiver Tumorzellen 4}}{100 \text{ Tumorzellen}} \right)$$

Definition der Mib-Positivität eines Tumors

Falls lediglich ein Präparat für einen Tumor gefärbt wurde, gilt für die Positivität des Tumors die gleiche Definition wie für die Positivität des Präparates.

Im Falle mehrerer gefärbter Präparate erfolgte die Bestimmung des arithmetischen Mittels des Anteils Mib-positiver Zellen. Aufgrund inhomogener Grenzwerte einer Mib-Positivität wurden hier Cut-off Werte gewählt. Orientierend an dem festgelegten Grenzwert zur Subgruppenanalyse von Xie et al. [64] erfolgte eine Untersuchung der Tumoren bei einem Grenzwert von 21% des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen. Des Weiteren wurde ein höherer Cut-off Wert in Anlehnung an Lange et al. bei 37% gewählt [220].

2.4. Statistische Auswertung

Die initiale Datenerhebung erfolgte mittels Microsoft® Excel 2016 für OS X (Version 15.11) und Microsoft® Excel 2019 für macOS (Version 16.41) in TMA-sortierten Einzeltabellen. Nach Zusammenführung dieser einzelnen in eine globale Tabelle wurde diese in IBM SPSS® Statistics (Version 28.0.1.0), 64-Bit-Version für macOS transformiert und die statistischen Auswertungen durchgeführt.

Der Mittelwertvergleich normalverteilter Zufallsgrößen erfolgte unter Verwendung des t-Tests für unabhängige Variablen. Im Fall nicht normalverteilter Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Zur Feststellung einer Korrelation zwischen nominal- oder ordinalskalierten Variablen und hohen Fallzahlen erfolgte die Durchführung eines Chi-Quadrat-Tests mit Bestimmung der erwarteten Anzahl. Bei geringen Fallzahlen oder einer erwarteten Anzahl unter 5 wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Bezüglich der Bestimmung der symmetrischen Massen und der daraus folgenden Stärke eines Zusammenhanges erfolgte die Durchführung des Cramer-V-Testes (Cut-off Cramer-V=0,3).

Die univariaten Überlebensanalysen wurden unter Verwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens erstellt. Zum inferenzstatistischen Vergleich diente der Log-Rank-Test.

Bei unabhängigen, varianzhomogenen Gruppen erfolgte die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA). Die anschließenden paarweisen Vergleiche wurden mittels Bonferroni-Testungen durchgeführt.

Unabhängige Stichproben, die nicht die Voraussetzungen einer ANOVA erfüllten, gingen in eine Kruskal-Wallis-Analyse ein. Die weitere Diskriminierung erfolgte mittels eines Bonferroni korrigierten post-hoc Tests.

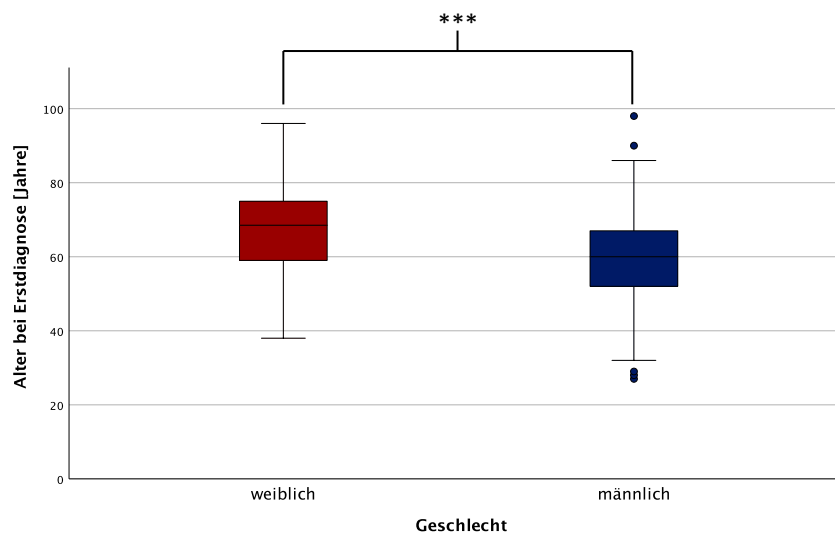
Das lokale Signifikanzniveau ist im Folgenden bei $\alpha=0,05$ festgelegt. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Arbeit wurde kein globales Signifikanzniveau definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Patient:innenkollektiv

Es konnten 339 Patient:innen eingeschlossen werden von denen 120 (35,4%) weiblichen und 219 (64,6%) männlichen Geschlechts waren. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose betrug 62,52 Jahre (Median: 63 Jahre) mit einem Maximum bei 98 Jahren und einem Minimum bei 27 Jahren. Die Patienten sind im Durchschnitt mit 59,97 Jahren (Standardabweichung 11,3 Jahre) höchstsignifikant jünger als die Patientinnen, die durchschnittlich ein Alter von 67,37 Jahren (Standardabweichung 13,1 Jahre) bei Erstdiagnose besaßen ($p < 0,001$).

Diagramm 1: Boxplot des durchschnittlichen Alters bei Erstdiagnose gruppiert nach dem biologischen Geschlecht

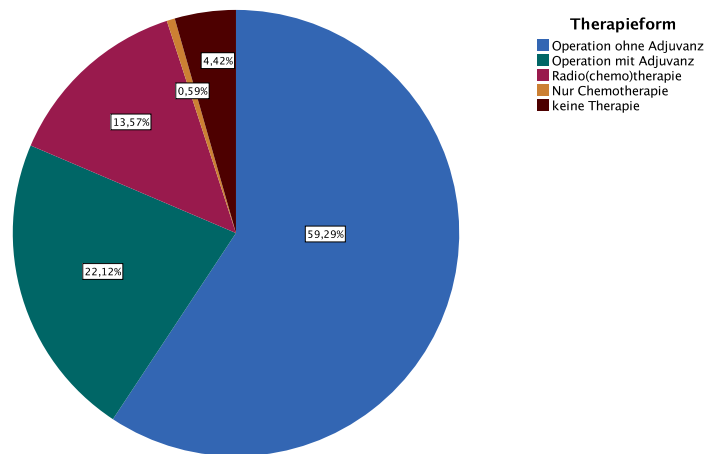


Anmerkung Diagramm 1: Dargestellt ist das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unterteilt nach dem Geschlecht. Es zeigt sich ein höchstsignifikanter Unterschied zwischen dem durchschnittlichen Alter bei Erstdiagnose der Männer und dem der Frauen ($p < 0,001$).

Die am häufigsten durchgeführte Therapie stellt die Tumoroperation ohne Adjuvanz dar ($n=201$, 59,3%), gefolgt von der Tumoroperation mit anschließender Chemo-, Radio- oder kombinierter

Radiochemotherapie (n=75, 22,1%). Bei 48 (14,2%) Patient:innen erfolgte die primäre Radiotherapie bzw. Chemotherapie. Insgesamt 15 (4,4%) Patient:innen wurden keiner Therapie zugeführt.

Diagramm 2: Kreisdiagramm mit Darstellung der Verteilung der Therapieformen im Gesamtkollektiv



Anmerkung Diagramm 2: Dargestellt ist der relative Anteil der verschiedenen Therapieformen. Insgesamt 15 Patient:innen wurden keiner Therapie zugeführt.

3.2. Gewebearten der Präparate

In die Auswertung gingen 422 histopathologische Präparate ein, die im Anschluss sowohl für p16 als auch für Mib gefärbt wurden. Am häufigsten handelte es sich hierbei um Biopsate, die aus malignomsuspekten Raumforderungen entnommen wurden (53,8%), gefolgt von histopathologischen Aufarbeitungen der Tumorresektate (46,2%).

Im Folgenden wird die deskriptive Statistik der TNM-Stadien von den eingeschlossenen Tumoren dargestellt. Im Fall einer Operation wurden, neben den klinischen, zusätzlich die pathologischen Stadien aufgeführt.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten der klinischen und pathologischen T-Stadien

	Klinisches T-Stadium		Pathologisches T-Stadium	
	AH	RH	AH	RH
T1	35	11,5%	113	40,6%
T2	54	17,7%	108	38,8%
T3	2	0,7%	30	10,8%
T4	81	26,6%	23	8,3%
Tx	133	43,6%	4	1,4%
Gesamt	305	100%	278	100%

Legende Tabelle 6: AH: absolute Häufigkeit, RH: relative Häufigkeit

Tabelle 7: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten der klinischen und pathologischen N-Stadien

	Klinisches N-Stadium		Pathologisches N-Stadium	
	AH	RH	AH	RH
N0	107	35,1%	174	67,7%
N1	25	8,2%	38	14,8%
N2	133	43,6%	45	17,5%
Nx	40	13,1%	-	-
Gesamt	305	100%	257	100%

Legende Tabelle 7: AH: absolute Häufigkeit, RH: relative Häufigkeit

Tabelle 8: Auflistung der absoluten und relativen Häufigkeit der klinischen M-Stadien

	AH	RH
M0	269	88,2%
M1	15	4,9%
Mx	21	6,9%
Gesamt	305	100%

Legende Tabelle 8: AH: absolute Häufigkeit, RH: relative Häufigkeit

3.3. Risikofaktoren

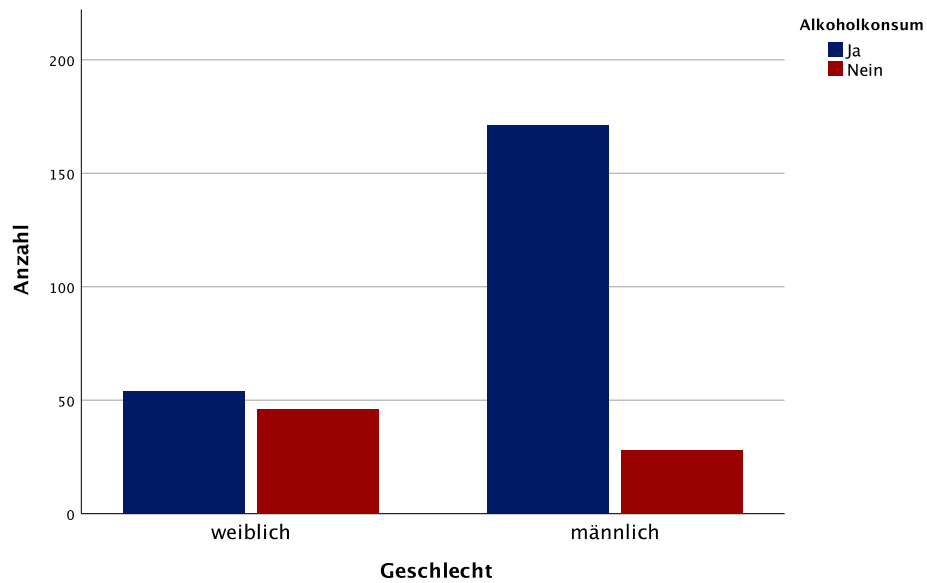
Von 299 Patient:innen liegen Daten bezüglich des regelmäßigen Alkoholkonsums vor. Hierbei gaben 225 (75,3%) Personen an, regelmäßig Alkohol zu nutzen, während 74 (24,7%) dies verneinten. Bei männlichen Patienten beläuft sich der relative Alkoholkonsum auf ca. 85,9%, während dieser im Kollektiv der Frauen lediglich bei 54,0% liegt.

Die Angabe zum regelmäßigen Alkoholkonsum sowie das Geschlecht zeigen einen höchst signifikanten statistischen Zusammenhang (Chi-Quadrat=36,4, $p < 0,001$). Diese Korrelation hat eine mittlere Effektstärke (Cramer-V=0,349, $p < 0,001$).

In die Analyse des Tabakkonsums gingen 300 Fälle ein. Insgesamt gaben 223 (74,3%) der befragten Personen an, regelmäßig Tabak zu konsumieren, während 77 (25,7%) dies verneinten. In der Gruppe der Männer lag der Anteil an Tabakkonsumenten bei 167 von 200 (83,5%). Bei den Frauen waren es 56 von 100 (56%).

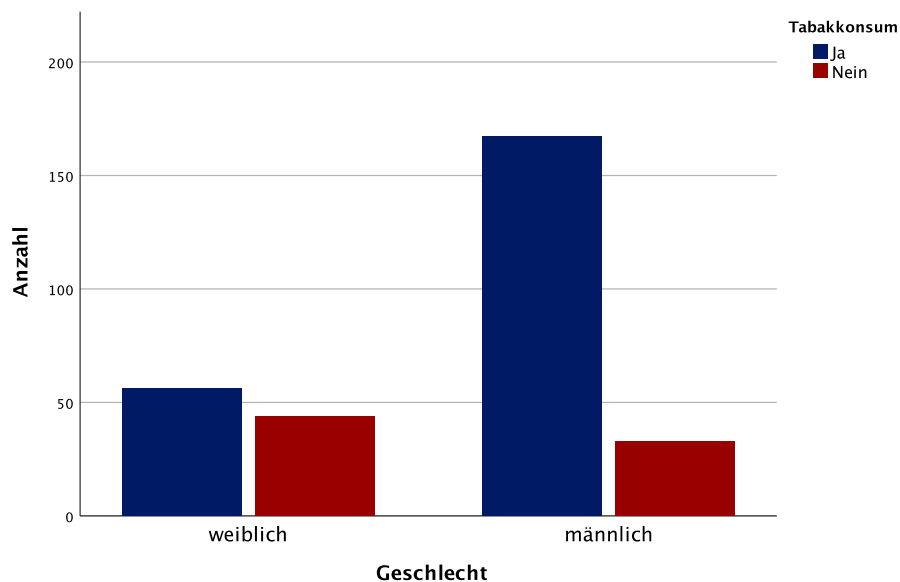
Die gefundenen Unterschiede zeigten eine statistische Korrelation (Chi-Quadrat=26,4; $p < 0,001$). Hierbei handelt es sich am ehesten um einen schwachen statistischen Zusammenhang (Cramer-V=0,297; $p < 0,001$).

Diagramm 3: Balkendiagramm des Alkoholkonsums in absoluter Häufigkeit unterteilt nach dem biologischen Geschlecht



Anmerkung Diagramm 3: Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten des Alkoholkonsums unterteilt nach dem biologischen Geschlecht. Im Kollektiv der Männer findet sich sowohl ein höherer relativer als auch absoluter Alkoholkonsum als bei den Frauen ($p < 0,001$).

Diagramm 4: Balkendiagramm des Tabakkonsums in absoluter Häufigkeit unterteilt nach dem biologischen Geschlecht

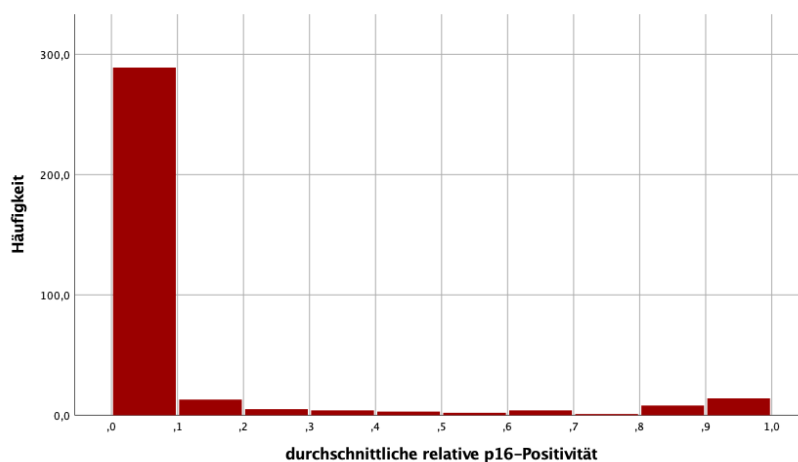


Anmerkung Diagramm 4: Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten des Tabakkonsums unterteilt nach dem biologischen Geschlecht. Im Kollektiv der Männer findet sich sowohl ein höherer relativer als auch absoluter Tabakkonsum als bei den Frauen ($p < 0,001$).

3.4. Immunhistochemie für p16^{INK4a}

Es liegen Daten zu 339 Tumoren vor. Der Mittelwert des durchschnittlichen relativen Anteils p16^{INK4a} positiven Tumorzellen beläuft sich auf ca. 9,4% (Standardabweichung 0,24) bei einem Minimum von 0% und Maximum von 98,5%. Modus und Median belaufen sich auf ca. 0%, woraus eine rechtsschiefe statistische Verteilung folgt. Insgesamt 23 der untersuchten Tumoren zeigten eine relative Positivität von über 70%, was einem Anteil von ca. 6,8% der Gesamtheit entspricht. Demgegenüber liegt die durchschnittliche relative p16-Positivität von 285 Tumoren (84,1%) zwischen 0-10%.

Diagramm 5: Histogramm der kategorisierten Verteilung der relativen p16^{INK4A}-Positivität der Tumoren

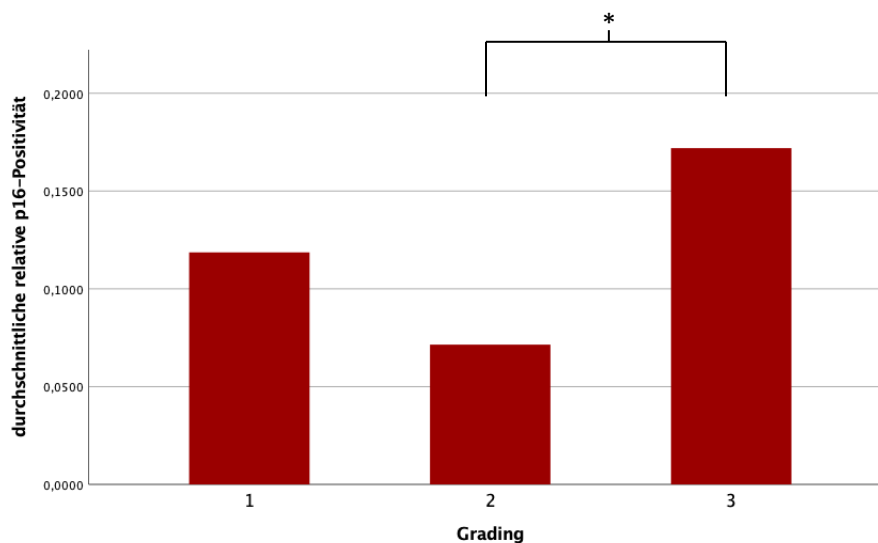


Anmerkung Diagramm 5: Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der kategorisierten relativen p16^{INK4a}-Positivität. Der beachtliche Großteil an untersuchten Tumoren zeigt einen relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen von 0-10% bei insgesamt rechtsschiefer Verteilung.

Bei männlichen Patienten fand sich eine durchschnittliche relative p16^{INK4a}-Positivität der Tumoren von ca. 10,7%, bei Frauen von ca. 7,0%. Dieser Unterschied zeigt mittels Mann-Whitney-U-Test keine statistische Signifikanz ($p=0,872$).

Ein durchgeführter Kruskal-Wallis-Test zeigte eine Korrelation zwischen dem Grading und der mittleren p16^{INK4a}-Positivität von Tumoren (Kruskal-Wallis- $H=9,937$; $p=0,007$). Der anschließend durchgeführte Bonferroni korrigierte post-hoc Test lieferte signifikante Unterschiede zwischen den G2- und G3-Tumoren ($p=0,043$).

Diagramm 6: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen p16^{INK4A}-Positivität nach dem Grading



Anmerkung Diagramm 6: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen p16^{INK4A}-Positivität unterteilt nach dem Grading (Differenzierungsgrad G1, G2, G3). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Rate p16-positiver Tumorzellen zwischen G2 und G3 differenzierten Tumoren ($p=0,4$).

3.5. Tumoren mit einer p16^{INK4a}-Positivität

Weitere statistische Analysen wurden für das Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven Tumoren durchgeführt. Als p16^{INK4a} positiv gilt hierbei ein Tumor, der folgende Bedingungen erfüllt:

- Durchschnittlicher relativer Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen >70%
- Durchschnittlich mindestens mittlere Färbungsintensität

Tumoren, die mindestens eine der vorgenannten Bedingungen nicht erfüllen, werden als p16^{INK4a}-negativ definiert.

Insgesamt erfüllten 23 von 339 Tumoren (6,8%) die Definition einer p16^{INK4a}-Positivität. Der durchschnittliche relative Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen liegt in diesem Kollektiv bei ca. 90,4% (SD: 6,3%; Median: ca. 91,0%) bei einer Spannweite von 27% (Minimum: 71,5%; Maximum: 98,5%).

Demgegenüber stehen 316 p16^{INK4a}-negative Tumoren (93,2%) mit einem durchschnittlichen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen von ca. 3,5% (SD: ca. 10,8%, Median: ca. 0%). In diesem Kollektiv findet sich eine Spannweite von 65% (Minimum: 0%, Maximum: 65%).

Tabelle 9: Vergleich klinischer Parameter zwischen p16^{INK4a}-positiven und p16^{INK4a}-negativen Tumoren

	p16+	p16-	p-Wert
Gesamt	23 (6,8%)	316 (93,2%)	
Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	60,8 Jahre	62,7 Jahre	0,50
Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Operation	59,9 Jahre	61,7 Jahre	0,55
Alter kategorisiert (n=339)			
≤49 Jahre	1 (0,3%)	45 (13,3%)	
50-59 Jahre	12 (3,5%)	82 (24,2%)	
60-69 Jahre	6 (1,8%)	104 (30,7%)	0,10
70-79 Jahre	3 (0,9%)	62 (18,3%)	
≥80 Jahre	1 (0,3%)	23 (6,8%)	
Geschlecht (n=339)			
Männlich	18 (5,3%)	201 (59,3%)	
Weiblich	5 (1,5%)	115 (33,9%)	0,18
Body-Mass-Index (n=327)			
Untergewichtig	1 (0,3%)	24 (7,3%)	
Normalgewicht	14 (4,3%)	155 (47,4%)	
Übergewichtig	2 (0,6%)	86 (26,3%)	0,24
Adipös	4 (1,2%)	41 (12,5%)	
Alkoholkonsum (n= 299)			
Ja	18 (6,0%)	205 (69,2%)	
Nein	2 (0,7%)	74 (24,2%)	0,18
Tabakkonsum (n=300)			
Ja	18 (6,0%)	236 (78,7%)	
Nein	3 (1,0%)	78 (26,0%)	0,42
UICC-Stadium (n=266)			
Stadium I	5 (1,9%)	80 (30,1%)	
Stadium II	6 (2,3%)	66 (24,8%)	
Stadium III	2 (0,8%)	47 (17,7%)	0,82
Stadium IV	4 (1,5%)	56 (21,1%)	
Therapieform (n=339)			
Operation ohne Adjuvanz	13 (3,8%)	188 (55,5%)	
Operation mit Adjuvanz	4 (1,2%)	71 (20,9%)	
Primäre Radiochemotherapie	5 (1,5%)	41 (12,1%)	0,80
Chemotherapie	0	2 (0,6%)	
Keine Therapie	1 (0,3%)	14 (4,1%)	
Knocheninfiltration (n=278)			
Ja	6 (2,2%)	54 (19,4%)	
Nein	11 (4,0%)	207 (74,5%)	0,13
Close margin <5mm (n=194)			
Ja	5 (5,6%)	90 (46,4%)	
Nein	6 (3,1%)	93 (48,0%)	0,53
ECE (n=256)			
Ja	2 (0,8%)	34 (13,3%)	
Nein	15 (5,9%)	205 (80,1%)	0,56

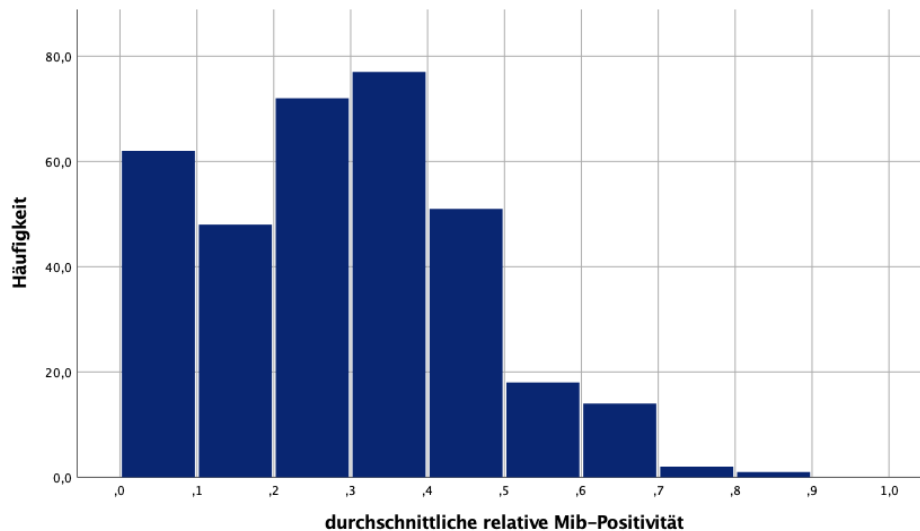
Legende Tabelle 9: p16+: p16^{INK4a}-positiver Tumor (relativer Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen >70% und mittlere Färbungsintensität); p16-: p16^{INK4a}-negativer Tumor (erfüllt Bedingung der p16^{INK4a}-Positivität nicht); n: Anzahl gesamt, UICC: Union for International Cancer Control; ECE = *engl.* extracapsular spreading, *dt.* extrakapsuläre Ausbreitung

Anmerkung Tabelle 9: Dargestellt ist die vergleichende Analyse klinischer Parameter zwischen p16^{INK4a}-positiven und -negativen Tumoren sowie die entsprechende Signifikanz. In keiner der untersuchten Variablen zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

3.6. Immunhistochemie für Mib/Ki-67

Insgesamt gingen 339 untersuchte Tumoren in die Auswertung ein, wobei sich der Durchschnitt der relativen Mib-Positivität auf ca. 28,4% (SD: 17,1%; Median: 28,4%) beläuft. Das untere Quartil liegt bei 14,9%, das obere bei 39,9%.

Diagramm 7: Histogramm der kategorisierten Verteilung der relativen Mib-Positivität der Tumoren

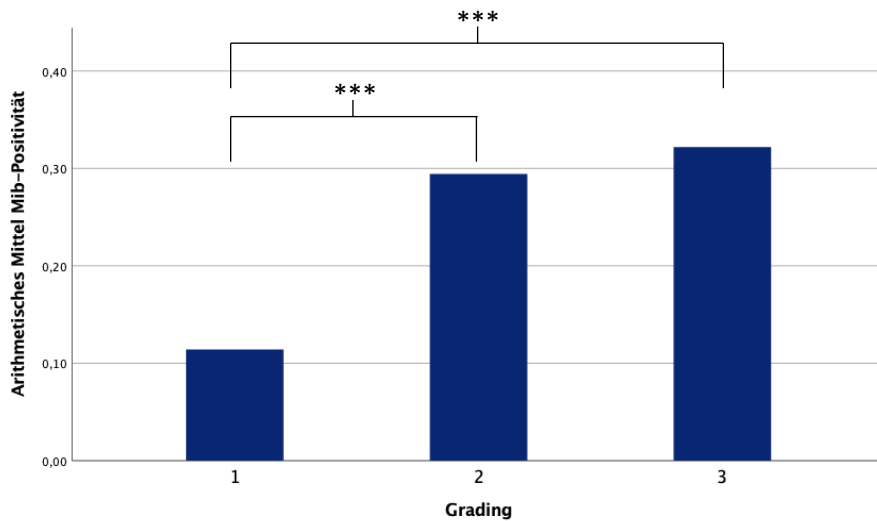


Anmerkung Diagramm 7: Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der kategorisierten relativen Mib-Positivität der untersuchten Tumoren.

Die untersuchten Tumoren des Differenzierungsgrades G1 zeigten eine durchschnittliche Mib-Positivität von 11,8%, was höchst signifikant niedriger ist als bei G2- (29,1%, $p < 0,001$) oder G3-differenzierten Tumoren (32,7, $p < 0,001$). Vergleiche des arithmetischen Mittels der durchschnittlichen Mib-Positivität von G2- oder G3-Tumoren erbrachten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,645$).

Regelmäßiger Alkohol- und/oder Tabakkonsum zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Rate an Mib-positiven Tumorzellen ($p = 0,86$; $p = 0,82$).

Diagramm 8: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen Mib-Positivität unterteilt nach dem Grading

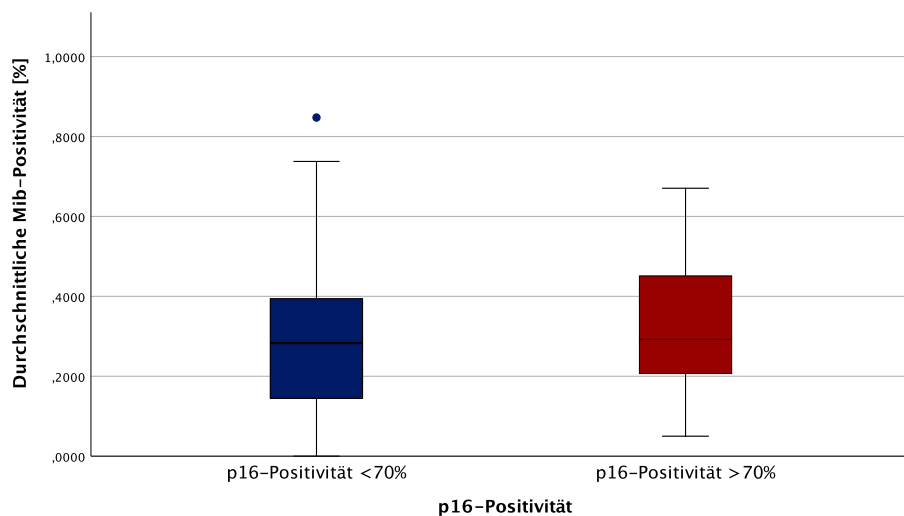


Anmerkung Diagramm 8: Balkendiagramm zur Verteilung der relativen Mib-Positivität unterteilt nach dem Grading (Differenzierungsgrad G1, G2, G3). Es zeigen sich signifikante Unterschiede der durchschnittlichen Mib-Expression zwischen Tumoren des Differenzierungsgrades G1 und G2 sowie G1 und G3 ($p < 0,001$).

3.7. Korrelation der Immunhistochemie für Mib und p16^{INK4a}

Es wurden die durchschnittlichen Mib-positiven Tumorzellen zwischen p16^{INK4a}-positiven (p16 Rate >70%, mindestens mittlere Färbungsintensität) und -negativen Tumoren (mindestens eine Bedingung der Positivität nicht erfüllt) analysiert. Im Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ($n=23$, 7,0%) lag die durchschnittliche Mib-Positivität bei ca. 33,3% (SD: 17,3%; Median: 29,2%). Demgegenüber findet sich bei den p16^{INK4a}-negativen Tumoren ($n=316$) eine durchschnittliche Mib-Positivität von ca. 27,9% (SD 17,1%; Median: 28,3%). Es zeigte sich keine statistische Signifikanz ($p=0,15$).

Diagramm 9: Boxplot der durchschnittlichen relativen Mib-Positivität gruppiert nach der p16^{INK4a}-Positivität



Anmerkung Diagramm 9: Dargestellt ist der durchschnittliche relative Anteil Mib-positiver Tumorzellen unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität ($n_{\text{gesamt}}=339$). Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,15$).

3.8. Nachweis von HPV-DNA

Die p16-positiven Tumoren wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion auf den Nachweis von HPV-DNA untersucht. Von den so ermittelten 23 Tumorpräparaten standen 19 für eine weiterführende Untersuchung zur Verfügung. In vier Fällen zeigte sich keine Amplifikation. In sechs der verbliebenen 15 Tumoren (40%) gelang der Nachweis von HPV DNA (p16+/HPV+). Hierbei handelte es sich ausschließlich um HPV-Typ 16. Neun Tumoren waren negativ für HPV (60%; p16+/HPV-). Für die p16^{INK4a}-Färbung gemäß o.g. Definition ergibt sich somit ein positiv prädiktiver Wert von 0,4 im Nachweis einer HPV-Infektion.

Bezüglich der Proliferationsraten zeigten HPV-positive Primären einen Durchschnitt von ca. 40%, während dieser in HPV-negativen Tumoren bei ca. 35% lag. Dieser Unterschied zeigte keine statistische Signifikanz.

Einen Überblick zu Korrelationen mit klinischen Parametern gibt die Tabelle 10. Der Großteil an untersuchten Variablen (Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht, Body-Mass-Index, Alkoholkonsum, Tabakkonsum, Differenzierungsgrad, Therapieform, Knocheninfiltration, close-margin Resektion, Extrakapsuläre Ausbreitung) erbrachte keine signifikanten Korrelationen.

Bezogen auf die histopathologische Knocheninfiltration zeigten von 11 eingegangenen Fällen alle p16+/HPV+ Tumoren eine Knocheninfiltration, während dies bei den p16+/HPV- Tumoren lediglich bei einem von sieben der Fall war (14,3%). Der gefundene Unterschied zeigte eine statistische Korrelation ($p=0,015$). Hierbei handelt es sich um einen starken statistischen Zusammenhang (Cramer-V=0,828; $p=0,006$).

Auch im kategorisierten Alter konnte zwischen den p16+/HPV+ und den p16+/HPV- Tumoren eine Korrelation ($p=0,036$) mit einem a.e. starken statistischen Zusammenhang gezeigt werden (Cramer-V=0,667; $p=0,036$).

Tabelle 10: Vergleich klinischer Parameter zwischen dem Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven und HPV-positiven Tumoren (p16+/HPV+) sowie dem Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven und HPV-negativen Tumoren (p16+/HPV-)

	p16+/HPV+	p16+/HPV-	p-Wert
Gesamt	6 (40%)	9 (60%)	
Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	59,7 Jahre	62,9 Jahre	0,48
Durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Operation	56,8 Jahre	64,7 Jahre	0,11
Alter kategorisiert (n=15)			
≤49 Jahre	0	0	
50-59 Jahre	3 (20%)	6 (40%)	
60-69 Jahre	3 (20%)	0	0,036*
70-79 Jahre	0	3 (20%)	
≥80 Jahre	0	0	
Geschlecht (n=15)			
Männlich	6 (40%)	6 (40%)	
Weiblich	0	3 (20%)	0,23
Body-Mass-Index (n=13)			
Untergewichtig	1 (7,7%)	0	
Normalgewicht	2 (15,4%)	7 (53,8%)	
Übergewichtig	2 (15,4%)	1 (7,7%)	0,16
Adipös	0	0	
Alkoholkonsum (n=14)			
Ja	6 (42,9%)	7 (50%)	
Nein	0	1 (7,1%)	1,0
Tabakkonsum (n=15)			
Ja	6 (40%)	7 (46,7%)	
Nein	0	2 (1,3%)	0,49
Differenzierungsgrad (Grading, n=14)			
G1	0	0	
G2	3 (21,4%)	8 (57,1%)	
G3	2 (14,3%)	1 (7,1%)	0,43
Therapieform (n=15)			
Operation ohne Adjuvanz	2 (13,3%)	7 (46,7%)	
Operation mit Adjuvanz	2 (13,3%)	0	
Primäre Radiochemotherapie	2 (13,3%)	2 (13,3%)	0,11
Chemotherapie	0	0	
Knocheninfiltration im histopathologischen Präparat (n=11)			
Ja	4 (36,4%)	1 (9,1%)	
Nein	0	6 (54,5%)	0,015*
Close margin (<5mm) Resektion (n=7)			
Ja	2 (28,6%)	1 (14,3%)	
Nein	0	4 (57,1%)	0,14
Extrakapsuläre Ausbreitung (n=11)			
Ja	1 (9,1%)	0	
Nein	3 (27,3%)	7 (63,6%)	0,36

Legende Tabelle 10: p16+/HPV+: p16^{INK4a}- und HPV-positiver Tumor (relativer Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen >70% und mittlere Färbungsintensität), p16+/HPV-: p16^{INK4a}-positiver Tumor ohne HPV-Nachweis, „n“: Anzahl gesamt, „*“: signifikantes Ergebnis

Anmerkung Tabelle 10: Dargestellt ist die vergleichende Analyse klinischer Parameter zwischen p16+/HPV+ und p16+/HPV- Tumoren sowie die entsprechende Signifikanz. Es zeigen sich signifikante Korrelationen im kategorisierten Alter sowie der histopathologischen Knocheninfiltration.

3.9. Korrelation von Mib- und HPV-Status

Wie bereits erläutert konnte der Nachweis von HPV-DNA in 6 der 15 p16-positiven Tumoren gelingen. Es erfolgte der Vergleich der durchschnittlichen Mib-Positivität zwischen den p16+/HPV+ und den p16+/HPV- Tumoren. Im Kollektiv der HPV-positiven Tumoren (n=6) lag die durchschnittliche Mib-Positivität bei ca. 40,3% (SD: 19,2%; Median: 39,2%). Demgegenüber findet sich bei den HPV-negativen Tumoren (n=9) eine durchschnittliche Mib-Positivität von ca. 35,4% (SD 16,3%; Median: 34,8%). Es zeigte sich keine statistische Signifikanz ($p=0,5$).

p16+/HPV+ Tumoren zeigen mit 33,4% einen höheren Interquartilabstand als die p16+/HPV- Tumoren mit 22,9%.

Tabelle 11: Darstellung ausgewählter klinischer Charakteristika der auf den HPV-Status untersuchten p16^{INK4a}-positiven Tumoren sowie der korrespondierenden Mib-Positivität

No.	Geschlecht	Alter	Tabak	Alkohol	OP ohne R(C)T	OP mit R(C)T	R(C)T	Mib
p16+/HPV-								
1	Weiblich	79			+			67,1%
2	Männlich	58	+	+			+	50,0%
3	Männlich	55	+	+			+	39,0%
4	Männlich	72	+	+	+			38,8%
5	Weiblich	76	+	k.a.	+			34,8%
6	Männlich	58	+	+	+			31,5%
7	Männlich	55	+	+	+			26,5%
8	Weiblich	57	+	+	+			16,8%
9	Männlich	56	+	+	+			14,3%
p16+/HPV+								
10	Männlich	63	+	+			+	66,1%
11	Männlich	68	+	+			+	54,4%
12	Männlich	59	+	+	+			49,3%
13	Männlich	55	+	+		+		29,2%
14	Männlich	61	+	+		+		26,6%
15	Männlich	52	+	+	+			16,0%

Legende Tabelle 11: OP ohne R(C)T = Operation ohne Adjuvanz, OP mit R(C)T = Operation mit Adjuvanz, R(C)T = Radio(chemo)therapie, p16+/HPV- = p16^{INK4a}-positiv und HPV-DNA-negativ, p16+/HPV+ = p16^{INK4a}-positiv und HPV-DNA-positiv

Anmerkung Tabelle 11: Dargestellt sind klinische Charakteristika der auf das HPV untersuchten p16^{INK4a}-positiven Tumoren.

3.10. Überlebensanalysen

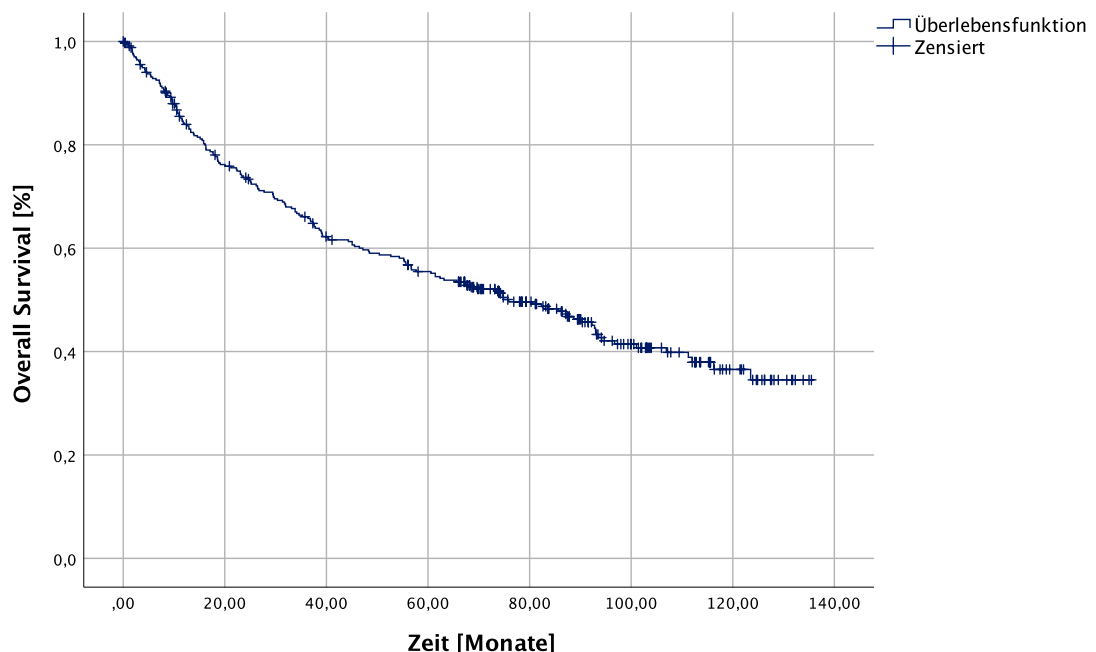
Die Beobachtungszeit erstreckte sich vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zum Todeszeitpunkt, dem Zeitpunkt des letzten Kontakts bzw. bis zum Ende der Beobachtungsperiode. Im Durchschnitt betrug diese ca. 45,9 Monate (Standardabweichung: ca. 37,1 Monate) bei einem Maximum von ca. 132,6 Monaten.

Das Overall Survival (Überlebenszeit) wurde definiert als Zeitspanne zwischen dem Datum der Erstdiagnose (falls nicht vorhanden dem Datum des Therapiebeginns) bis zum Todesdatum bzw. zensiert ab dem Datum des letzten Kontaktes.

Das rezidivfreie Überleben beschreibt im Folgenden die Zeitspanne vom Therapieende bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum Todeszeitpunkt. Im Gegensatz hierzu wurden Tumoren die innerhalb der ersten sechs Monate nach einer Operation mit R1/Rx-Status bzw. primären Radiochemotherapie erneut auftraten als Residualtumoren gewertet und gingen somit nicht in das rezidivfreie Überleben ein. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden Patient:innen ohne Therapie, mit einer palliativen Therapie oder einer singulären Induktionstherapie.

Im Gesamtkollektiv ergibt sich im Kaplan-Meier-Verfahren eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 76,1 Monaten (CI: 70,1-82,0 Monate) bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 56% sowie eine 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 38%.

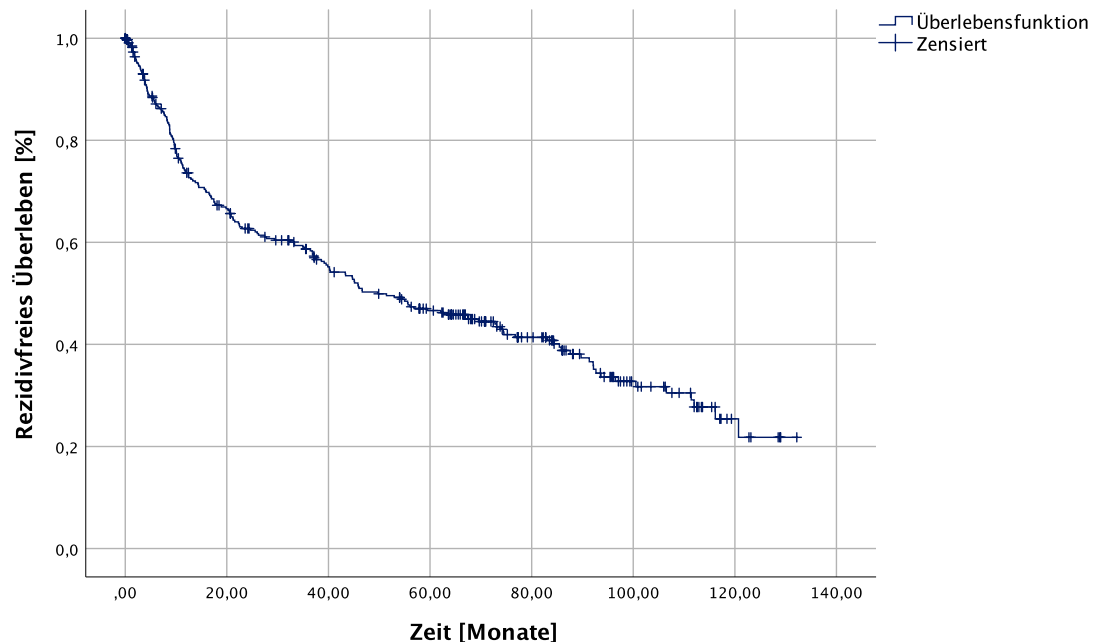
Diagramm 10: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 10: Dargestellt ist das Overall Survival des Gesamtkollektivs. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 56%.

Innerhalb des Beobachtungszeitraums kam es bei 194 der 339 Patient:innen zum Auftreten eines Ereignisses (ca. 57,2%). Dies ergibt nach oben genannter Definition ein rezidivfreies Überleben von durchschnittlich ca. 63 Monaten (CI: 57,1-68,0 Monate; Median: ca. 49,8 Monate).

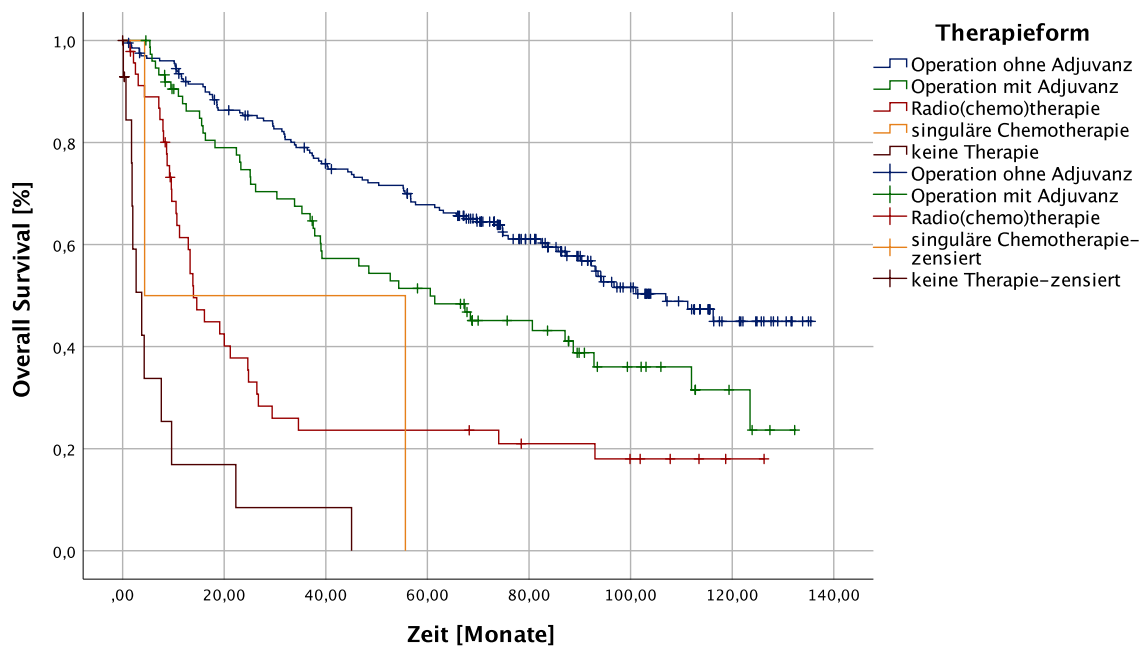
Diagramm 11: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 11: Dargestellt ist das rezidivfreie Überleben des Gesamtkollektivs.

In dem untersuchten Gesamtkollektiv zeigte sich eine Überlegenheit der Operation ohne Adjuvanz mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von ca. 90,5 Monaten (CI: 83,3-97,6, Median: ca. 106,9 Monate). Die durchschnittliche Überlebenszeit der Operation mit Adjuvanz betrug ca. 70,3 Monaten (CI: 58,6-81,9, Median: 60,6 Monate), die der Radio(chemo)therapie ca. 37,9 Monate (CI: 24,4-51,5, Median: ca. 13,9 Monate), die der singulären Chemotherapie ca. 30,0 Monate (CI: 0-80,3, Median: nicht ermittelbar). Im Gesamtvergleich über alle Therapieformen zeigten sich die Unterschiede mittels Log Rank Test als hochsignifikant ($p < 0,001$).

Diagramm 12: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs unterteilt nach den verschiedenen Therapieformen bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



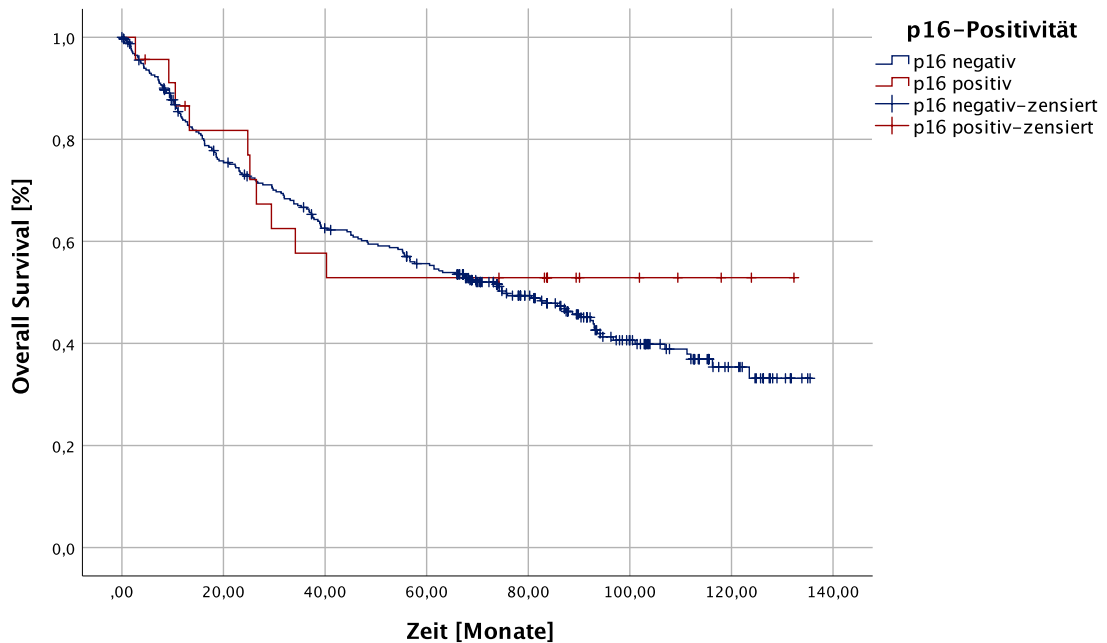
Anmerkung Diagramm 12: Dargestellt sind die Überlebensfunktionen der verschiedenen Therapieformen bezogen auf das Overall Survival. Es zeigen sich hochsignifikante Unterschiede im Gesamtvergleich ($p < 0,001$).

3.10.1. Überleben in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Positivität

Die Überlebensanalysen wurden für verschiedene Untergruppen der relativen Anteile p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen erstellt. Im Kaplan-Meier-Verfahren wurden so Analysen für einen Cut-off-Wert von 25%, 50% und 70% durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,51$; $p=0,78$; $p=0,55$), wengleich Tendenzen mit höheren Überlebensraten im p16^{INK4a}-positiven Kollektiv zu beobachten sind. Beispielhaft wird im Folgenden auf die Analyse p16^{INK4a}-positiver Tumoren eingegangen (relative p16^{INK4a}-Positivität >70% und mindestens mittlere Färbungsintensität in der Immunhistochemie).

Die Gruppe p16^{INK4a}-positiver Tumoren ($n=23$) zeigte eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 80,3 Monaten (CI: 56,6-104,0 Monate, Median nicht ermittelbar), die der p16^{INK4a}-negativen ($n=316$) hingegen 75,6 Monate (CI: 69,5-81,7 Monate, Median: 74,8 Monate). Im Test auf Gleichheit der Überlebensverteilung ergibt sich mittels Log-Rank-Test keine statistische Signifikanz ($p=0,51$). Die 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten belaufen sich auf 56% bzw. 36% für Patient:innen mit p16^{INK4a}-negativen und 55% bzw. 53% für Patient:innen mit p16^{INK4a}-positiven Tumoren.

Diagramm 13: Überlebenskurven der p16^{INK4a}-positiven im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen Tumoren (Cut-off 70%) bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier

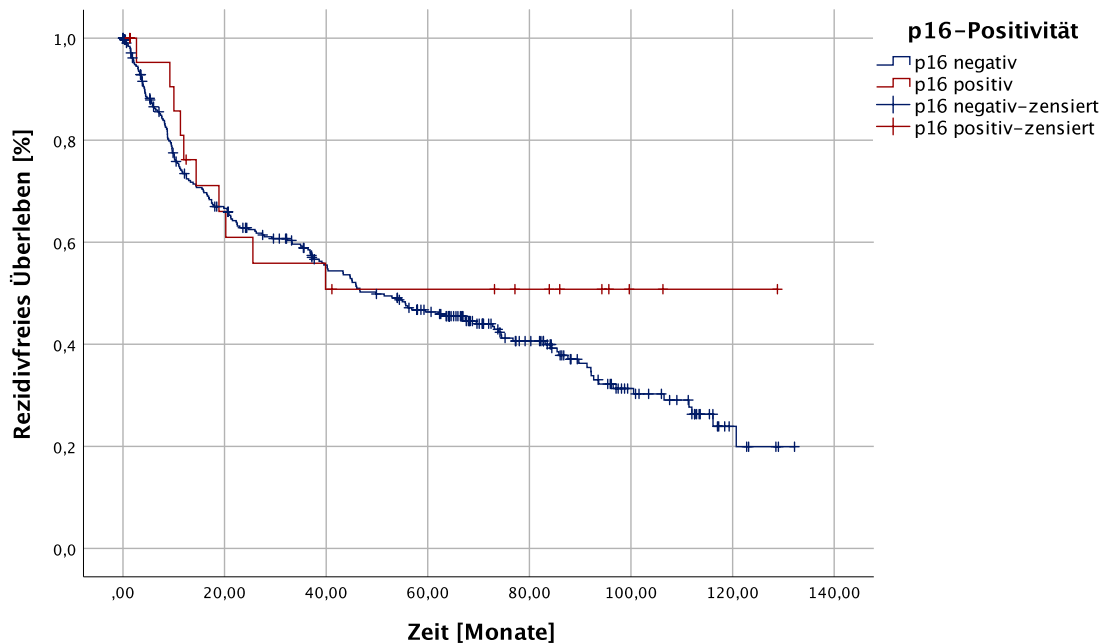


Anmerkung Diagramm 13: Dargestellt sind die Überlebensfunktionen von p16^{INK4a}-positiven (rot) sowie p16^{INK4a}-negativen Tumoren (blau). Es zeigt sich eine tendenziell bessere Prognose der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz ($p=0,53$).

In einem weiteren Schritt wurde das rezidivfreie Überleben unterteilt nach dem p16^{INK4a}-Status analysiert. Innerhalb des Beobachtungszeitraums entwickelten 10 der 23 Patient:innen mit p16^{INK4a}-positiven Tumoren ein Ereignis nach oben genannter Definition (43,4%). Im Kollektiv der p16^{INK4a}-negativen Tumoren waren es 184 von 316 (ca. 58,2%)

Das durchschnittliche rezidivfreie Überleben von Patient:innen mit p16^{INK4a}-positiven Tumoren belief sich auf ca. 73,6 Monate (CI 49,0-98,3; Median nicht ermittelbar). Dem gegenüber liegt das durchschnittliche rezidivfreie Überleben im Kollektiv der p16^{INK4a}-negativen Tumoren bei ca. 62,2 Monaten (CI 56,1-68,3, Median: 49,8 Monate). Im Test auf Gleichheit mittels Log-Rank-Test zeigte sich der ermittelte Unterschied als nicht signifikant ($p=0,29$).

Diagramm 14: Überlebenskurven der p16^{INK4a}-positiven im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen Tumoren (Cut-off 70%) bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier

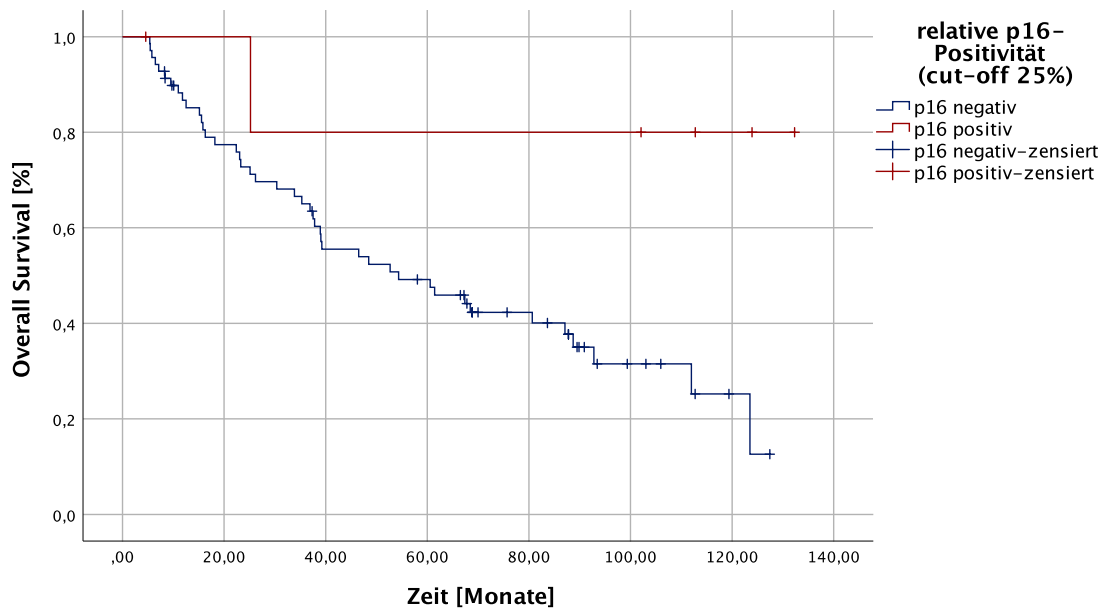


Anmerkung Diagramm 14: Dargestellt sind die Überlebensfunktionen von p16^{INK4a}-positiven (rot) sowie p16^{INK4a}-negativen Tumoren (blau) bezüglich des rezidivfreien Überlebens. Es zeigt sich eine tendenziell bessere Prognose der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz ($p=0,308$).

Im Anschluss erfolgten die Analysen für verschiedene Therapieformen in Abhängigkeit des Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen. Die Therapieformen wurden unterteilt in Patient:innen mit Tumoroperation ohne Adjuvanz, Tumoroperation mit Adjuvanz, primärer Radio(chemo)therapie sowie (palliativer) Chemotherapie.

Hierbei sei insbesondere auf Patient:innen verwiesen, die eine Tumoroperation mit anschließender Adjuvanz erhalten haben (vorab publiziert in [221]): Sowohl bei einem Cut-off Wert von 70%, 50% und 25% für den relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen zeigten sich deutliche Unterschiede im durchschnittlichen Überleben zwischen p16^{INK4a}-positiven und p16^{INK4a}-negativen Tumoren. Tumoren mit einem relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen >70% ($n=4$) besaßen eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 96,6 Monaten (CI 39,5-153,7, Median nicht bestimmbar), während diese im Kollektiv der p16^{INK4a}-negativen bei ca. 67,5 Monaten (CI 56,2-78,7, Median: 60,6 Monate) lag. Dieser Unterschied zeigte sich in unserem Kollektiv als nicht signifikant ($p=0,198$). Auch bei einem Cut-off-Wert von 50% fanden sich keine signifikanten Korrelationen ($p=0,097$). Bei Tumoren mit einem relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen >25% ($n=7$) fand sich eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 110,9 Monaten (CI 73,3-148,4; Median nicht ermittelbar), während diese im Kollektiv von Patient:innen mit einem relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen <25% bei ca. 65,4 Monaten (CI 54,0-76,7; Median: 54,3 Monate) lag. Dieser Unterschied zeigte sich mittels Log Rank Test als statistisch signifikant ($p=0,042$).

Diagramm 15: Überlebenskurve von Patient:innen mit einer Operation und Adjuvanz unterteilt nach p16^{INK4a}-positiven und p16^{INK4a}-negativen Tumoren (Cut-off 25%) nach Kaplan-Meier (modifiziert nach [221])



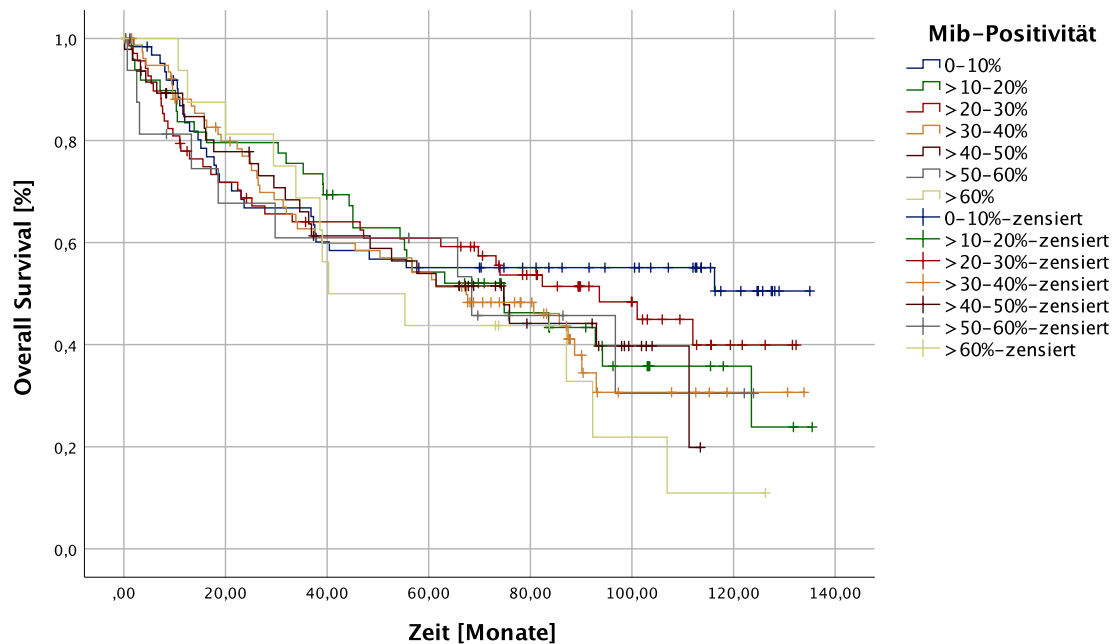
Anmerkung Diagramm 15: Dargestellt sind Patient:innen, die einer Operation mit anschließender Adjuvanz zugeführt wurden. Es zeigt sich ein signifikant besseres Overall Survival im Kollektiv von Tumoren mit einer relativen p16^{INK4a}-Positivität >25% ($p=0,042$).

3.10.2. Überleben in Abhängigkeit der Mib-Positivität

Die Überlebensanalysen der Immunhistochemie für Mib erfolgte zunächst kategorisiert für die Gruppen eines relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 0 bis 10%, >10 bis 20%, >20 bis 30%, >30 bis 40%, >40 bis 50%, >50 bis 60% sowie >60%.

Im Patient:innenkollektiv mit einem relativen Anteil an Mib-positiven Tumorzellen von 0 bis 10% ($n=63$) findet sich die höchste durchschnittliche Überlebenszeit von 82,9 Monaten (CI 68,5-97,3, Median nicht ermittelbar), während sich bei einem relativen Anteil Mib-positiver Tumorzellen von über 60% ($n=17$) mit 62,6 Monaten die niedrigste Überlebenszeit findet (CI 43,2-82,0, Median ca. 40,3 Monate). Die gefundenen Unterschiede über allen Gruppen zeigten mittels Log Rank Test keine statistische Signifikanz ($p=0,075$).

Diagramm 16: Überlebenskurven des kategorisierten relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 16: Dargestellt sind die Überlebensfunktionen nach der kategorisierten Mib-Positivität. Wenngleich deutliche Tendenzen sichtbar werden, zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,616$).

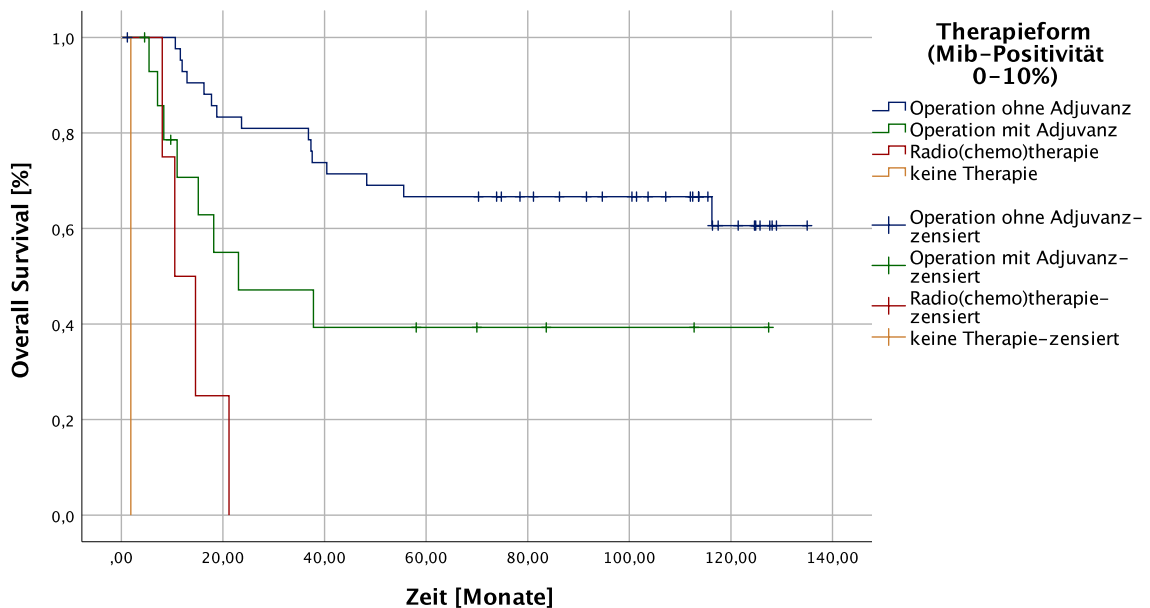
Im Anschluss erfolgte die Analyse des rezidivfreien Überlebens anhand der beschriebenen kategorisierten Mib-Positivität. Im Kollektiv der Patient:innen mit einem relativen Anteil Mib-positiver Tumorzellen von 0 bis 10% belief sich die Anzahl an Ereignissen auf 30 von 63 (47,6%), wohingegen sich bei Tumoren mit einer relativen Mib-Positivität von >60% 12 Ereignisse bei 17 Patient:innen fanden (ca. 70,6%).

Die höchste durchschnittliche rezidivfreie Überlebenszeit zeigte mit ca. 69,3 Monaten (CI55,4-83,2; Median: ca. 116,1 Monate) das Kollektiv mit der geringsten Mib-Positivität, die kompromittierteste durchschnittliche rezidivfreie Überlebenszeit (50,8 Monate; CI27,2-74,7; Median: 22,5 Monate) fand sich in der Gruppe mit einer Mib-Positivität von >50 bis 60%. Im Test auf Gleichheit der Verteilungen mittels Log-Rank-Test zeigten sich diese Unterschiede über das gesamte Kollektiv als nicht signifikant ($p=0,069$).

Unterteilt nach der Therapieform zeigte sich eine Überlegenheit der Operation ohne Adjuvanz gegenüber allen anderen Therapieformen im Kollektiv der Tumoren mit einer relativen Mib-Positivität von 0-10% (Operation mit Adjuvanz ($p=0,026$), Radio(chemo)therapie ($p<0,001$), keine Therapie ($p<0,001$)). Auch in den nach Mib kategorisierten Gruppen von 10-20% sowie 30-40% zeigte sich eine hochsignifikante Überlegenheit der Operation ohne Adjuvanz gegenüber der Radio(chemo)therapie.

Interessanterweise findet sich im Kollektiv der Patient:innen mit einer relativen Mib-Positivität von 50-60% eine nicht signifikante Überlegenheit der Operation mit Adjuvanz gegenüber einer Operation ohne Adjuvanz ($p=0,5$).

Diagramm 17: Überlebenskurven von Tumoren mit einer kategorisierten Mib-Positivität von 0-10% unterteilt nach der Therapieform bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 17: Dargestellt sind Tumoren mit einer Mib-Positivität von 0-10%. Es zeigt sich eine signifikante Überlegenheit der Operation ohne Adjuvanz gegenüber allen anderen Therapieoptionen ($p=0,026$; $p<0,001$; $p<0,001$).

Im Gesamtkollektiv konnte kein Grenzwert ermittelt werden, ab dem sich signifikante Unterschiede im Overall Survival oder rezidivfreien Überleben zwischen hohen oder niedrigen Teilungsraten ergaben.

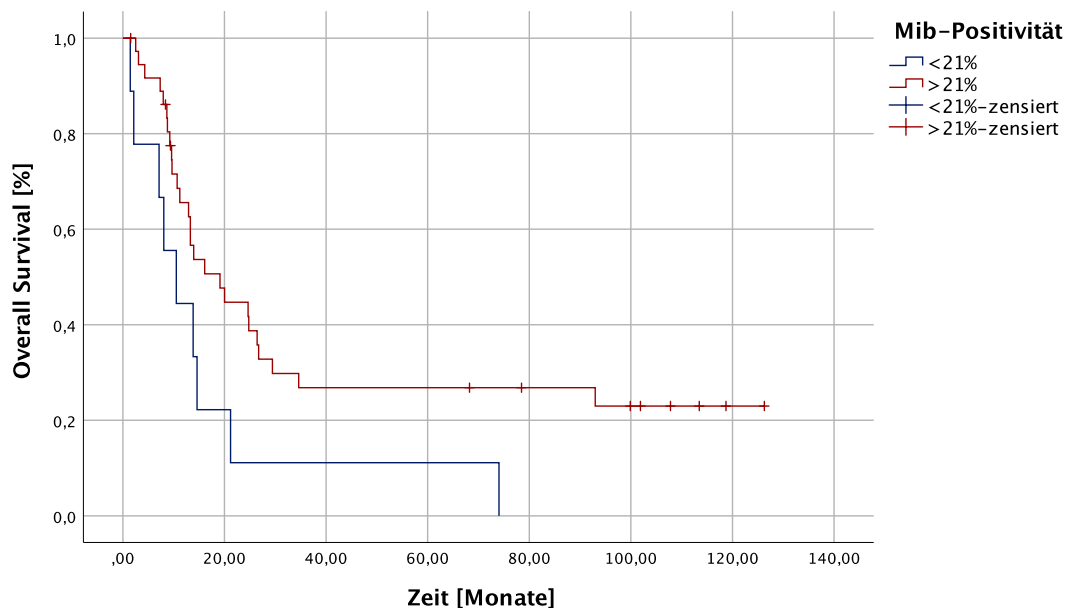
In einem weiteren Schritt erfolgte die Analyse des Überlebens zwischen Tumoren mit hohen und niedrigen Teilungsraten geschichtet über die Therapieform. Orientierend an dem festgelegten Grenzwert zur Subgruppenanalyse von Xie et al. [64] erfolgte eine Untersuchung der Tumoren bei einem Grenzwert von 21% des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen.

In dem Kollektiv der Patient:innen, die einer primären Radiochemotherapie zugeführt wurden ($n=46$), zeigte sich in der Gruppe mit hoher Teilungsraten (relativer Anteil Mib-positiver Tumorzellen $>21\%$, $n=37$) eine durchschnittliche Überlebenszeit von 43,5 Monaten (CI 27,2-59,8; Median: 19,1 Monate), während diese im Kollektiv mit niedriger Teilungsraten bei ca. 17,0 Monaten (CI 2,4-31,5; Median: 10,5 Monate) lag. Dieser Unterschied zeigte sich mittels Log-Rank-Test statistisch signifikant ($p=0,031$).

Unter gleicher Definition zeigte sich zwischen den Kollektiven hoher und niedriger Teilungsraten für eine Tumoroperation mit Adjuvanz ($n=75$) und ohne Adjuvanz ($n=201$) oder einer singulären Chemotherapie ($n=2$) kein signifikanter Unterschied im Overall Survival ($p=0,344$; $p=0,145$; $p=0,317$).

Auch bezüglich des rezidivfreien Überlebens ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapieformen finden.

Diagramm 18: Überlebenskurven von Patient:innen mit Radiochemotherapie bei einem Cut-off Wert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 21% bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 18: Überlebenskurven von Patient:innen mit Radiochemotherapie bei einem Cut-off Wert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 21% bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier ($p=0,031$).

3.10.3. Überleben in Abhängigkeit des HPV-Status bei p16^{INK4a}-positiven Tumoren

Insgesamt liegen Daten zu 15 der 23 p16-positiven Tumoren bezüglich des HPV-Status vor. Hierbei zeigten sich 6 Tumoren positiv (40%, p16+/HPV+), wohingegen in 9 der p16^{INK4a}-positiven Tumoren kein Nachweis von HPV gelang (60%, p16+/HPV-).

Bezüglich des Overall Survivals zeigten die p16+/HPV- Tumoren mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von ca. 67,1 Monaten (CI40,9-93,2; Median nicht ermittelbar) eine tendenziell bessere Prognose gegenüber den p16+/HPV+ Tumoren, die eine durchschnittliche Überlebenszeit von 59,8 Monaten (CI18,6-101,0; Median: ca. 26,5 Monate) aufwiesen. Dieser Unterschied zeigt keine statistische Signifikanz ($p=0,385$).

Im rezidivfreien Überleben zeigte sich ein ähnliches Bild mit tendenziell besserer Prognose der p16+/HPV- Tumoren ohne Signifikanz ($p=0,532$).

Weitere Subgruppenanalysen nach der Therapieform erbrachten keine signifikanten Unterschiede.

3.10.4. Überleben in Abhängigkeit der kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Positivität

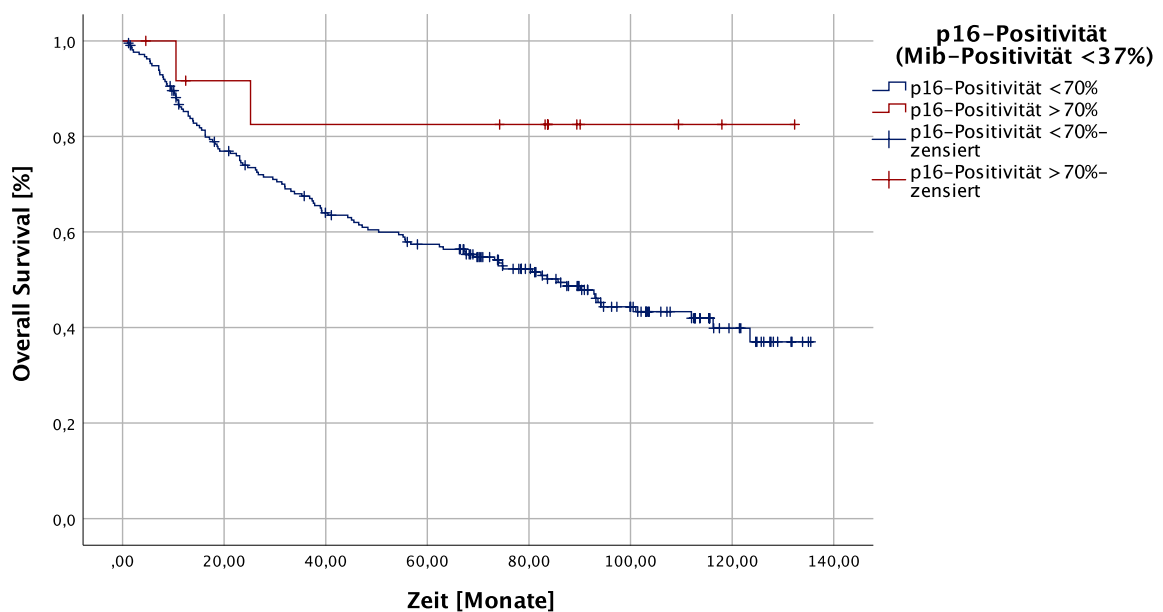
Im Kollektiv der Patient:innen mit erhaltener Therapie wurden die p16^{INK4a}-positiven (relativer Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen 70% bei mindestens mittlerer Färbungsintensität) im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen (mindestens eine Bedingung der Positivität nicht erfüllt) Tumoren geschichtet über die Mib-

Positivität untersucht. Hierzu diene zunächst der festgesetzte Grenzwert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 21%.

Im Kollektiv der Patient:innen mit einer niedrigen Teilungsrate zeigten sich zwischen p16^{INK4a}-positiven und -negativen Tumoren deutliche Unterschiede im durchschnittlichen Überleben von ca. 15,4 Monaten zugunsten der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ohne statistische Signifikanz (p=0,266). Weitere Analysen erfolgten in Anlehnung an Lange et al. bei einem Grenzwert von 37% [220].

Bei Tumoren mit einer relativen Mib-Positivität <37% zeigten p16^{INK4a}-positive Tumoren (n=13) eine durchschnittliche Überlebenszeit von 104,5 Monaten (CI76,8,1-132,2, Median nicht ermittelbar), während p16^{INK4a}-negative Tumoren (n=213) mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 78,9 Monaten (CI71,5-86,3; Median: 85,7 Monate) ein signifikant schlechteres Overall Survival aufwiesen (p=0,048).

Diagramm 19: Überlebenskurven von Tumoren mit niedrigen Teilungsraten (Mib-Positivität <37%) unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier

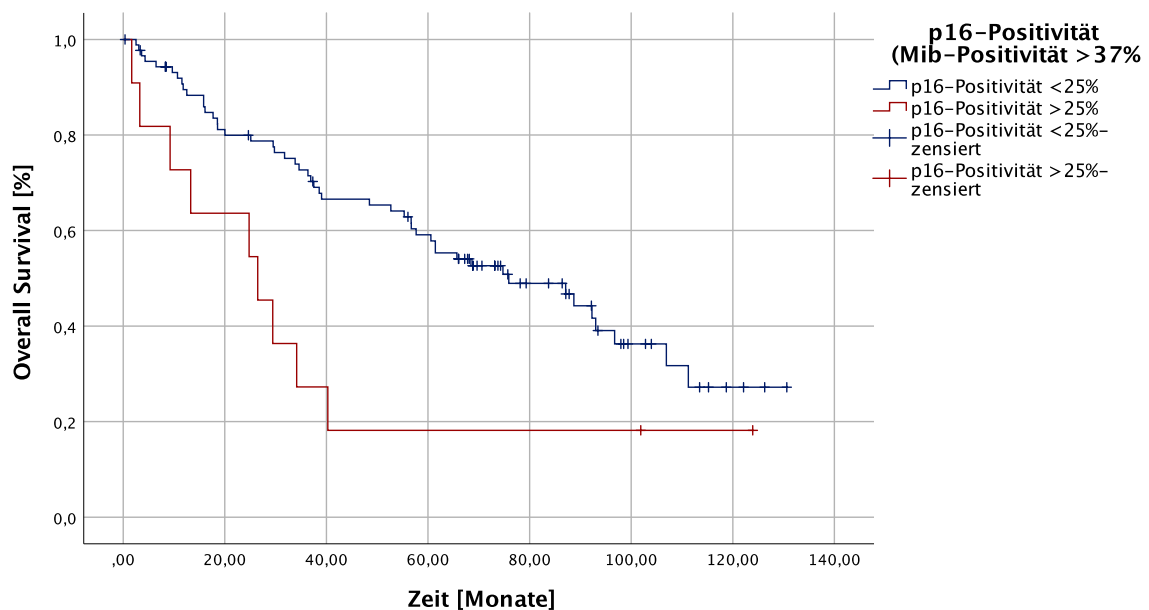


Anmerkung Diagramm 19: Dargestellt sind die Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals von Tumoren mit einer Mib-Positivität <37% unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität. Es zeigt sich eine Überlegenheit der p16^{INK4a}-positiven Tumoren (p=0,048).

Führt man unter der beschriebenen Definition einer p16^{INK4a}-Positivität eine Überlebensanalyse für eine Mib-Positivität >37% durch, zeigen sich deutlich konträre Tendenzen ohne Signifikanz. Hier liegt das durchschnittliche Überleben p16^{INK4a}-positiver Tumoren (n=9) bei ca. 47,3 Monaten (CI19,9-74,7; Median: 29,4 Monate), während dieses in der Gruppe der p16^{INK4a}-negative Tumoren (n=91) bei ca. 73,3 Monaten (CI63,0-83,7; Median: 74,7 Monate) liegt (p=0,168).

Im Kollektiv mit einem Cut-off-Wert von 25% für den relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen ergibt sich für p16^{INK4a}-positive Tumoren (n=11) ein durchschnittliche Überlebenszeit von 39,1 Monaten (CI14,5-63,8; Median: 26,5 Monate), während sich im Kollektiv der p16^{INK4a}-negativen Tumoren (n=89) eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 74,9 Monaten (CI64,6-85,3; Median: 75,9 Monate) findet. Dieser Unterschied zeigt eine statistische Signifikanz (p=0,019).

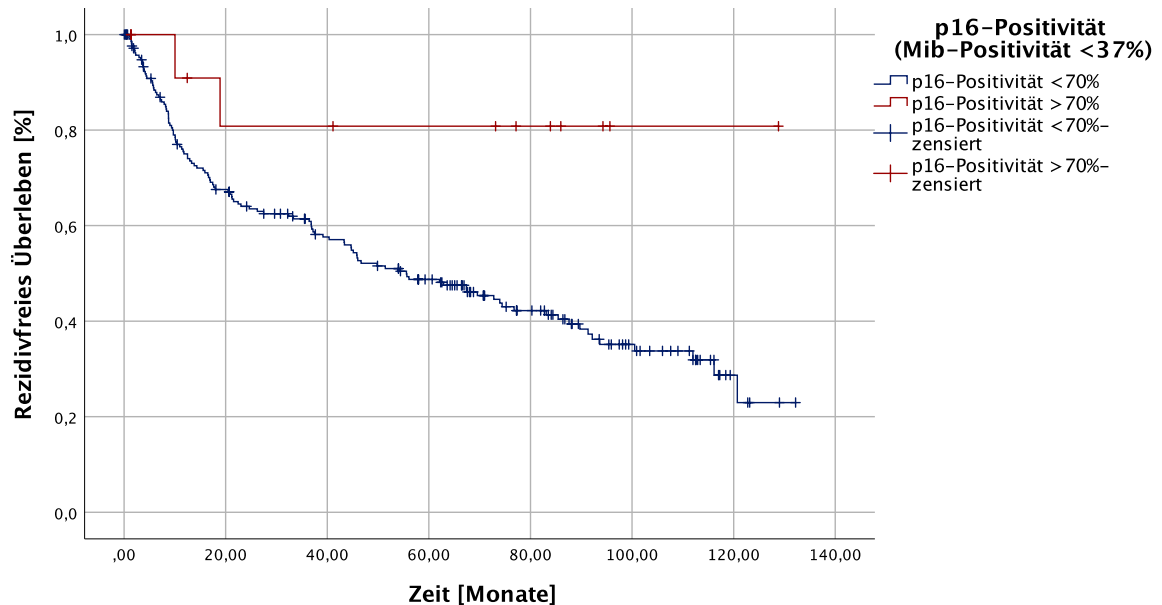
Diagramm 20: Überlebenskurven von Tumoren mit hohen Teilungsraten (Mib-Positivität >37%) unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Anmerkung Diagramm 20: Dargestellt sind die Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals von Tumoren mit einer Mib-Positivität >37% unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität (Cut-off 25%). Es zeigt sich eine Überlegenheit der p16^{INK4a}-negativen Tumoren (p=0,019).

Bezügliches des rezidivfreien Überlebens mit einer relativen Mib-Positivität <37% zeigten p16^{INK4a}-positive Tumoren (n=13) eine durchschnittliche rezidivfreie Überlebenszeit von 106,3 Monaten (CI79,5,1-134,3, Median nicht ermittelbar), während p16^{INK4a}-negative Tumoren (n=213) mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Überlebenszeit von ca. 65,3 Monaten (CI57,8-72,8; Median: 55,6 Monate) ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben aufwiesen (p=0,028). Im Kollektiv der Tumoren mit hohen Teilungsraten lassen sich keine signifikanten Unterschiede zeigen.

Diagramm 21: Überlebenskurven von Tumoren mit niedrigen Teilungsraten (Mib-Positivität <37%) unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität bezüglich des rezidivfreien Überlebens nach Kaplan-Meier

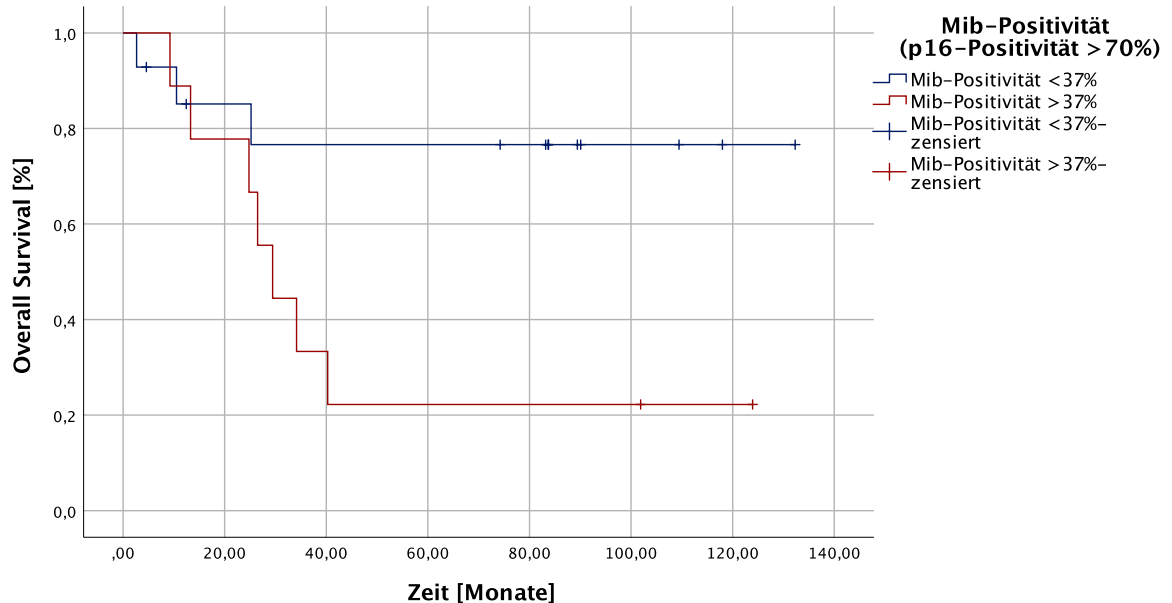


Anmerkung Diagramm 21: Dargestellt sind die Überlebenskurven bezüglich des rezidivfreien Überlebens von Tumoren mit einer Mib-Positivität <37% unterteilt nach der p16^{INK4a}-Positivität. Es zeigt sich eine Überlegenheit der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ($p=0,028$).

Aufgrund dieser Erkenntnisse erfolgte eine dezidierte Untersuchung der p16^{INK4a}-positiven Tumoren ($n=23$). Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit hohen und niedrigen Teilungsraten. So wiesen p16^{INK4a}-positive Tumoren mit einer hoher Teilungsrate ein durchschnittliches Überleben von ca. 47,3 Monaten (CI19,9-74,7; Median: ca. 29,4 Monate) auf, während dieses im Falle niedriger Teilungsraten bei 104,5 Monaten (CI76,8-132,3, Median nicht ermittelbar) lag. Im Log Rank Test erwiesen sich diese Unterschiede als signifikant ($p=0,034$). Auch im rezidivfreien Überleben zeigte sich eine Überlegenheit der p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit einer niedrigen Teilungsrate im Vergleich zu p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit einer hohen Teilungsrate ($p=0,043$).

In der Analyse des HPV-Status zeigten p16+/Mib+ Tumoren einen Nachweis von HPV DNA in 3 von 7 Fällen (ca. 42,9%). Demgegenüber fand sich in der Subgruppe der p16+/Mib- Tumoren in 3 von 8 Fällen (37,5%) HPV DNA. Im exakten Test nach Fischer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,622$).

Diagramm 22: Überlebenskurven von p16^{INK4a}-positiven Tumoren bei einem Cut-off Wert des relativen Anteils Mib-positiver Tumorzellen von 37% bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier

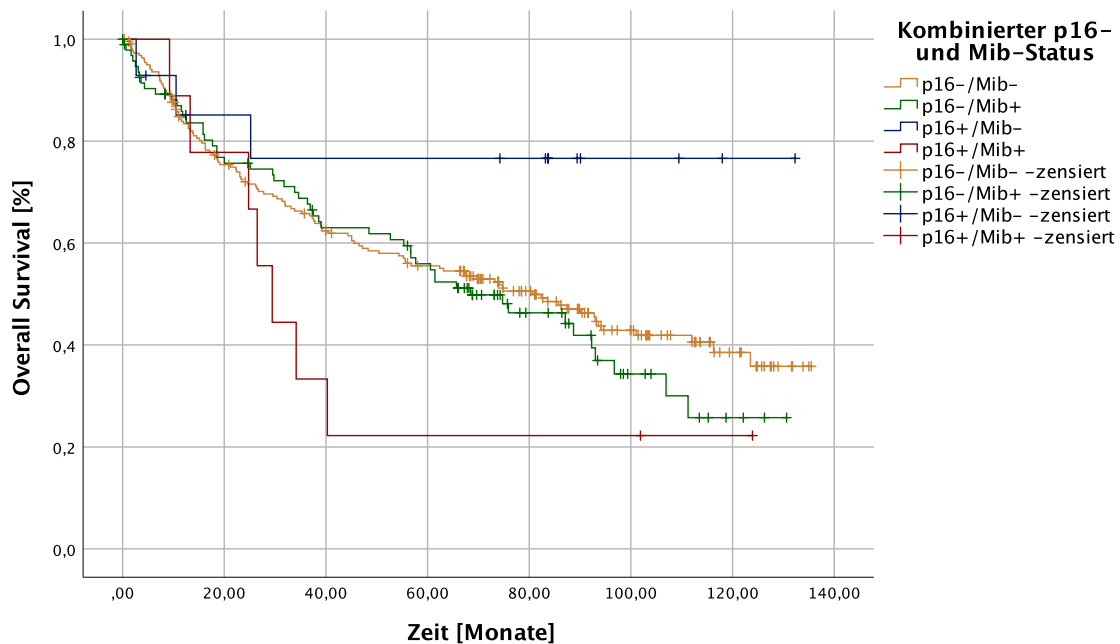


Anmerkung Diagramm 22: Dargestellt sind die Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals p16^{INK4a}-positiver Tumoren nach der kategorisierten Mib-Positivität. Es zeigt sich eine Überlegenheit der p16^{INK4a} positiven Tumoren mit hoher Teilungsrate im Vergleich zu p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit niedriger Teilungsrate ($p=0,034$).

Im Kollektiv der p16^{INK4a}-negativen Tumoren zeigte sich kein relevanter Zusammenhang zur Mib-Positivität. Es bestand eine durchschnittliche Überlebenszeit der Subgruppe mit niedriger Teilungsrate von ca. 76,8 Monaten (CI:69,4-84,1, Median: 80,7 Monate), während die in der Subgruppe mit hoher Teilungsrate bei ca. 71,0 Monaten (CI:60,7-81,3, Median: 68,4 Monate) lag. Der gefundene Unterschied zeigte keine statistische Signifikanz ($p=0,45$).

Zusammenfassend besteht bezüglich der Prognose eine signifikante Überlegenheit der p16+/Mib-Tumoren gegenüber allen anderen Gruppen. p16+/Mib+ Tumoren zeigen über alle untersuchten Gruppen die schlechteste Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 22%. Eine zusammenfassende Darstellung des Overall Survivals sowie der Überlebensraten im Vergleich kann dem Diagramm 23 sowie der Tabelle 13 entnommen werden.

Diagramm 23: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Legende Diagramm 23: p16-/Mib- = p16^{INK4a} <70% und Mib <37%, p16-/Mib+ = p16^{INK4a} <70% und Mib >37%, p16+/Mib- = p16^{INK4a} >70% und Mib <37%, p16+/Mib+ = p16^{INK4a} >70% und Mib >37%

Anmerkung Diagramm 23: Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals unterteilt nach dem kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Status. Es bestehen signifikante Unterschiede in der durchschnittlichen Überlebenszeit zwischen p16-/Mib+ und p16-/Mib- Tumoren mit erhaltener Therapie (p=0,048), p16+/Mib+ und p16+/Mib- Tumoren (p=0,034) sowie p16-/Mib+ und p16+/Mib- Tumoren (p=0,048).

Tabelle 12: Vergleichende Überlebensanalyse des kombinierten p16-/Mib-Status in Bezug auf das Overall Survival nach Kaplan-Meier

	n	DÜZ	5 JÜR	p16-/Mib-	p16-/Mib+	p16+/Mib-	p16+/Mib+
p16-/Mib-	221	76,8 Monate	56%		p=0,45	p=0,048	p=0,168
p16-/Mib+	95	71,0 Monate	56%	p=0,45		p=0,048	p=0,168
p16+/Mib-	14	104,5 Monate	76%	p=0,048	p=0,048		p=0,034
p16+/Mib+	9	47,3 Monate	22%	p=0,168	p=0,168	p=0,034	

Legende Tabelle 12: p16-/Mib-= p16^{INK4a} <70% und Mib <37%, p16-/Mib+ = p16^{INK4a} <70% und Mib >37%, p16+/Mib- = p16^{INK4a} >70% und Mib <37%, p16+/Mib+= p16^{INK4a} >70% und Mib >37%, n = Anzahl, DÜZ = durchschnittliche Überlebenszeit nach Kaplan Meier, 5 JÜR = 5-Jahres-Überlebensrate

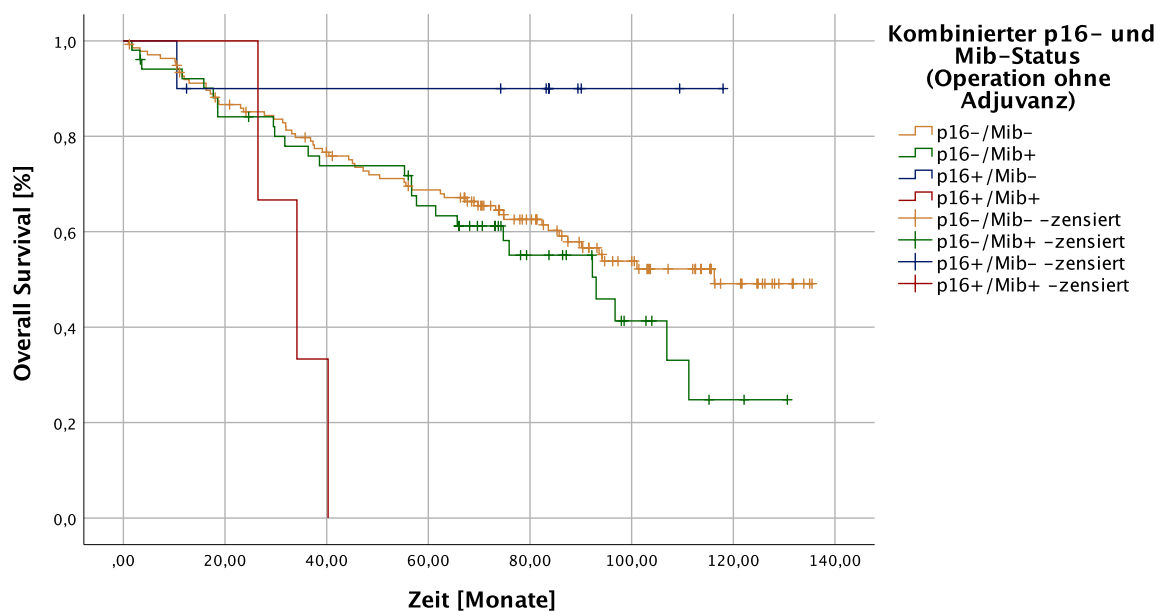
Anmerkung Tabelle 12: Dargestellt sind die p-Werte (Log-Rank-Test) in der vergleichenden Analyse der untersuchten Konstellation aus kombiniertem p16- und Mib-Status bezogen auf das Overall Survival. Es besteht eine signifikante Überlegenheit der p16+/Mib- Tumoren gegenüber allen anderen Subgruppen.

Im Folgenden wird auf die Auswirkung des kombinierten p16-/Mib-Status in Abhängigkeit von der durchgeführten Therapie eingegangen. Überlebensanalysen sind, aufgrund der Zensierung, lediglich orientierend möglich.

Im Kollektiv der Patient:innen mit stattgehabter Operation ohne Adjuvanz zeigte sich eine signifikante Unterlegenheit von p16+/Mib+ Tumoren im Vergleich zu allen anderen Tumoren (s. hierzu auch Tabelle 14). Zusätzlich fand sich eine signifikante Überlegenheit von p16+/Mib- Tumoren gegenüber p16-/Mib+ Tumoren ($p=0,048$).

Im Kollektiv der Patient:innen, die einer Operation mit Adjuvanz oder einer Radio(chemo)therapie zugeführt wurden, ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zuvor definierten Gruppen finden.

Diagramm 24: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier im Kollektiv der Patient:innen mit Operation ohne Adjuvanz



Legende Diagramm 24: p16-/Mib- = p16^{INK4a} <70% und Mib <37%, p16-/Mib+ = p16^{INK4a} <70% und Mib >37%, p16+/Mib- = p16^{INK4a} >70% und Mib <37%, p16+/Mib+ = p16^{INK4a} >70% und Mib >37%

Anmerkung Diagramm 24: Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals unterteilt nach dem kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Status im Kollektiv der Patient:innen mit Operation ohne Adjuvanz. Es besteht eine signifikante Unterlegenheit der p16+/Mib+ Tumoren gegenüber allen anderen Subgruppen.

Tabelle 13: Vergleichende Analyse des Overall Survivals des kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Status von Patient:innen mit stattgehabter Operation ohne Adjuvanz

Therapieform		n	p16-/Mib-	p16-/Mib+	p16+/Mib-	p16+/Mib+
Operation ohne	p16-/Mib-	137		<i>p=0,217</i>	<i>p=0,102</i>	<i>p=0,005</i>
	p16-/Mib+	51	<i>p=0,217</i>		<i>p=0,048</i>	<i>p=0,014</i>
Adjuvanz	p16+/Mib-	10	<i>p=0,102</i>	<i>p=0,048</i>		<i>p=0,006</i>
	p16+/Mib+	3	<i>p=0,005</i>	<i>p=0,014</i>	<i>p=0,006</i>	

Legende Tabelle 13: p16-/Mib- = p16^{INK4a} <70% und Mib <37%, p16-/Mib+ = p16^{INK4a} <70% und Mib >37%, p16+/Mib- = p16^{INK4a} >70% und Mib <37%, p16+/Mib+ = p16^{INK4a} >70% und Mib >37%, n = Anzahl

Anmerkung Tabelle 13: Dargestellt sind die p-Werte (Log-Rank-Test) in der vergleichenden Analyse der untersuchten Konstellation aus kombiniertem p16- und Mib-Status bezogen auf das Overall Survival. Es besteht eine signifikante Überlegenheit der p16+/Mib- Tumoren gegenüber allen anderen Subgruppen.

3.10.5. Überleben in Abhängigkeit der kombinierten HPV- und Mib-Positivität

Der prognostische Einfluss der kombinierten Bewertung des p16^{INK4a}- und Mib-Status wurde bereits dargelegt. In einem weiteren Schritt soll nun der mögliche Effekt einer Zusammenführung des HPV-Status und Mib-Status bewertet werden. Zur besseren Übersichtlichkeit wird im Folgenden lediglich von einer HPV-Positivität (HPV+) gesprochen, wenngleich lediglich die p16^{INK4a}-positiven Tumoren auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht wurden.

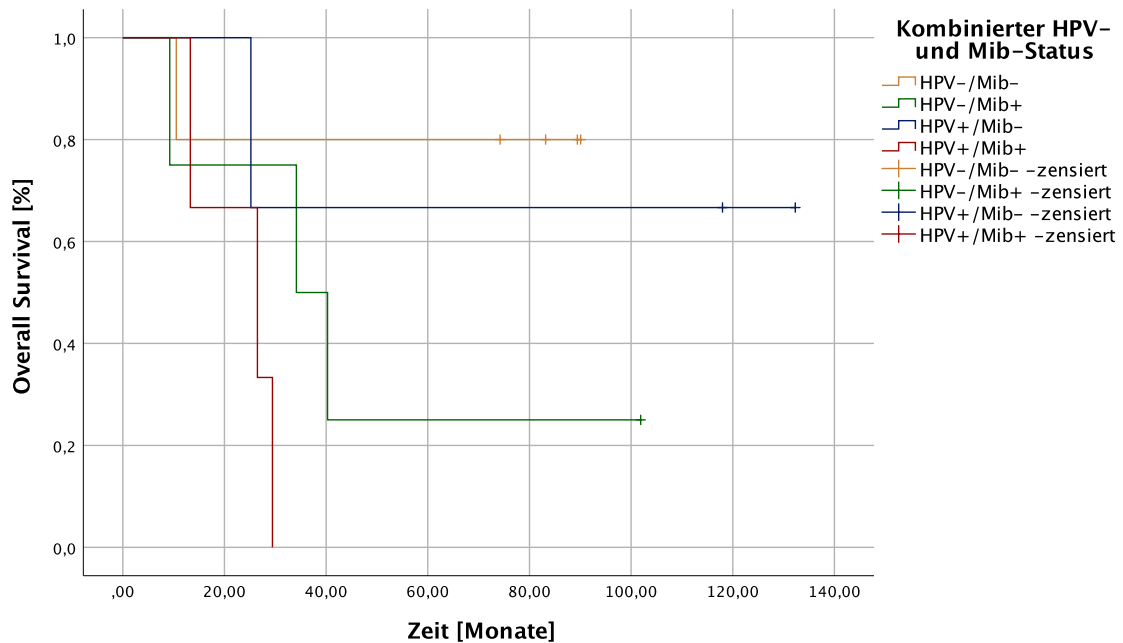
Im Kollektiv der HPV-positiven Tumoren (n=6) erfolgte die Analyse des Overall Survivals unterteilt nach der relativen Mib-Positivität (Cut-off 37%). Hier zeigte sich im Kollektiv mit einer niedrigen Teilungsrate (HPV+/Mib-) eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 96,6 Monaten (CI39,5-153,7, Median nicht ermittelbar). In der Gruppe mit einer hohen Teilungsrate fand sich mit einer Überlebenszeit von ca. 23,1 Monaten (CI13,3-32,8, Median: 26,5 Monaten) eine deutlich schlechtere Prognose. Im durchgeführten Log Rank Test zeigte sich dieser Unterschied ohne statistische Signifikanz (p=0,197).

In Bezug auf HPV-negative Tumoren (n=9) zeigte sich in der Subgruppe mit niedriger Teilungsrate eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 74,2 Monaten (CI46,3-102,1; Median nicht ermittelbar), während diese bei hohen Teilungsraten bei ca. 46,3 Monaten (CI13,0-79,8; Median: ca. 34,1 Monate) lag. Auch in diesem Kollektiv sind die Unterschiede ohne statistische Signifikanz (p=0,145).

Aufgrund der tendenziell besseren Überlebensraten von Tumoren mit niedrigen Teilungsraten erfolgte in einem weiteren Schritt die Analyse des Einflusses von HPV-Status und kategorisierter Teilungsrate (Cut-off-Wert 37%) mittels Cox-Regression in diesem Kollektiv. Hier zeigte sich eine Hazard-Ratio (HR) für die Teilungsrate von 4,87 (CI0,96-24,7) ohne statistische Signifikanz (p=0,056). Bezüglich des HPV-Status ließ sich eine nicht signifikante HR von 0,65 (CI0,15-2,7; p=0,55) ermitteln.

In Hinblick auf das rezidivfreie Überleben fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Diagramm 25: Überlebenskurven unterteilt nach dem kombinierten HPV- und Mib-Status bezüglich des Overall Survivals nach Kaplan-Meier



Legende Diagramm 25: HPV-/Mib- = HPV-DNA-negativ und Mib <37%, HPV-/Mib+ = HPV-DNA-negativ und Mib >37%, HPV+/Mib- = HPV-DNA-positiv und Mib <37%, HPV+/Mib+ = HPV-DNA-positiv und Mib >37%

Anmerkung Diagramm 25: Überlebenskurven bezüglich des Overall Survivals unterteilt nach dem kombinierten HPV- und Mib-Status. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen und hohen und niedrigen Teilungsraten unabhängig vom HPV- Status ($p=0,042$).

Tabelle 14: Vergleichende Überlebensanalyse des kombinierten HPV/Mib-Status in Bezug auf das Overall Survival nach Kaplan-Meier

	n	DÜZ	5 JÜR	HPV-/Mib-	HPV-/Mib+	HPV+/Mib-	HPV+/Mib+
HPV-/Mib-	5	74,2 Monate	80%		$p=0,145$	$p=0,777$	$p=0,073$
HPV-/Mib+	4	46,4 Monate	25%	$p=0,145$		$p=0,404$	$p=0,139$
HPV+/Mib-	3	96,6 Monate	67%	$p=0,777$	$p=0,404$		$p=0,197$
HPV+/Mib+	3	23,1 Monate	0%	$p=0,073$	$p=0,139$	$p=0,197$	

Legende Tabelle 14: HPV-/Mib- = HPV-DNA-negativ und Mib <37%, HPV-/Mib+ = HPV-DNA-negativ und Mib >37%, HPV+/Mib- = HPV-DNA-positiv und Mib <37%, HPV+/Mib+ = HPV-DNA-positiv und Mib >37%

Anmerkung Tabelle 14: Dargestellt sind die p-Werte (Log-Rank-Test) in der vergleichenden Analyse der untersuchten Konstellation aus kombiniertem HPV- und Mib-Status bezogen auf das Overall Survival. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede, wenngleich beachtliche Differenzen zwischen den verschiedenen Subgruppen bestehen.

4. Diskussion

4.1. Einordnung des Patient:innenkollektivs

Im Zeitraum vom 01.01.2005 bis zum 31.12.2011 wurden 339 Patient:innen mit der Diagnose eines oralen Plattenepithelkarzinoms eingeschlossen. Die Ratio von Männern zu Frauen verhielt sich hierbei wie 2:1, was den üblichen publizierten Daten entspricht [5, 8].

In der Ausprägung der klassischen Risikofaktoren zeigte sich sowohl in puncto Tabak- wie auch Alkoholkonsum ein signifikant häufigeres Vorkommen in der Gruppe der Männer – ein Fakt, der weithin bekannt sowie publiziert ist und sowohl auf nationaler wie auch internationaler Ebene Bestätigung findet [16, 17, 25].

Die essenzielle Bedeutung dieser Risikofaktoren in der Karzinogenese eines oralen Plattenepithelkarzinoms mag eine Erklärung dafür liefern, dass männliche Patienten in einem signifikant jüngeren Alter erkranken.

Die meisten Patient:innen wurden einer Operation ohne Adjuvanz zugeführt, gefolgt von der Operation mit Adjuvanz. Die primäre Radio(chemo)therapie stellte die seltenste Therapieform dar. Im Vergleich auf nationaler Ebene finden sich ähnliche Werte [51]. Es wird weiterhin auf die erschwerte Übertragbarkeit von Überlebensanalysen in Abhängigkeit der Therapieform hingewiesen [51], weshalb die gefundenen signifikanten Unterschiede in dem hier vorliegenden Kollektiv als Ergänzung der Literatur zu verstehen sind.

Obwohl Daten bezüglich der Ethnie der Patient:innen nicht zu erheben waren, liegt die Vermutung eines vorherrschend kaukasischen Phänotyps nahe, wenngleich diese axiomatische Annahme in Anbetracht der heterogenen Bevölkerungsstruktur Berlins diskutabel bleibt.

Die hier aufgeführte Diskussion der Ergebnisse bezüglich der deskriptiven Beschreibung der klinischen Charakteristika versteht sich lediglich als orientierende Einordnung.

4.2. Immunhistochemie für p16^{INK4a}

Der Großteil an untersuchten Tumoren zeigte eine geringe relative Rate an p16^{INK4a}-positiven Tumorzellen. Lediglich 23 der 339 Tumoren (6,8%) erfüllten die Definition einer p16^{INK4a}-Positivität über 70%, was eher dem unteren Spektrum der publizierten Daten entspricht [196, 222]. Verschiedene Definitionen einer p16^{INK4a}-Positivität mögen zu diesem Fakt beitragen. Weiterhin wird frequent diskutiert, dass oropharyngeale Karzinome fälschlicherweise als orale Plattenepithelkarzinome angenommen werden [197]. Da bei ersteren höhere Raten an p16^{INK4a}-positiven Tumorzellen bekannt sind [196], mag dies zu im Durchschnitt höheren Werten beitragen. Der Fakt einer vergleichsweise niedrigen Anzahl an p16^{INK4a}-positiven Tumoren unterstützt die Annahme einer sorgfältigen Diskriminierung zwischen oropharyngealen und oralen Karzinomen in den hier vorliegenden Daten.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem durchschnittlichen relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen zwischen G2 und G3 differenzierten Tumoren mit einer höheren Rate p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen im Kollektiv der G3 differenzierten Tumoren. Ähnliche Ergebnisse finden sich in der Literatur. So zeigten Ampur et al. eine höhere Rate an p16^{INK4a}-positiven Tumorzellen in schlechter differenzierten Tumoren, wobei auf eine geringe Fallzahl von lediglich 31 Patient:innen hingewiesen sei [223].

Diesem Ergebnis stehen Publikationen gegenüber, die keinen Einfluss einer erhöhten p16^{INK4a}-Expression auf das Grading gezeigt haben. So postulieren Blahak et al. einen fehlenden Einfluss des p16^{INK4a}-Status auf TNM-Stadium und Grading, wenngleich die meisten Tumoren gut bis mäßig differenziert waren [201]. In der Subtypen-Analyse diskutieren manche Autor:innen eine erhöhte p16^{INK4a}-Positivität in verrukösen, i.e. gut differenzierten, Karzinomen der Mundhöhle [224].

Keine der weiteren untersuchten klinischen Variablen (Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Alkoholkonsum, Tabakkonsum, UICC-Stadium, Differenzierungsgrad, Therapieform, Knocheninfiltration, close-margin Resektion, extrakapsuläre Ausbreitung) zeigte eine Korrelation in Bezug auf die p16^{INK4a}-Positivität, was den Ergebnissen anderer Studien entspricht [201, 225]. Im Gegensatz hierzu finden sich einzelne Studien, die einen Einfluss auf beispielsweise das TNM-Stadium oder die Ethnie zeigen [204].

4.3. Immunhistochemie für Mib/Ki-67

In dem hier untersuchten Kollektiv ergab sich eine durchschnittliche Mib-Positivität von ca. 28,4%, was den Raten anderer Untersuchungen entspricht, wobei auf Unterschiede gerade in Bezug auf das Grading zu verweisen bleibt. So zeigten G1 differenzierte Tumoren signifikant niedrigere Raten als G2- oder G3-differenzierte Tumoren. Dies erscheint bei höheren Proliferationsraten schlechter differenzierter Tumoren pathophysiologisch plausibel. Ähnliche Zusammenhänge zwischen der Rate an Mib-positiven Tumorzellen und dem Grading wurden bereits an anderer Stelle publiziert [225], wobei sich Unterschiede auch in den prämaligen Vorstufen finden lassen [226]. Weiterhin zeigte beispielsweise Kurokawa et al. eine Korrelation von Mib-Positivität und dem histologischen Grad der Invasionsfront im oralen Plattenepithelzellkarzinom [227].

Während dieser Zusammenhang basalen tumorphysiologischen Prozessen bei einheitlicher Datenlage folgt, differieren die Ergebnisse in Hinblick auf den Zusammenhang zu einer p16^{INK4a}-Positivität oder HPV-Assoziation.

Die hier vorliegenden Daten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der mittleren Mib-Positivität und dem p16^{INK4a}-Status oder dem HPV-Status p16^{INK4a}-positiver Tumoren erbringen. Ähnliche Ergebnisse zeigten Alves et al. in einem experimentellen Mausmodell [228].

Bezüglich der Teilungsrate zeigten p16+/HPV+ Tumoren eine tendenziell höhere relative Mib-Positivität im Vergleich zu den p16+/HPV- Tumoren ohne statistische Signifikanz. Einen ebenfalls a.e. fehlenden Zusammenhang zwischen HPV-Status und relativer Mib-Positivität beschreiben Galvis et al., wobei in dieser Untersuchung die HPV-negativen Tumoren eine tendenziell höhere Teilungsrate zeigten [229]. Dies ließe sich über Ergebnisse erklären, wonach HPV-16 über eine hochregulierte Expression von miR-20a zu einer geringeren Teilungs- und Metastasierungsrate im oralen Plattenepithelkarzinom führt [230]. Wenngleich sich eine Vielzahl von Studien mit dem Einfluss einer p16^{INK4a}/HPV- oder Mib-Positivität auf das Overall Survival bzw. den Nutzen als Surrogatmarker beschäftigen, fehlen im Regelfall Angaben zur Korrelation untereinander. Eine erneute Aufarbeitung der vorhandenen Daten unter dem Aspekt der Proliferationsrate p16^{INK4a}-/HPV-positiver und -negativer Tumoren würde eine fundierte Einordnung der hier erhobenen Daten ermöglichen.

4.4. Assoziation von p16^{INK4a}-Positivität und HPV-DNA-Nachweis

Die in Kapitel 1.2.4. „Einfluss auf die Malignomentstehung“ dargestellten HPV-induzierten Veränderungen des Zellzyklus legen die Nutzung einer p16-Positivität als Surrogatmarker einer HPV-Infektion nahe. Insbesondere für oropharyngeale Tumoren konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden, wenngleich weitere Verfahren, insbesondere der Nachweis viraler Bestandteile mittels PCR, empfohlen werden [176, 177, 183].

Für orale Karzinome findet sich vornehmlich kritische Literatur. In dem hier untersuchten Kollektiv zeigte sich ein HPV-Nachweis in 6 von 15 p16^{INK4a}-positiven Tumoren, was einem positiven prädiktiven Wert von 0,4 entspricht. Dies gleicht anderen publizierten Werten [198]. Im nationalen Vergleich beschreibt eine Studie von Götz et al. den Nachweis einer p16^{INK4a}-Positivität in 5,94% der oralen Plattenepithelkarzinome. Hiervon zeigte sich lediglich ein Drittel positiv für HPV [231]. Reuschenbach et al. stellte eine signifikante Korrelation zwischen diffuser p16^{INK4a}-Positivität und dem Nachweis einer HPV-DNA heraus, konstatiert aber insbesondere falsch positive Ergebnisse und hinterfragt die PCR als Nachweismethodik der Wahl [219].

Aufgrund des ähnlichen Studiendesigns mit gleicher Definition einer p16^{INK4a}-Positivität und PCR der p16^{INK4a}-positiven Schnitte sei weiterhin auf eine aktuelle Publikation von Ni et al. verwiesen. Hier gelang der HPV-Nachweis in lediglich einem von 23 p16^{INK4a}-positiven Tumoren [210]. Andere Autor:innen konstatieren Nachweisraten von HPV in p16^{INK4a}-positiven Tumoren von 46% und 48,4% [175, 211].

Insgesamt genügt der Nachweis von HPV-DNA nach aktueller Meinung lediglich zur Feststellung einer HPV-Assoziation, wobei der Anteil tatsächlich HPV bedingter Tumoren („HPV-Driven“) noch niedriger sein mag. Zusätzliche Untersuchungen bezüglich des Nachweises viraler Proteine verschaffen in diesem Aspekt Abhilfe. So finden sich in der Literatur mitunter Nachweisraten der viralen Onkogene von lediglich ca. 6%

in HPV-DNA-positiven Tumoren [198], was eine geringe onkogene Aktivität des HPV in oralen Tumoren impliziert [188].

In Anbetracht der Heterogenität einer Definition von p16^{INK4a}-positiven Tumoren und verschiedenen Methoden des Nachweises einer HPV-Infektion ist eine Vergleichbarkeit der Studien mitunter schwierig. Insgesamt zeigen sich für das orale Plattenepithelkarzinom aber unzureichende Nachweismethoden von HPV in p16^{INK4a}-positiven Tumoren. Die Nutzung des immunhistochemischen Nachweises von p16^{INK4a} als Surrogatmarker einer HPV-Infektion im oralen Plattenepithelkarzinom sollte somit zumindest hinterfragt werden [211]. Es scheint als wären p16^{INK4a}-Erhöhungen beim oralen Plattenepithelkarzinom auf andere pathophysiologische Vorgänge zurückzuführen, was sich mit Ergebnissen anderer Publikationen deckt [232].

Bezüglich der Untersuchung klinischer Parameter zeigte sich eine starke Korrelation zwischen dem HPV-Status p16^{INK4a}-positiver Tumoren und der Knocheninfiltration. So zeigten p16+/HPV+ Tumoren signifikant häufiger eine Knocheninfiltration als p16+/HPV- Tumoren. Auch wenn es sich hierbei per se um eine prognostisch negative Auswirkung handelt, scheint sich dieser Aspekt nicht auf das Overall Survival oder rezidivfreie Survival auszuwirken. Vergleichbare Ergebnisse lassen sich in der Literatur nicht finden. Inwiefern es sich hierbei um reproduzierbare Ergebnisse handelt, bleibt somit fraglich. Ebenso scheinen pathophysiologische kausale Erklärungsansätze, aufgrund der Komplexität der zellulären Veränderungen, rein spekulativ.

Im durchschnittlichen Alter bei Erstdiagnose und Operation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den p16+/HPV+ und p16+/HPV- Tumoren. Führt man die Analysen hingegen für das kategorisierte Alter durch, zeigen sich signifikante Korrelationen. Es imponieren Unterschiede mit einer Häufung p16+/HPV+ Tumoren im Kollektiv des Alters zwischen 50 und 69 Jahren. Kein/keine Patient:in mit einem p16+/HPV+ Tumor war bei Erstdiagnose älter als 69 Jahren.

Eine Häufung von high-risk HPV-Subtypen in jungen Patient:innen wurde bereits publiziert [233]. Hier zeigten sich signifikant häufiger Nachweismethoden von HPV16 in Patient:innen unter 40 Jahren im Vergleich zum Kontrollkollektiv über 50 Jahren [233]. Einige Autor:innen schlussfolgern eine HPV-Infektion als unabhängigen Risikofaktor der Karzinomgenese in jungen Erkrankten bei Abwesenheit der klassischen Risikofaktoren, respektive Tabak- und Alkoholkonsum [229, 234]. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen gelang in dem hier vorliegenden Kollektiv kein Nachweis von p16+/HPV+ Tumoren bei Erkrankten unter 50 Jahren. Da auf eine PCR-Testung des Gesamtkollektivs verzichtet wurde, bleibt eine vollumfängliche Vergleichbarkeit aus, wenngleich eine konkordante Tendenz mit Häufung in einem eher jüngeren Alter zu beobachten ist. Signifikante Unterschiede in den klassischen Risikofaktoren konnten zwischen p16+/HPV+ und p16+/HPV- Tumoren nicht gezeigt werden.

Tabelle 15: Vergleich der p16- und HPV-Positivität in oralen Plattenepithelkarzinomen sowie Schlussfolgerungen zur Nutzung von p16 als Surrogatmarker einer HPV-Infektion. (vorab publiziert in [221])

Erstautor:in [Publikation]	Jahr	ST	n	HPV- Nachweis	HPV+ Tumoren	p16+ Tumoren	HPV+/ p16+	p16 als SM
Mulder et al. [235]	2021	P	95	mRNA ISH	1/95	4/95	1/4 (25%)	nein
		RA		DNA PCR	(1,1%)	(4,2%)		
Tokuzen et al. [236]	2021	RA	100	mRNA RT- PCR DNA PCR	3/100 (3%)	10/100 (10%)	3/10 (30%)	nein
Blatt et al. [237]	2021	-	107	DNA PCR	9/107 (8,4%)	17/107 (15,9%)	9/17 (53%)	nein
Nauta et al. [211]	2021	RA	940	DNA PCR mRNA RT- PCR	21/940 (2,2%)	46/580	21/46 (45,7%)	k.A.
Nopmaneepaisarn et al. [238]	2019	RA	260	DNA PCR	4/260 (1,5%)	9/260 (3%)	4/9 (44,4%)	nein
Hernandez et al. [209]	2019	RA	122	DNA PCR mRNA RT- PCR	38/122 (31%)	36/122 (30%)	9/36 (25%)	nein
Ni et al. [210]	2019	RA	147	DNA PCR	-	7/147 (4,8%)	1/7 (14,3%)	nein
Götz et al. [231]	2016	RA	202	DNA PCR	7/202 (3,47%)	12/202 (5,9%)	4/12 (33,3%)	nein

Legende Tabelle 15: n=Anzahl, HPV=humanes Papillomavirus, „HPV+/p16+“= HPV-positive Tumoren zu p16^{INK4a}-positive Tumoren, (RT-)PCR= (real time) Polymerasekettenreaktion, ISH = in situ Hybridisierung, „p16 als SM“ = p16^{INK4a} als Surrogatmarker einer HPV-Infektion nutzbar, k.a. = keine Angabe

Anmerkung Tabelle 15: Vergleichende Auflistung von Studien, die Nachweisraten von HPV in p16^{INK4a}-positiven Tumoren untersuchen. Zusammenfassend konstatieren die meisten Studien einen fehlenden Zusammenhang zwischen HPV-Positivität und p16^{INK4a}-Positivität in oralen Plattenepithelkarzinomen. Eine Nutzung von p16^{INK4a} als Surrogatmarker einer HPV-Infektion wird größtenteils abgelehnt.

4.5. Prognose

4.5.1. Prognose des Gesamtkollektivs

Das hier untersuchte Gesamtkollektiv zeigte ein 5-Jahres-Überleben von ca. 56%, was den publizierten Werten anderer Autor:innen entspricht [239, 240]. Die Überlebensrate hängt hierbei maßgeblich von Faktoren wie dem Stadium bei Erstdiagnose und der Lokalisation ab. So zeigte Brandizzi et al. insbesondere bei Tumoren der Zunge und des Mundbodens eine schlechte Prognose, wobei die insgesamt

schlechte 5-Jahres-Überlebensrate von 37% im Gesamtkollektiv aufgrund der fortgeschrittenen Stadien bei Erstdiagnose zu nennen bleibt [49]. Das Robert Koch-Institut gibt eine absolute 5-Jahres Überlebensrate von 55% für Frauen und 46% für Männer an [241].

4.5.2. Einfluss der relativen p16^{INK4a}-Positivität auf das Überleben

Die durchgeführte Analyse der p16^{INK4a}-positiven Tumoren erbrachte eine nicht signifikante Differenz der durchschnittlichen Überlebenszeit von 5,4 Monaten im Vergleich zu den p16^{INK4a}-negativen Tumoren. Die Interpretation lässt in Anbetracht der vergleichsweisen hohen Fallzahlen den Rückschluss eines am ehesten fehlenden Einflusses vermuten, wenngleich dies ohne adäquate Äquivalenztestung nicht zweifelsfrei angenommen werden kann.

Ein positiver Zusammenhang zwischen der relativen Rate an p16^{INK4a}-positiven Tumorzellen sowie dem Überleben bei oropharyngealen Tumoren wurde häufig publiziert und gilt mitunter als stärkster Prognosefaktor [199, 204, 205]. Diese Daten scheinen aber nicht direkt auf das orale Plattenepithelkarzinom übertragbar zu sein.

Zum oralen Plattenepithelkarzinom findet sich ein heterogenes Bild, wobei die meisten Autor:innen einen fehlenden Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Positivität und Overall Survival postulieren [201, 202, 206]. Gefundene Unterschiede erbrachten keine statistische Signifikanz, was häufig mit einer geringen Fallzahl begründet wurde, weshalb sich regelhaft die Empfehlung zu größeren Fallzahlen finden lässt [201, 204].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen stützen sich auf ein Kollektiv von 339 auf den p16^{INK4a}-Status untersuchten Tumoren, was einem Vielfachen der Fallzahlen anderer Autor:innen entspricht. Auch in diesem großen Patient:innenkollektiv lassen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Es bleibt darauf zu verweisen, dass sich in dieser vollumfänglichen Stichprobe lediglich 23 (6,8%) p16^{INK4a}-positive Tumoren finden lassen. Die große Diskrepanz zwischen positiven und negativen Tumoren mag zu einer fehlenden Signifikanz der gefundenen Unterschiede beitragen. In einer noch größeren Studienpopulation wären signifikante Unterschiede denkbar. Inwiefern diese dann aber eine tatsächliche klinische, gesamtsoziologische bzw. gesundheitsökonomische Relevanz besäßen, bleibt spekulativ.

Insgesamt erschweren verschiedene Definitionen der p16^{INK4a}-Positivität eine vollumfängliche Vergleichbarkeit [176]. Die in dieser Arbeit genutzte Definition eines relativen Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen von über 70% stützt sich auf die am häufigsten publizierte Begriffserklärung [176]. Andere Cut-off Werte werden aber ebenfalls frequent diskutiert [176]. Die daraus folgenden verschiedenen Definitionen bringen eine zusätzliche Heterogenität in die Studienlage. Eine Vereinheitlichung mit folgender Zusammenführung aller verfügbaren Daten wäre wünschenswert.

Publikationen mit zum Teil konträren Ergebnissen lassen sich vereinzelt finden. Ghantous et al. beschreiben beispielweise einen positiven Einfluss der p16^{INK4a}-Positivität auf das Overall Survival bei

oralen Plattenepithelkarzinomen innerhalb einer Population des nördlichen Israels [207]. Bemerkenswert ist hierbei der hohe Anteil an HPV- bzw. p16^{INK4a}-positiven Tumoren von 45% [207]. Im Gegensatz dazu postulieren Wang et al. einen nicht signifikanten negativen Einfluss der p16^{INK4a}-Positivität auf das Overall Survival [204]. Inwiefern es sich bei diesen Ergebnissen um reproduzierbare bzw. ganzheitlich geltende Rückschlüsse handelt, bleibt in Anbetracht des Umfangs anderer Studien, die einen fehlenden Einfluss konstatieren, fraglich. Insgesamt bleibt eine potenziell fehlende Vergleichbarkeit aufgrund globaler Disparitäten und verschiedener kulturell-genetischer Aspekte zu nennen, was eine Übertragbarkeit von Daten erschwert.

Im Rahmen der Analyse von Untergruppen zeigte sich ein signifikanter positiver Einfluss einer p16^{INK4a}-Positivität >25% auf das Overall Survival von Patient:innen mit adjuvanter Therapie - ein Zusammenhang, der für das oropharyngeale Karzinom bereits häufig beschrieben wurde [206]. Dies wird vor allem auf eine erhöhte Radiosensitivität bei p16^{INK4a}-positiven Tumoren zurückgeführt [242]. In Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom wurde bereits von Satgunaseelan et al. ein positiver Einfluss der p16^{INK4a}-Positivität bei adjuvanter Therapie auf das Overall Survival und rezidivfreie Überleben gezeigt. Manche Autor:innen empfehlen eine radikale Adjuvanz bei HPV-16 Nachweis in fortgeschrittenen oralen Karzinomen [214].

Nach der aktuellen S3-Leitlinie des oralen Mundhöhlenkarzinoms soll im Rahmen der Therapie nicht zwischen HPV-positiven/p16^{INK4a}-positiven Tumoren und den Nikotin-/Alkoholassozierten Tumoren unterschieden werden. Die vorliegenden Daten sollten diese dichotome Aussage zumindest hinterfragen. Die Implementierung einer Adjuvanz im Falle einer p16^{INK4a}-Positivität sollte nach weiteren, im Idealfall prospektiven, multizentrischen Studien erneut eruiert werden.

4.5.3. Einfluss der relativen Mib-Positivität auf das Überleben

In den kategorisierten Mib-Werten über das Gesamtkollektiv konnte kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf das Overall Survival oder das rezidivfreie Überleben ermittelt werden.

Dies widerspricht einem Teil der aktuellen Literatur. So konnte eine Metaanalyse mit 27 inkludierten Studien einen schlechten prognostischen Einfluss der Mib-Positivität im oralen Plattenepithelkarzinom sowohl auf das Overall Survival als auch das rezidivfreie Überleben zeigen [64]. Die ermittelten Cut-off Werte der einzelnen Studien variierten hierbei von 10% bis 65%, wobei sich insbesondere in asiatischen Populationen höherer Teilungsraten finden lassen [64]. Der Vergleich zu anderen Tumorentitäten stützt den grundsätzlichen und intuitiven Gedankenansatz, dass eine hohe Teilungsrate einen prognostisch schlechten Einfluss besitzt, wenngleich sich dies in dem hier untersuchten Gesamtkollektiv nicht zeigen ließ.

Im Kollektiv der Patient:innen mit einer kategorisierten Teilungsrate vom 0-10% zeigte sich eine Überlegenheit der operativen Versorgung ohne anschließende Adjuvanz gegenüber allen anderen Therapieformen (Operation mit Adjuvanz, primäre Radio(chemo)therapie, Chemotherapie).

Bezogen auf den Cut-off von 21% zeigte sich ein positiver Einfluss hoher Teilungsraten bei Patient:innen unter Radiochemotherapie auf das Overall Survival.

In einem vereinfachten Modell richtet sich die systemische Therapie aufgrund verschiedener molekularer Ansätze gegen proliferierende Zellen. Eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von Tumoren mit hohen Teilungsraten unter einer systemischen Therapie erscheint somit plausibel. Bezogen auf das orale Plattenepithelkarzinom finden sich einige Studien, die einen signifikant positiven Einfluss hoher Teilungsraten auf das Ansprechen einer adjuvanten/systemischen Therapie beschreiben, weshalb die Mib-Expression als möglicher Faktor des Ansprechens einer systemischen Therapie diskutiert wird [64]. Im Gegensatz hierzu scheinen Tumoren mit niedrigen Teilungsraten nicht von einer systemischen Adjuvanz zu profitieren.

Ein grundsätzlicher Kritikpunkt in der Beurteilung bzw. der Zusammenführung von Studien bezüglich des oralen Plattenepithelkarzinoms sind kleine Kollektive sowie eine Heterogenität in puncto Ethnie und Anfärbungsmethodik [64], was allgemeingültige Aussagen erschwert. Das hier untersuchte umfängliche Kollektiv unter Nutzung einer einheitlichen Färbungs- und Auswertungsmethode erlaubt die mögliche Empfehlung zur Implementierung der Mib-Expression als Marker des erwartbaren Therapieerfolges einer systemischen Therapie bei Patient:innen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom.

4.5.4. Einfluss der kombinierten p16^{INK4a}- und Mib-Positivität auf das Überleben

Im Kollektiv p16^{INK4a}-positiver Tumoren mit einer geringen Teilungsrate (p16+/Mib-) zeigte sich ein signifikant positiver Einfluss auf des Overall Survival im Vergleich zu p16^{INK4a}-negativen Tumoren mit einer geringen Teilungsrate (p16-/Mib-). Auch im Vergleich von p16+/Mib- Tumoren zu p16-positiven Tumoren mit einer hohen Teilungsrate (p16+/Mib+) fand sich eine Überlegenheit der Gruppe mit einer niedrigen Teilungsrate sowohl bezogen auf das Overall Survival als auch auf das rezidivfreie Überleben.

Eine mögliche Erklärung dieses Zusammenhangs ergibt sich aus der in Kapitel 1.2.4. „Einfluss auf die Malignomentstehung“ dargestellten physiologischen Regulationen des Zellzyklus. So führt eine vermehrte Expression von p16^{INK4a} zu einem Zellzyklusarrest und folglich zu niedrigeren Teilungsraten, was sich als Ausdruck einer wenigstens teilweise erhaltenden Zellzykluskontrolle in einer besseren Prognose der p16+/Mib- Tumoren ausdrücken könnte [219].

Bei hohen Teilungsraten scheint der Effekt konträr. Hier zeigt sich eine negative Tendenz bei p16^{INK4a}-positiven Tumoren (p16+/Mib+) auf das Overall Survival ohne statistische Signifikanz. Führt man diese

Analyse bei Cut-off Werten von 25% für den relativen Anteil p16^{INK4a}-positiver Tumorzellen durch, wird der ermittelte Unterschied statistisch signifikant.

Nach der bereits geschilderten Hypothese wäre eine hohe Teilungsrate trotz einer vermehrten Expression von p16^{INK4a} als Ausdruck einer gestörten Zellzyklusregulation zu werten und könnte die schlechtere Prognose der p16+/Mib+ Tumoren somit erklären. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz könnte der HPV-Status sein. In dem untersuchten Kollektiv konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen p16^{INK4a}-positiven Tumoren in Hinblick auf den Nachweis von HPV-DNA gezeigt werden, was dieser These stark widerspricht.

Wenngleich bereits eine Simultanfärbung von p16^{INK4a} und Ki-67 in einer Publikation von Reuschenbach et al. im oralen Plattenepithelkarzinom mit einer Tendenz zu einem verbesserten Überleben p16+/Mib-Tumoren beschrieben wurde [219], finden sich in der aktuellen Literatur keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Eine Assoziation zu humanen Papillomaviren konnte nicht gezeigt werden [219]. Auch im Vergleich zu dieser Studie bleibt auf verschiedene Definitionen einer p16^{INK4a}- oder Mib-Positivität zu verweisen, die vergleichende Analysen deutlich erschweren. In Bezug auf die Diagnostik von intraepithelialen Läsionen der Zervix finden sich eine Reihe von Studien, die sich die simultane Expression von p16^{INK4a} und Mib/Ki-67 innerhalb einer Zelle (sogenanntes „Dualstaining“) zunutze machen [216, 217]. So zeigt sich eine verbesserte Früherkennung des Zervixkarzinoms im Vergleich zu der alleinigen p16^{INK4a}-Färbung [216, 217].

In einem kleinen Kollektiv von 36 Patient:innen mit oraler submuköser Fibrose konnten Bazarsad et al. zeigen, dass die kombinierte Bewertung von p16 und Mib einen Prädiktor für eine maligne Transformation darstellt [218]. Die konkrete Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere Arbeiten ist bei den individuell gesetzten Grenzwerten von 5% für die p16- bzw. 8% für die Mib-Positivität stark erschwert [218].

Der Fakt, dass sich eine p16^{INK4a}-Positivität in Bezug auf die Teilungsrate konträr auf das Overall Survival auszuwirken scheint, mag eine Erklärung für den vorherrschend fehlenden Einfluss einer p16^{INK4a}-Positivität in der Literatur liefern.

Zusammenfassend suggerieren die hier vorliegenden Daten, dass eine p16^{INK4a}-Positivität nicht singulär, sondern stets in Relation zur Teilungsrate bewertet werden sollte. Die vorgestellten Ergebnisse sowie Erklärungsansätze verstehen sich als Hypothesen und bedürfen weiterführender Untersuchungen auch in Hinblick auf weitere Zellzyklusproteine, um eine definitive Aussage ermöglichen zu können.

4.5.5. Einfluss der kombinierten p16^{INK4a}-/Mib-Positivität und der Therapieform

Im Kollektiv der Patient:innen mit einer operativen Versorgung ohne anschließende Adjuvantz zeigte sich eine Unterlegenheit der p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit hoher Teilungsrate (p16+/Mib+) gegenüber allen anderen Entitäten sowie zusätzlich eine Überlegenheit der p16^{INK4a}-positiven Tumoren mit niedriger

Teilungsrate (p16+/Mib-) gegenüber den p16^{INK4a}-negativen Tumoren mit einer hohen Teilungsrate (p16-/Mib+). Diese Unterschiede scheinen sich bei anschließender Adjuvanz oder einer primären systemischen Therapie zu egalieren, was dafürspricht, dass Tumoren mit einer hohen Teilungsrate unabhängig vom p16^{INK4a}-Status von einer systemischen Therapie profitieren.

In den vorherigen Kapiteln wurde die prognostische Bedeutung der kombinierten Bewertung des p16^{INK4a}- und Mib-Status auf das Überleben erörtert. Der Zusammenhang zwischen hoher Teilungsrate und positivem Ansprechen auf eine systemische Therapie ist Gegenstand diverser Studien erörtert und gilt mitunter als stärkster Prognosefaktor (s. hierzu auch Kapitel 4.5.3. „Einfluss der relativen Mib-Positivität auf das Überleben“). Die kombinierte Betrachtung dieser Aspekte mag eine mögliche Erklärung für die schlechteren Überlebensraten bei Tumoren mit hoher Teilungsrate liefern.

Da sich aktuell keine anderen Studien finden lassen, die sich mit diesem Einfluss beschäftigen und quantitative Erörterungen aufgrund der Zensierung nicht möglich sind, bleibt auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu verweisen.

4.5.6. Einfluss des HPV-Status bei p16^{INK4a}-positiven Tumoren

In Kapitel 4.4. „Assoziation von p16^{INK4a}-Positivität und HPV-DNA-Nachweis“ wurde bereits der unzureichende Nutzen der p16^{INK4a}-Färbung als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion im oralen Plattenepithelkarzinom diskutiert. Diese Tatsache legt nahe, dass es sich bei p16^{INK4a}-positiven und HPV-positiven Tumoren prinzipiell um zwei differente Tumorentitäten handelt, die sich lediglich in einer geringen Schnittmenge vereinen. Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Untersuchung der Prognose unterteilt nach p16^{INK4a}-positiven/HPV-positiven Tumoren (p16+/HPV+) sowie p16^{INK4a}-positiven/HPV-negativen Tumoren (p16+/HPV-). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Overall Survival oder rezidivfreien Überleben, wenngleich bessere Tendenzen im Kollektiv der p16+/HPV- Tumoren ersichtlich sind.

Für die Gesamtheit von Kopf-Hals-Tumoren gilt ein positiver prognostischer Einfluss des humanen Papillomavirus als erwiesen [199, 200]. Insbesondere in oropharyngealen Tumoren zeigt sich ein verbessertes Überleben bei HPV-Infektion [199], wenngleich diese Ergebnisse scheinbar nicht auf das orale Plattenepithelkarzinom übertragbar sind.

Ein Großteil an Studien postuliert einen fehlenden Einfluss einer HPV-Infektion auf die Prognose des oralen Plattenepithelkarzinom [203, 209, 211]. Exemplarisch zeigten Blahak et al. in einem Kollektiv von 78 Patient:innen mit einem oralen Plattenepithelkarzinom einen fehlenden Einfluss des Nachweises von HPV-DNA auf das Overall Survival und die Time to Progression [201]. In einem größeren Kollektiv von 153 Patient:innen unterstützen Palve et al. den am ehesten fehlenden Einfluss einer HPV-Infektion auf das Gesamtüberleben [202].

Dem gegenüber stehen vereinzelte Studien, die eine Beeinflussung des Überlebens in Abhängigkeit des HPV-Status zeigen. Duray et al. postulieren in einem Kollektiv von 147 Patient:innen einen prognostisch negativen Einfluss bei Nachweis von high-risk HPV-Subtypen [212]. In der Bewertung dieser Studie fällt eine enorm hohe Prävalenz von HPV-positiven Tumoren auf (46% high-risk, 24% low-risk) [212]. Diese Ergebnisse werden in einer Publikation von Lee et al. gestützt. Hier fand sich eine schlechtere Prognose (Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben) der HPV-positiven Tumoren bei zusätzlich erhöhtem Metastasierungsrisiko [214]. Aufgrund des Kollektivs mit lediglich lokal fortgeschrittenen Tumoren (UICC III/IV) und einer hohen Prävalenz von HPV (22%) ist eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse erschwert. Eine Studie von Elango et al. konnte hingegen einen positiven Einfluss einer HPV-Infektion auf das Zungenkarzinom (n=60) zeigen [213]. Es fanden sich besser differenzierte Tumoren in der Gruppe mit einer HPV-Infektion sowie eine geringere Rezidivrate [213]. Auch in dieser Studie ist eine hohe Prävalenz HPV-positiver Tumoren von 48% zu konstatieren.

Insgesamt zählt die Bewertung der Rolle einer HPV-Infektion im oralen Plattenepithelkarzinom zu einem der kontrovers diskutierten Themen, wenngleich die meisten Autor:innen einen fehlenden Einfluss postulieren. Aufgrund enormer globaler Disparitäten und den mitunter heterogenen Patient:innenkollektiven ist eine zusammenführende Beurteilung stark erschwert.

4.5.7. Einfluss des kombinierten HPV/p16^{INK4a}- und Mib-Status auf das Überleben

Zur besseren Übersichtlichkeit wird im Folgenden lediglich von einer HPV-Positivität (HPV+) gesprochen, wenngleich lediglich die p16^{INK4a}-positiven Tumoren auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht wurden.

In dem untersuchten Kollektiv zeigten sich deutliche Unterschiede in der durchschnittlichen Überlebenszeit ohne statistische Signifikanz, wobei insbesondere die HPV-positiven Tumoren mit einer hohen Teilungsrate (HPV+/Mib+) die kompromittierteste Prognose (ca. 23,1 Monate) zeigten und die HPV-positiven Tumoren mit einer niedrigen Teilungsrate (HPV+/Mib-) die längste durchschnittliche Überlebenszeit (ca. 96,6 Monate) aufwiesen. Es fällt auf, dass die Subgruppen mit niedrigen Teilungsraten unabhängig vom HPV-Status eine bessere Prognose aufweisen als die Subgruppen mit einer hohen Teilungsrate. Der Einfluss des kategorisierten Mib-Status zeigte in der Cox-Regression einen deutlich höheren Einfluss als der HPV-Status ohne statistische Signifikanz. In Zusammenschau liegt die Vermutung nahe, dass der HPV-Status in Bezug auf die Prognose von einer untergeordneten Rolle ist.

Eine kombinierte Bewertung des HPV-Status und Mib-Status wurde bereits in der Literatur beschrieben. In einer Studie von Wensveen et al. konnte mittels kombinierter Testung von HPV und Mib gezeigt werden, dass hohe Teilungsraten bei Patientinnen mit HPV-positiven Zervixläsionen ein Prädiktor für das Vorhandensein einer intraepithelialen zervikalen Läsion sind [243]. Im Umkehrschluss scheinen niedrige

Teilungsraten (<35%) gegen höhergradige Veränderungen zu sprechen [243]. Eine Analyse der Überlebenszeit wurde hier nicht durchgeführt. Dennoch sprechen die Ergebnisse für die Notwendigkeit einer kombinierten Bewertung von HPV- und Mib-Status.

4.6. Stärken und Limitationen

Die hier vorliegenden Daten stützen sich auf ein umfangreiches Kollektiv, das sich insbesondere im Vergleich zu anderen Studien bezüglich des oralen Plattenepithelkarzinoms auszeichnet. Der häufig publizierten Limitation von zu geringen Fallzahlen wurde somit entgegengewirkt, was fundierte Aussagen ermöglicht. In Bezug auf die Lokalisation wurde akribisch zwischen oralen und oropharyngealen Tumoren diskriminiert.

Es erfolgte die dezidierte Auswertung einer Vielzahl von Primärtumoren in Bezug auf die p16- und die korrespondierende Mib-Positivität, was einen direkten Rückschluss auf die Korrelation beider Parameter bezogen auf ein Präparat erlaubt. Gleiches gilt für den Nachweis einer HPV-Assoziation.

In diesem vollumfänglichen Kollektiv zeigte sich eine geringe Rate an p16^{INK4a}-positiven Tumoren, was sich zwar mit der aktuellen Literatur deckt, eine statistische Auswertung in Anbetracht der Asymmetrie und der geringen Anzahl erschwert.

Prognosestudien bergen aufgrund vieler Testungen das Risiko falsch signifikanter Ergebnisse, was mitunter als „Problem des multiplen Testens“ beschrieben wird. Diesem lässt sich anhand verschiedener Möglichkeiten begegnen, was das Grundproblem aber nur bedingt beeinflussen kann. Da auf die Festlegung eines globalen Signifikanzniveaus verzichtet wurde, verstehen sich die hier vorliegenden Ergebnisse als Tendenzen, die es mittels prospektiver Studien zu belegen gilt.

Eine Untersuchung auf HPV-DNA erfolgte lediglich im Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven Tumoren, was Rückschlüsse auf den positiv prädiktiven Wert erlaubt, eine Berechnung anderer Gütekriterien diagnostischer Tests (Sensitivität, Spezifität, negativ prädiktiver Wert) aber nicht zulässt.

Anders als für eine p16^{INK4a}-Positivität gibt es keinen allgemeingültigen Grenzwert für eine Mib-Positivität, der zwischen hohen oder geringen Teilungsraten differenziert. Dies zeigt sich in dem heterogenen Bild publizierter Studien. Somit ist eine Vergleichbarkeit der hier vorliegenden Daten technisch nur deskriptiv möglich. Eine mathematische Herleitung anhand dieses einen Kollektiv verbietet sich, weshalb hier gesetzte Grenzwerte mit Hilfe weiterführender Studien verifiziert werden sollten. Eine deskriptive Grundaussage wird aber dennoch ermöglicht.

Der Einfluss verschiedener Ethnien auf das biologische Verhalten von oralen Plattenepithelkarzinomen ist in der Literatur weithin publiziert. Wenngleich von einer vorwiegend kaukasischen/mittleuropäischen Ethnie auszugehen ist, kann diese nicht per se für alle Patient:innen vorausgesetzt werden. Somit ist eine Vergleichbarkeit bzw. Übertragbarkeit zu anderen publizierten globalen Daten nur bedingt möglich.

Weiterhin wurde aufgrund des Einschlusszeitraums eine Einteilung nach der 7. Edition der TNM-Klassifikation gewählt. Eine Re-Klassifizierung ist retrospektiv nicht abschließend möglich.

Aufgrund der Anzahl an inkludierten Tumoren erfolgte die Aufarbeitung der histologischen Präparate mittels Tissue-Micro-Arrays. Diese Methodik ist weit verbreitet, birgt aber das Risiko einer Fehleinschätzung bei Rückschlüssen auf den gesamten Tumor. Diesem Problem wurde mittels mehrerer Präparate ausladender Tumoren begegnet. Auch wenn dieses Vorgehen Disparitäten in Tumoren mathematisch nivellieren kann, bleibt das Risiko einer möglichen Fehleinschätzung bestehen. Eine Aufarbeitung der gesamten Tumoren wäre wünschenswert, ist aber u.a. aufgrund rechtlicher Bestimmungen nicht allumfänglich möglich.

5. Zusammenfassung

Zielstellung dieser Arbeit war die Bestimmung des Anteils p16^{INK4a}-positiver Tumoren sowie die Untersuchung des Einflusses einer p16^{INK4a}-Positivität auf klinische Parameter des oralen Plattenepithelkarzinoms. Weiterhin wurden der Einfluss des Mib-Status (Teilungsrate) sowie die Kombination aus Teilungsrate und p16^{INK4a}-Positivität erörtert. Als Nebenfragestellung untersuchte diese Arbeit den Anteil HPV-positiver Tumoren im Kollektiv der p16^{INK4a}-positiven Tumoren.

In dem hier untersuchten Kollektiv zeigten weder der singuläre p16^{INK4a}- noch der Mib-Status einen Einfluss auf die Prognose des Gesamtkollektivs (Overall Survival bzw. rezidivfreies Überleben), wengleich grundlegende tumorbiologische Eigenschaften signifikante Unterschiede aufwiesen. So zeigte sich ein signifikanter Einfluss der p16^{INK4a}- wie auch Mib-Positivität bezüglich des Gradings.

In der univariaten Subgruppenanalyse schienen Patient:innen mit p16^{INK4a}-positiven Tumoren (Cut-off 25%) von einer Adjuvanz zu profitieren, wengleich dieser Sachverhalt weiterer Untersuchungen bedarf, um daraus therapierelevante Schlussfolgerungen zu ziehen.

Bezüglich des Mib-Status zeigte sich in der univariaten Analyse ein verbessertes Gesamtüberleben von Patient:innen unter Radio(chemo)therapie mit einem relativen Anteil Mib positiver Tumorzellen von über 21%, während Patient:innen mit einer kategorisierten Mib-Positivität von 0-10% von einer Operation ohne anschließende Adjuvanz profitierten. In Anbetracht der Heterogenität an publizierten Grenzwerten versteht sich dieser Sachverhalt als Tendenz.

Die Zusammenschau von p16^{INK4a}-Status und Mib-Positivität zeigte eine bessere Prognose von p16+/Mib- gegenüber allen anderen Tumoren, was als Ausdruck einer wenigstens teilweise erhaltenen Zellzyklusregulation interpretiert werden könnte. Diese kombinierte Bewertung findet sich in aktuellen Publikationen noch nicht und könnte eine Erklärung für die differente Beurteilung des singulären p16^{INK4a}-Status in der Literatur liefern.

Weitere Untersuchungen, insbesondere in Patient:innenkollektiven mit einer hohen Prävalenz p16^{INK4a}-positiver Tumoren sollten zur weiteren Einordnung dieses Sachverhaltes und möglichen therapeutischen Konsequenzen durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. El-Naggar, A.K., J.K.C. Chan, J. Rubin Grandis, T. Takata, P.J. Slootweg, and International Agency for Research on Cancer, *WHO classification of head and neck tumours*. World Health Organization classification of tumours, 4th edition. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 347 pages.
2. Scully, C. and J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma overview*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 301-8.
3. Kimple, A.J., C.M. Welch, J.P. Zevallos, and S.N. Patel, *Oral cavity squamous cell carcinoma--an overview*. *Oral Health Dent Manag*, 2014. **13**(3): p. 877-82.
4. McGuire, S., *World Cancer Report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr*, 2016. **7**(2): p. 418-9.
5. Warnakulasuriya, S., *Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival*. *Oral Oncol*, 2010. **46**(6): p. 407-10.
6. Petersen, P.E., *Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 454-60.
7. Sung, H., J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
8. Wild CP, W.E., Stewart BW, editors (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.
9. Petti, S., *Lifestyle risk factors for oral cancer*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 340-50.
10. Warnakulasuriya, S., *Causes of oral cancer--an appraisal of controversies*. *Br Dent J*, 2009. **207**(10): p. 471-5.
11. Blot, W.J., J.K. McLaughlin, D.M. Winn, D.F. Austin, R.S. Greenberg, S. Preston-Martin, L. Bernstein, J.B. Schoenberg, A. Stemhagen, and J.F. Fraumeni, Jr., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. *Cancer Res*, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
12. Negri, E., C. La Vecchia, S. Franceschi, and A. Tavani, *Attributable risk for oral cancer in northern Italy*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1993. **2**(3): p. 189-93.
13. Taylor, F.R., *Tobacco, Nicotine, and Headache*. *Headache*, 2015. **55**(7): p. 1028-44.
14. Wollscheid, K.A. and M.E. Kremzner, *Electronic cigarettes: safety concerns and regulatory issues*. *Am J Health Syst Pharm*, 2009. **66**(19): p. 1740-2.
15. Goniewicz, M.L., J. Knysak, M. Gawron, L. Kosmider, A. Sobczak, J. Kurek, A. Prokopowicz, M. Jablonska-Czapla, C. Rosik-Dulewska, C. Havel, P. Jacob, 3rd, and N. Benowitz, *Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes*. *Tob Control*, 2014. **23**(2): p. 133-9.
16. Guindon, G.E. and D. Boisclair, *Past, Current and Future Trends in Tobacco Use*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2003.
17. Kotz, D., M. Bockmann, and S. Kastaun, *The Use of Tobacco, E-Cigarettes, and Methods to Quit Smoking in Germany*. *Deutsches Arzteblatt International*, 2018. **115**(14): p. 235-+.
18. Collaborators, G.B.D.R.F., *Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. *Lancet*, 2016. **388**(10053): p. 1659-1724.

19. Fowles, J. and E. Dybing, *Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke*. *Tob Control*, 2003. **12**(4): p. 424-30.
20. Hashibe, M., P. Brennan, S. Benhamou, X. Castellsague, C. Chen, M.P. Curado, L. Dal Maso, A.W. Daudt, E. Fabianova, L. Fernandez, V. Wunsch-Filho, S. Franceschi, R.B. Hayes, R. Herrero, S. Koifman, C. La Vecchia, P. Lazarus, F. Levi, D. Mates, E. Matos, A. Menezes, J. Muscat, J. Eluf-Neto, A.F. Olshan, P. Rudnai, S.M. Schwartz, E. Smith, E.M. Sturgis, N. Szeszenia-Dabrowska, R. Talamini, Q. Wei, D.M. Winn, D. Zaridze, W. Zatonski, Z.F. Zhang, J. Berthiller, and P. Boffetta, *Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(10): p. 777-89.
21. Applebaum, K.M., C.S. Furniss, A. Zeka, M.R. Posner, J.F. Smith, J. Bryan, E.A. Eisen, E.S. Peters, M.D. McClean, and K.T. Kelsey, *Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(23): p. 1801-10.
22. Zhou, J., D.S. Michaud, S.M. Langevin, M.D. McClean, M. Eliot, and K.T. Kelsey, *Smokeless tobacco and risk of head and neck cancer: evidence from a case-control study in New England*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(8): p. 1911-7.
23. Khan, Z., S. Dreger, S.M.H. Shah, H. Pohlbeln, S. Khan, Z. Ullah, B. Rehman, and H. Zeeb, *Oral cancer via the bargain bin: The risk of oral cancer associated with a smokeless tobacco product (Naswar)*. *PLoS One*, 2017. **12**(7): p. e0180445.
24. World Health Organization. Department of Mental Health and Substance Abuse., *Global status report on alcohol 2004*. 2004, Geneva: World Health Organization, Dept. of Mental Health and Substance Abuse. 88 p.
25. Peacock, A., J. Leung, S. Larney, S. Colledge, M. Hickman, J. Rehm, G.A. Giovino, R. West, W. Hall, P. Griffiths, R. Ali, L. Gowing, J. Marsden, A.J. Ferrari, J. Grebely, M. Farrell, and L. Degenhardt, *Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report*. *Addiction*, 2018. **113**(10): p. 1905-1926.
26. Poschl, G. and H.K. Seitz, *Alcohol and cancer*. *Alcohol Alcohol*, 2004. **39**(3): p. 155-65.
27. Boffetta, P., M. Hashibe, C. La Vecchia, W. Zatonski, and J. Rehm, *The burden of cancer attributable to alcohol drinking*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(4): p. 884-7.
28. Secretan, B., K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, V. Cogliano, and W.H.O.I.A.f.R.o.C.M.W. Group, *A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(11): p. 1033-4.
29. Seitz, H.K. and F. Stickel, *Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(8): p. 599-612.
30. Schutze, M., H. Boeing, T. Pischon, J. Rehm, T. Kehoe, G. Gmel, A. Olsen, A.M. Tjonneland, C.C. Dahm, K. Overvad, F. Clavel-Chapelon, M.C. Boutron-Ruault, A. Trichopoulou, V. Benetou, D. Zylis, R. Kaaks, S. Rohrmann, D. Palli, F. Berrino, R. Tumino, P. Vineis, L. Rodriguez, A. Agudo, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, M.D. Chirlaque, A. Barricarte, P.H. Peeters, C.H. van Gils, K.T. Khaw, N. Wareham, N.E. Allen, T.J. Key, P. Boffetta, N. Slimani, M. Jenab, D. Romaguera, P.A. Wark, E. Riboli, and M.M. Bergmann, *Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study*. *BMJ*, 2011. **342**: p. d1584.
31. Room, R., T. Babor, and J. Rehm, *Alcohol and public health*. *Lancet*, 2005. **365**(9458): p. 519-30.
32. Zain, R.B., N. Ikeda, P.C. Gupta, S. Warnakulasuriya, C.W. van Wyk, P. Shrestha, and T. Axell, *Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits: consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-27, 1996*. *J Oral Pathol Med*, 1999. **28**(1): p. 1-4.
33. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization., and International Agency for Research on Cancer., *Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,. 2004, Lyon, France Geneva: IARC Press ; Distributed by IARC Press and the World Health Organization Marketing and Dissemination. x, 334 p.

34. Ko, Y.C., T.A. Chiang, S.J. Chang, and S.F. Hsieh, *Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors*. J Oral Pathol Med, 1992. **21**(6): p. 261-4.
35. Tang, J.G., X.F. Jian, M.L. Gao, T.Y. Ling, and K.H. Zhang, *Epidemiological survey of oral submucous fibrosis in Xiangtan City, Hunan Province, China*. Community Dent Oral Epidemiol, 1997. **25**(2): p. 177-80.
36. Gupta, P.C., M.B. Aghi, R.B. Bhonsle, P.R. Murti, F.S. Mehta, C.R. Mehta, and J.J. Pindborg, *An intervention study of tobacco chewing and smoking habits for primary prevention of oral cancer among 12,212 Indian villagers*. IARC Sci Publ, 1986(74): p. 307-18.
37. Daftary, D.K., R.B. Bhonsle, R.B. Murti, J.J. Pindborg, and F.S. Mehta, *An oral lichen planus-like lesion in Indian betel-tobacco chewers*. Scand J Dent Res, 1980. **88**(3): p. 244-9.
38. Shiu, M.N. and T.H. Chen, *Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer*. Eur J Cancer Prev, 2004. **13**(1): p. 39-45.
39. Thomas, S.J., C.J. Bain, D. Battistutta, A.R. Ness, D. Paissat, and R. MacLennan, *Betel quid not containing tobacco and oral cancer: a report on a case-control study in Papua New Guinea and a meta-analysis of current evidence*. Int J Cancer, 2007. **120**(6): p. 1318-23.
40. Zhang, L., Y. Liu, H.J. Zheng, and C.P. Zhang, *The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 476.
41. Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, and D. Sidransky, *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2488-92.
42. Secchi, D.G., L.R. Aballay, M.F. Galindez, D. Piccini, H. Lanfranchi, and M. Brunotto, *Red Meat, Micronutrients and Oral Squamous Cell Carcinoma of Argentine Adult Patients*. Nutr Hosp, 2015. **32**(3): p. 1214-21.
43. Secchi, D.G., L.R. Aballay, N. Shivappa, J.R. Hebert, M.F. Galindez Costa, and M. Brunotto, *The inflammatory potential of Argentinian diet and oral squamous cell carcinoma*. Nutr Hosp, 2019. **36**(6): p. 1361-1367.
44. Meurman, J.H., *Infectious and dietary risk factors of oral cancer*. Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 411-3.
45. Shah, A., A. Malik, A. Garg, M. Mair, S. Nair, and P. Chaturvedi, *Oral sex and human papilloma virus-related head and neck squamous cell cancer: a review of the literature*. Postgrad Med J, 2017. **93**(1105): p. 704-709.
46. Smith, E.M., J.M. Ritchie, K.F. Summersgill, J.P. Klusmann, J.H. Lee, D. Wang, T.H. Haugen, and L.P. Turek, *Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers*. Int J Cancer, 2004. **108**(5): p. 766-72.
47. Bouckaert M, M.T., Feller L, Lemmer J and Khammissa RAG, *The clinical characteristics of oral squamous cell carcinoma in patients attending the Medunsa Oral Health Centre, South Africa*. Integr Cancer Sci Therap, 2016. **3**(5): p. 575-578.
48. Bagan, J., G. Sarrion, and Y. Jimenez, *Oral cancer: clinical features*. Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 414-7.
49. Brandizzi, D., M. Gandolfo, M.L. Velazco, R.L. Cabrini, and H.E. Lanfranchi, *Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008. **13**(9): p. E544-8.
50. Mashberg, A. and A. Samit, *Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers*. CA Cancer J Clin, 1995. **45**(6): p. 328-51.
51. Wolff, K.D., M. Follmann, and A. Nast, *The diagnosis and treatment of oral cavity cancer*. Dtsch Arztebl Int, 2012. **109**(48): p. 829-35.
52. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0, 2021, AWMF Registernummer: 007/100OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (abgerufen am: 30.12.2022)*.

53. Hutter, R.V., *At last--worldwide agreement on the staging of cancer*. Arch Surg, 1987. **122**(11): p. 1235-9.
54. Brierley, J., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. ed. 2017, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. p.
55. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2017. **18**(7): p. 40.
56. Mucke, T., A. Kanatas, L.M. Ritschl, S. Koerdt, A. Tannapfel, K.D. Wolff, D. Loeffelbein, and M. Kesting, *Tumor thickness and risk of lymph node metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue*. Oral Oncol, 2016. **53**: p. 80-4.
57. Pinto, F.R., L.L. de Matos, F.C. Palermo, M.A. Kulcsar, B.G. Cavalheiro, E.S. de Mello, V.A. Alves, C.R. Cernea, and L.G. Brandao, *Tumor thickness as an independent risk factor of early recurrence in oral cavity squamous cell carcinoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014. **271**(6): p. 1747-54.
58. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, and International Union against Cancer., *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. 2010, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. xx, 309 p.
59. Jadhav, K.B. and N. Gupta, *Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise*. N Am J Med Sci, 2013. **5**(12): p. 671-9.
60. Suresh, G.M., R. Koppad, B.V. Prakash, K.S. Sabitha, and P.S. Dhara, *Prognostic Indicators of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Ann Maxillofac Surg, 2019. **9**(2): p. 364-370.
61. van Diest, P.J., G. Brugal, and J.P. Baak, *Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value*. J Clin Pathol, 1998. **51**(10): p. 716-24.
62. Fonatsch, C., M. Duchrow, H. Rieder, C. Schluter, and J. Gerdes, *Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter*. Genomics, 1991. **11**(2): p. 476-7.
63. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
64. Xie, S., Y. Liu, X. Qiao, R.X. Hua, K. Wang, X.F. Shan, and Z.G. Cai, *What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma?* J Cancer, 2016. **7**(7): p. 758-67.
65. Bzhalava, D., C. Eklund, and J. Dillner, *International standardization and classification of human papillomavirus types*. Virology, 2015. **476**: p. 341-344.
66. Bravo, I.G., S. de Sanjose, and M. Gottschling, *The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses*. Trends Microbiol, 2010. **18**(10): p. 432-8.
67. Brianti, P., E. De Flammineis, and S.R. Mercuri, *Review of HPV-related diseases and cancers*. New Microbiol, 2017. **40**(2): p. 80-85.
68. Harari, A., Z. Chen, and R.D. Burk, *Human papillomavirus genomics: past, present and future*. Curr Probl Dermatol, 2014. **45**: p. 1-18.
69. de Villiers, E.M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, and H. zur Hausen, *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
70. Bernard, H.U., R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, and E.M. de Villiers, *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
71. Egawa, N. and J. Doorbar, *The low-risk papillomaviruses*. Virus Res, 2017. **231**: p. 119-127.
72. Doorbar, J., N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, and I. Murakami, *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
73. Jacobs, M.V., A.M. de Roda Husman, A.J. van den Brule, P.J. Snijders, C.J. Meijer, and J.M. Walboomers, *Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(4): p. 901-5.
74. Clifford, G.M., J.S. Smith, T. Aguado, and S. Franceschi, *Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis*. Br J Cancer, 2003. **89**(1): p. 101-5.
75. Munoz, N., F.X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K.V. Shah, P.J. Snijders, C.J. Meijer, and G. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study,

- Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.* N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
76. Lorincz, A.T., R. Reid, A.B. Jenson, M.D. Greenberg, W. Lancaster, and R.J. Kurman, *Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types.* Obstet Gynecol, 1992. **79**(3): p. 328-37.
 77. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.* Virology, 2009. **384**(2): p. 260-5.
 78. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., *Human papillomaviruses.* IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1995. **64**: p. 1-378.
 79. Zuna, R.E., R.A. Allen, W.E. Moore, R. Mattu, and S.T. Dunn, *Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions.* Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1314-22.
 80. Bergeron, C., R. Barrasso, S. Beaudenon, P. Flamant, O. Croissant, and G. Orth, *Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions.* Am J Surg Pathol, 1992. **16**(7): p. 641-9.
 81. Tawheed, A.R., S. Beaudenon, M. Favre, and G. Orth, *Characterization of human papillomavirus type 66 from an invasive carcinoma of the uterine cervix.* J Clin Microbiol, 1991. **29**(11): p. 2656-60.
 82. Gheit, T., *Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology.* Front Oncol, 2019. **9**: p. 355.
 83. Van Doorslaer, K., Q. Tan, S. Xirasagar, S. Bandaru, V. Gopalan, Y. Mohamoud, Y. Huyen, and A.A. McBride, *The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis.* Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D571-8.
 84. Schwartz, S., *Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation.* Virology, 2013. **445**(1-2): p. 187-96.
 85. Bernard, H.U., *Regulatory elements in the viral genome.* Virology, 2013. **445**(1-2): p. 197-204.
 86. Schiller, J.T., P.M. Day, and R.C. Kines, *Current understanding of the mechanism of HPV infection.* Gynecol Oncol, 2010. **118**(1 Suppl): p. S12-7.
 87. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle.* J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.
 88. Vande Pol, S.B. and A.J. Klingelutz, *Papillomavirus E6 oncoproteins.* Virology, 2013. **445**(1-2): p. 115-37.
 89. Roman, A. and K. Munger, *The papillomavirus E7 proteins.* Virology, 2013. **445**(1-2): p. 138-68.
 90. Ronco, L.V., A.Y. Karpova, M. Vidal, and P.M. Howley, *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity.* Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2061-72.
 91. Um, S.J., J.W. Rhyu, E.J. Kim, K.C. Jeon, E.S. Hwang, and J.S. Park, *Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo.* Cancer Lett, 2002. **179**(2): p. 205-12.
 92. Narisawa-Saito, M. and T. Kiyono, *Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins.* Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1505-11.
 93. Smotkin, D. and F.O. Wettstein, *Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4680-4.
 94. Banks, L., P. Spence, E. Androphy, N. Hubbert, G. Matlashewski, A. Murray, and L. Crawford, *Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas.* J Gen Virol, 1987. **68 (Pt 5)**: p. 1351-9.
 95. Watanabe, S., T. Kanda, and K. Yoshiike, *Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7.* J Virol, 1989. **63**(2): p. 965-9.
 96. Williams, G.H., P. Romanowski, L. Morris, M. Madine, A.D. Mills, K. Stoeber, J. Marr, R.A. Laskey, and N. Coleman, *Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14932-7.

97. Pett, M. and N. Coleman, *Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?* J Pathol, 2007. **212**(4): p. 356-67.
98. Arias-Pulido, H., C.L. Peyton, N.E. Joste, H. Vargas, and C.M. Wheeler, *Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1755-62.
99. Hopman, A.H., F. Smedts, W. Dignef, M. Ummelen, G. Sonke, M. Mravunac, G.P. Vooijs, E.J. Speel, and F.C. Ramaekers, *Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities.* J Pathol, 2004. **202**(1): p. 23-33.
100. Jeon, S. and P.F. Lambert, *Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1654-8.
101. Bhattacharjee, B. and S. Sengupta, *CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2.* Virology, 2006. **354**(2): p. 280-5.
102. Hong, D., F. Ye, W. Lu, Y. Hu, X. Wan, Y. Chen, and X. Xie, *Methylation status of the long control region of HPV 16 in clinical cervical specimens.* Mol Med Rep, 2008. **1**(4): p. 555-60.
103. Ding, D.C., M.H. Chiang, H.C. Lai, C.A. Hsiung, C.Y. Hsieh, and T.Y. Chu, *Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. **147**(2): p. 215-20.
104. Nomine, Y., S. Charbonnier, T. Ristriani, G. Stier, M. Masson, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselaer, E. Weiss, B. Kieffer, and G. Trave, *Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain.* Biochemistry, 2003. **42**(17): p. 4909-17.
105. Van Doorslaer, K., A.O. Sidi, K. Zanier, V. Rybin, F. Deryckere, A. Rector, R.D. Burk, E.K. Lienau, M. van Ranst, and G. Trave, *Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis.* J Virol, 2009. **83**(17): p. 8759-70.
106. Chen, Z., M. Schiffman, R. Herrero, R. Desalle, and R.D. Burk, *Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses.* Virology, 2007. **360**(2): p. 447-53.
107. Terai, M., R. DeSalle, and R.D. Burk, *Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: Fringilla coelebs papillomavirus and Psittacus erithacus timneh papillomavirus.* J Virol, 2002. **76**(19): p. 10020-3.
108. Fu, L., K. Van Doorslaer, Z. Chen, T. Ristriani, M. Masson, G. Trave, and R.D. Burk, *Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity.* PLoS One, 2010. **5**(9).
109. Brimer, N., C. Lyons, A.E. Wallberg, and S.B. Vande Pol, *Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling.* Oncogene, 2012. **31**(43): p. 4639-46.
110. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18.* EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4129-35.
111. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 775-84.
112. Be, X., Y. Hong, J. Wei, E.J. Androphy, J.J. Chen, and J.D. Baleja, *Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP.* Biochemistry, 2001. **40**(5): p. 1293-9.
113. Chen, J.J., Y. Hong, E. Rustamzadeh, J.D. Baleja, and E.J. Androphy, *Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13537-44.

114. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 4918-27.
115. Tomaic, V., D. Pim, and L. Banks, *The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent*. *Virology*, 2009. **393**(1): p. 7-10.
116. Ansari, T., N. Brimer, and S.B. Vande Pol, *Peptide interactions stabilize and restructure human papillomavirus type 16 E6 to interact with p53*. *J Virol*, 2012. **86**(20): p. 11386-91.
117. Zanier, K., A. Ould M'hamed Ould Sidi, C. Boulade-Ladame, V. Rybin, A. Chappelle, A. Atkinson, B. Kieffer, and G. Trave, *Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53*. *Structure*, 2012. **20**(4): p. 604-17.
118. Scheffner, M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra, and P.M. Howley, *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 495-505.
119. Hu, Y., F. Ye, W. Lu, D. Hong, X. Wan, and X. Xie, *HPV16 E6-induced and E6AP-dependent inhibition of the transcriptional coactivator hADA3 in human cervical carcinoma cells*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(3): p. 298-306.
120. Kumar, A., Y. Zhao, G. Meng, M. Zeng, S. Srinivasan, L.M. Delmolino, Q. Gao, G. Dimri, G.F. Weber, D.E. Wazer, H. Band, and V. Band, *Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(16): p. 5801-12.
121. Shamanin, V.A., P. Sekaric, and E.J. Androphy, *hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells*. *J Virol*, 2008. **82**(8): p. 3912-20.
122. Nicolas, M., A. Wolfer, K. Raj, J.A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C.C. Hui, H. Clevers, G.P. Dotto, and F. Radtke, *Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*. *Nat Genet*, 2003. **33**(3): p. 416-21.
123. Blanpain, C., W.E. Lowry, H.A. Pasolli, and E. Fuchs, *Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage*. *Genes Dev*, 2006. **20**(21): p. 3022-35.
124. Rangarajan, A., R. Syal, S. Selvarajah, O. Chakrabarti, A. Sarin, and S. Krishna, *Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt*. *Virology*, 2001. **286**(1): p. 23-30.
125. Agrawal, N., M.J. Frederick, C.R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R.J. Li, C. Fakhry, T.X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A.K. El-Naggar, S.A. Jasser, J.N. Weinstein, L. Trevino, J.A. Drummond, D.M. Muzny, Y. Wu, L.D. Wood, R.H. Hruban, W.H. Westra, W.M. Koch, J.A. Califano, R.A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, N. Papadopoulos, D.A. Wheeler, K.W. Kinzler, and J.N. Myers, *Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1*. *Science*, 2011. **333**(6046): p. 1154-7.
126. Stransky, N., A.M. Egloff, A.D. Tward, A.D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G.V. Kryukov, M.S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A.H. Ramos, P. Stojanov, S.L. Carter, D. Voet, M.L. Cortes, D. Auclair, M.F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R.C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J.L. Weissfeld, R.R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareno, J.C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S.B. Gabriel, M. Meyerson, E.S. Lander, G. Getz, T.R. Golub, L.A. Garraway, and J.R. Grandis, *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. *Science*, 2011. **333**(6046): p. 1157-60.
127. Filippova, M., M.M. Johnson, M. Bautista, V. Filippov, N. Fodor, S.S. Tungteakhun, K. Williams, and P.J. Duerksen-Hughes, *The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity*. *J Virol*, 2007. **81**(8): p. 4116-29.
128. Tungteakhun, S.S. and P.J. Duerksen-Hughes, *Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein*. *Arch Virol*, 2008. **153**(3): p. 397-408.
129. Thomas, M. and L. Banks, *Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6*. *Oncogene*, 1998. **17**(23): p. 2943-54.

130. Smotkin, D. and F.O. Wettstein, *The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein*. J Virol, 1987. **61**(5): p. 1686-9.
131. Greenfield, I., J. Nickerson, S. Penman, and M. Stanley, *Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11217-21.
132. McIntyre, M.C., M.G. Frattini, S.R. Grossman, and L.A. Laimins, *Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3142-50.
133. Clements, A., K. Johnston, J.M. Mazzairelli, R.P. Ricciardi, and R. Marmorstein, *Oligomerization properties of the viral oncoproteins adenovirus E1A and human papillomavirus E7 and their complexes with the retinoblastoma protein*. Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 16033-45.
134. Phelps, W.C., C.L. Yee, K. Munger, and P.M. Howley, *The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A*. Cell, 1988. **53**(4): p. 539-47.
135. McLaughlin-Drubin, M.E., C.P. Crum, and K. Munger, *Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 2130-5.
136. Longworth, M.S., R. Wilson, and L.A. Laimins, *HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs*. EMBO J, 2005. **24**(10): p. 1821-30.
137. Bernat, A., N. Avvakumov, J.S. Mymryk, and L. Banks, *Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 7871-81.
138. Melar-New, M. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins*. J Virol, 2010. **84**(10): p. 5212-21.
139. Luscher-Firzlaff, J.M., J.M. Westendorf, J. Zwicker, H. Burkhardt, M. Henriksson, R. Muller, F. Pirollet, and B. Luscher, *Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation*. Oncogene, 1999. **18**(41): p. 5620-30.
140. Cardeal, L.B., E. Boccardo, L. Termini, T. Rabachini, M.A. Andreoli, C. di Loreto, A. Longatto Filho, L.L. Villa, and S.S. Maria-Engler, *HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33585.
141. Lees, J.A., M. Saito, M. Vidal, M. Valentine, T. Look, E. Harlow, N. Dyson, and K. Helin, *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7813-25.
142. Johnson, D.G., *Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity*. Oncogene, 1995. **11**(9): p. 1685-92.
143. Lee, M.H., B.O. Williams, G. Mulligan, S. Mukai, R.T. Bronson, N. Dyson, E. Harlow, and T. Jacks, *Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1621-32.
144. Cobrinik, D., M.H. Lee, G. Hannon, G. Mulligan, R.T. Bronson, N. Dyson, E. Harlow, D. Beach, R.A. Weinberg, and T. Jacks, *Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1633-44.
145. Hofmann, F., F. Martelli, D.M. Livingston, and Z. Wang, *The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes Dev, 1996. **10**(23): p. 2949-59.
146. Furukawa, Y., Y. Terui, K. Sakoe, M. Ohta, and M. Saito, *The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of cdc2 mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26249-58.
147. Ohtani, K., J. DeGregori, and J.R. Nevins, *Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12146-50.
148. Helin, K., E. Harlow, and A. Fattaey, *Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6501-8.

149. Hiebert, S.W., S.P. Chellappan, J.M. Horowitz, and J.R. Nevins, *The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F*. *Genes Dev*, 1992. **6**(2): p. 177-85.
150. Hinds, P.W., S. Mitnacht, V. Dulic, A. Arnold, S.I. Reed, and R.A. Weinberg, *Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins*. *Cell*, 1992. **70**(6): p. 993-1006.
151. Shirodkar, S., M. Ewen, J.A. DeCaprio, J. Morgan, D.M. Livingston, and T. Chittenden, *The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner*. *Cell*, 1992. **68**(1): p. 157-66.
152. Ikeda, M.A., L. Jakoi, and J.R. Nevins, *A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3215-20.
153. Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow, *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. *Science*, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
154. Dyson, N., P. Guida, K. Munger, and E. Harlow, *Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins*. *J Virol*, 1992. **66**(12): p. 6893-902.
155. Imai, Y., Y. Matsushima, T. Sugimura, and M. Terada, *Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product*. *J Virol*, 1991. **65**(9): p. 4966-72.
156. Lukas, J., B.O. Petersen, K. Holm, J. Bartek, and K. Helin, *Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 1047-57.
157. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. *Cancer Res*, 1996. **56**(20): p. 4620-4.
158. Ewen, M.E., H.K. Sluss, C.J. Sherr, H. Matsushime, J. Kato, and D.M. Livingston, *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 487-97.
159. Tam, S.W., J.W. Shay, and M. Pagano, *Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4*. *Cancer Res*, 1994. **54**(22): p. 5816-20.
160. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
161. Parry, D., S. Bates, D.J. Mann, and G. Peters, *Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product*. *EMBO J*, 1995. **14**(3): p. 503-11.
162. Nakao, Y., X. Yang, M. Yokoyama, A. Ferenczy, S.C. Tang, M.M. Pater, and A. Pater, *Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation*. *Br J Cancer*, 1997. **75**(10): p. 1410-6.
163. Meschede, W., K. Zumbach, J. Braspenning, M. Scheffner, L. Benitez-Bribiesca, J. Luande, L. Gissmann, and M. Pawlita, *Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(2): p. 475-80.
164. Smeets, S.J., A.T. Hesselink, E.J. Speel, A. Haesevoets, P.J. Snijders, M. Pawlita, C.J. Meijer, B.J. Braakhuis, C.R. Leemans, and R.H. Brakenhoff, *A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p. 2465-72.
165. Holzinger, D., G. Wichmann, L. Baboci, A. Michel, D. Hofler, M. Wiesenfarth, L. Schroeder, P. Boscolo-Rizzo, C. Herold-Mende, G. Dyckhoff, A. Boehm, A. Del Mistro, F.X. Bosch, A. Dietz, M. Pawlita, and T. Waterboer, *Sensitivity and specificity of antibodies against HPV16 E6 and other early proteins for the detection of HPV16-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(12): p. 2748-2757.

166. Kreimer, A.R., M. Johansson, T. Waterboer, R. Kaaks, J. Chang-Claude, D. Drogen, A. Tjonneland, K. Overvad, J.R. Quiros, C.A. Gonzalez, M.J. Sanchez, N. Larranaga, C. Navarro, A. Barricarte, R.C. Travis, K.T. Khaw, N. Wareham, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, P.H. Peeters, S. Panico, G. Masala, S. Grioni, R. Tumino, P. Vineis, H.B. Bueno-de-Mesquita, G. Laurell, G. Hallmans, J. Manjer, J. Ekstrom, G. Skeie, E. Lund, E. Weiderpass, P. Ferrari, G. Byrnes, I. Romieu, E. Riboli, A. Hildesheim, H. Boeing, M. Pawlita, and P. Brennan, *Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(21): p. 2708-15.
167. Kreimer, A.R., M. Johansson, E.L. Yanik, H.A. Katki, D.P. Check, K.A. Lang Kuhs, M. Willhauck-Fleckenstein, D. Holzinger, A. Hildesheim, R. Pfeiffer, C. Williams, N.D. Freedman, W.Y. Huang, M.P. Purdue, A. Michel, M. Pawlita, P. Brennan, and T. Waterboer, *Kinetics of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Antibody Response Prior to Oropharyngeal Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(8).
168. Fakhry, C., J.R. Qualliotine, Z. Zhang, N. Agrawal, D.A. Gaykalova, J.A. Bishop, R.M. Subramaniam, W.M. Koch, C.H. Chung, D.W. Eisele, J. Califano, and R.P. Viscidi, *Serum Antibodies to HPV16 Early Proteins Warrant Investigation as Potential Biomarkers for Risk Stratification and Recurrence of HPV-Associated Oropharyngeal Cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2016. **9**(2): p. 135-41.
169. Dahlstrom, K.R., K.S. Anderson, J.N. Cheng, D. Chowell, G. Li, M. Posner, and E.M. Sturgis, *HPV Serum Antibodies as Predictors of Survival and Disease Progression in Patients with HPV-Positive Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(12): p. 2861-9.
170. Zhang, Y., T. Waterboer, R.I. Haddad, B.A. Miles, A. Wentz, N.D. Gross, C. Fakhry, H. Quon, J.H. Lorch, C.G. Gourin, D. Clayburgh, K.J. Misiukiewicz, J.D. Richmon, P.E. Andersen, M.R. Posner, and G. D'Souza, *Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment*. *Oral Oncol*, 2017. **67**: p. 77-82.
171. Lang Kuhs, K.A., A.R. Kreimer, S. Trivedi, D. Holzinger, M. Pawlita, R.M. Pfeiffer, S.P. Gibson, N.C. Schmitt, A. Hildesheim, T. Waterboer, and R.L. Ferris, *Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence*. *Cancer*, 2017. **123**(22): p. 4382-4390.
172. Koslabova, E., E. Hamsikova, M. Salakova, J. Klozar, E. Foltynova, E. Salkova, E. Rotnaglova, V. Ludvikova, and R. Tachezy, *Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(8): p. 1832-9.
173. Denton, K.J., C. Bergeron, P. Klement, M.J. Trunk, T. Keller, R. Ridder, and C.C.S.G. European, *The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results*. *Am J Clin Pathol*, 2010. **134**(1): p. 12-21.
174. Klussmann, J.P., E. Gultekin, S.J. Weissenborn, U. Wieland, V. Dries, H.P. Dienes, H.E. Eckel, H.J. Pfister, and P.G. Fuchs, *Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(3): p. 747-53.
175. Castellsague, X., L. Alemany, M. Quer, G. Halc, B. Quiros, S. Tous, O. Clavero, L. Alos, T. Biegner, T. Szafarowski, M. Alejo, D. Holzinger, E. Cadena, E. Claros, G. Hall, J. Laco, M. Poljak, M. Benevolo, E. Kasamatsu, H. Mehanna, C. Ndiaye, N. Guimera, B. Lloveras, X. Leon, J.C. Ruiz-Cabezas, I. Alvarado-Cabrero, C.S. Kang, J.K. Oh, M. Garcia-Rojo, E. Iljazovic, O.F. Ajayi, F. Duarte, A. Nessa, L. Tinoco, M.A. Duran-Padilla, E.C. Pirog, H. Viarheichyk, H. Morales, V. Costes, A. Felix, M.J. Germar, M. Mena, A. Ruacan, A. Jain, R. Mehrotra, M.T. Goodman, L.E. Lombardi, A. Ferrera, S. Malami, E.I. Albanesi, P. Dabed, C. Molina, R. Lopez-Revilla, V. Mandys, M.E. Gonzalez, J. Velasco, I.G. Bravo, W. Quint, M. Pawlita, N. Munoz, S. de Sanjose, F. Xavier Bosch, I.C.O.I.H.i. Head, and G. Neck Cancer Study, *HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients*. *J Natl Cancer Inst*, 2016. **108**(6): p. djv403.

176. Prigge, E.S., M. Arbyn, M. von Knebel Doeberitz, and M. Reuschenbach, *Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(5): p. 1186-1198.
177. El-Naggar, A.K. and W.H. Westra, *p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency*. *Head Neck*, 2012. **34**(4): p. 459-61.
178. Takeuchi, S., A. Takahashi, N. Motoi, S. Yoshimoto, T. Tajima, K. Yamakoshi, A. Hirao, S. Yanagi, K. Fukami, Y. Ishikawa, S. Sone, E. Hara, and N. Ohtani, *Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo*. *Cancer Res*, 2010. **70**(22): p. 9381-90.
179. Romagosa, C., S. Simonetti, L. Lopez-Vicente, A. Mazo, M.E. Lleonart, J. Castellvi, and S. Ramon y Cajal, *p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors*. *Oncogene*, 2011. **30**(18): p. 2087-97.
180. Rietbergen, M.M., P.J. Snijders, D. Beekzada, B.J. Braakhuis, A. Brink, D.A. Heideman, A.T. Hesselink, B.I. Witte, E. Bloemena, R.J. Baatenburg-De Jong, C.R. Leemans, and R.H. Brakenhoff, *Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(10): p. 2366-72.
181. Perrone, F., A. Gloghini, B. Cortelazzi, P. Bossi, L. Licitra, and S. Pilotti, *Isolating p16-positive/HPV-negative oropharyngeal cancer: an effort worth making*. *Am J Surg Pathol*, 2011. **35**(5): p. 774-7; author reply 777-8.
182. Sritippho, T., S. Pongsiriwet, N. Lertprasertsuke, K. Buddhachat, T. Sastraruji, and A. Iamaroon, *p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer?* *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016. **17**(8): p. 4049-57.
183. Golusinski, P., J. Pazdrowski, M. Szewczyk, M. Misiolek, W. Pietruszewska, J. Klatka, S. Okla, H. Kazmierczak, A. Marszalek, V. Filas, A. Schneider, M.M. Masternak, K. Steplewska, K. Miskiewicz-Orczyk, and W. Golusinski, *Is immunohistochemical evaluation of p16 in oropharyngeal cancer enough to predict the HPV positivity?* *Rep Pract Oncol Radiother*, 2017. **22**(3): p. 237-242.
184. Geissler, C., A. Tahtali, M. Diensthuber, D. Gassner, T. Stover, and J. Wagenblast, *The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCN--a retrospective single-center study*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(3): p. 913-6.
185. van Houten, V.M., P.J. Snijders, M.W. van den Brekel, J.A. Kummer, C.J. Meijer, B. van Leeuwen, F. Denkers, L.E. Smeele, G.B. Snow, and R.H. Brakenhoff, *Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas*. *Int J Cancer*, 2001. **93**(2): p. 232-5.
186. Hubbard, R.A., *Human papillomavirus testing methods*. *Arch Pathol Lab Med*, 2003. **127**(8): p. 940-5.
187. Jacobs, M.V., P.J. Snijders, A.J. van den Brule, T.J. Helmerhorst, C.J. Meijer, and J.M. Walboomers, *A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings*. *J Clin Microbiol*, 1997. **35**(3): p. 791-5.
188. Hubbers, C.U. and B. Akgul, *HPV and cancer of the oral cavity*. *Virulence*, 2015. **6**(3): p. 244-8.
189. Cornelissen, M.T., H.L. Smits, M.A. Briet, J.G. van den Tweel, A.P. Struyk, J. van der Noordaa, and J. ter Schegget, *Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas*. *J Gen Virol*, 1990. **71 (Pt 5)**: p. 1243-6.
190. von Knebel Doeberitz, M., *The causal role of human papillomavirus infections in non-anogenital cancers. It's time to ask for the functional evidence*. *Int J Cancer*, 2016. **139**(1): p. 9-11.
191. Mighty, K.K. and L.A. Laimins, *The role of human papillomaviruses in oncogenesis*. *Recent Results Cancer Res*, 2014. **193**: p. 135-48.
192. Halec, G., M. Schmitt, B. Dondog, E. Sharkhuu, N. Wentzensen, T. Gheit, M. Tommasino, F. Kommos, F.X. Bosch, S. Franceschi, G. Clifford, L. Gissmann, and M. Pawlita, *Biological activity*

- of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer.* Int J Cancer, 2013. **132**(1): p. 63-71.
193. von Ahlfen, S., A. Missel, K. Bendrat, and M. Schlumpberger, *Determinants of RNA quality from FFPE samples.* PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1261.
 194. Masuda, N., T. Ohnishi, S. Kawamoto, M. Monden, and K. Okubo, *Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4436-43.
 195. Marur, S., G. D'Souza, W.H. Westra, and A.A. Forastiere, *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic.* Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 781-9.
 196. Kruger, M., A.M. Pabst, C. Walter, K. Sagheb, C. Gunther, S. Blatt, K. Weise, B. Al-Nawas, and T. Ziebart, *The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview.* J Craniomaxillofac Surg, 2014. **42**(7): p. 1506-14.
 197. Isayeva, T., Y. Li, D. Maswahu, and M. Brandwein-Gensler, *Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review.* Head Neck Pathol, 2012. **6 Suppl 1**(Suppl 1): p. S104-20.
 198. Lingen, M.W., W. Xiao, A. Schmitt, B. Jiang, R. Pickard, P. Kreinbrink, B. Perez-Ordenez, R.C. Jordan, and M.L. Gillison, *Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas.* Oral Oncol, 2013. **49**(1): p. 1-8.
 199. Ragin, C.C. and E. Taioli, *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**(8): p. 1813-20.
 200. Liang, C., C.J. Marsit, M.D. McClean, H.H. Nelson, B.C. Christensen, R.I. Haddad, J.R. Clark, R.O. Wein, G.A. Grillone, E.A. Houseman, G. Halec, T. Waterboer, M. Pawlita, J.F. Krane, and K.T. Kelsey, *Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma.* Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 5004-13.
 201. Blahak, J., J. Zelinka, J. Gumulec, C. Machacek, Z. Danek, and O. Bulik, *HPV, protein p16 and squamous cell carcinoma of the oral cavity.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2019.
 202. Palve, V., J. Bagwan, N.M. Krishnan, M. Pareek, U. Chandola, A. Suresh, G. Siddappa, B.L. James, V. Kekatpure, M.A. Kuriakose, and B. Panda, *Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Using Multiple Analytes and Their Role in Patient Survival.* J Glob Oncol, 2018. **4**: p. 1-33.
 203. Loeschke, S., A.K. Ohlmann, J.H. Brasen, R. Holst, and P.H. Warnke, *Prognostic value of HMGA2, P16, and HPV in oral squamous cell carcinomas.* J Craniomaxillofac Surg, 2016. **44**(9): p. 1422-9.
 204. Wang, F., H. Zhang, Y. Xue, J. Wen, J. Zhou, X. Yang, and J. Wei, *A systematic investigation of the association between HPV and the clinicopathological parameters and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas.* Cancer Med, 2017. **6**(5): p. 910-917.
 205. Fischer, C.A., M. Kampmann, I. Zlobec, E. Green, L. Tornillo, A. Lugli, M. Wolfensberger, and L.M. Terracciano, *p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters.* Ann Oncol, 2010. **21**(10): p. 1961-6.
 206. Kida, K., T. Terada, N. Uwa, Y. Omori, T. Fujii, Y. Tomita, K. Tsuzuki, H. Nishikawa, and M. Sakagami, *Relationship Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer Undergoing Surgery.* In Vivo, 2018. **32**(4): p. 927-935.
 207. Ghantous, Y., S. Akrish, Y. Leiser, and I. Abu El-Naaj, *The Possible Role of Human Papillomavirus Infection in the prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Northern Israel Population.* Isr Med Assoc J, 2018. **20**(3): p. 155-160.
 208. Malerova, S., D. Kalfert, M. Grega, R. Tachezy, and J. Klozar, *The significance of p16 protein expression in oral squamous cell carcinoma.* Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2020. **69**(2): p. 64-72.
 209. Hernandez, B.Y., C.F. Lynch, O.T.M. Chan, M.T. Goodman, E.R. Unger, M. Steinau, T.D. Thompson, M. Gillison, C. Lyu, M. Saraiya, and H.P.V.T.o.C. Workgroup, *Human papillomavirus*

- DNA detection, p16(INK4a), and oral cavity cancer in a U.S. population. *Oral Oncol*, 2019. **91**: p. 92-96.
210. Ni, Y., X. Zhang, Y. Wan, K. Dun Tang, Y. Xiao, Y. Jing, Y. Song, X. Huang, C. Punyadeera, and Q. Hu, *Relationship between p16 expression and prognosis in different anatomic subsites of OSCC*. *Cancer Biomark*, 2019. **26**(3): p. 375-383.
 211. Nauta, I.H., D.A.M. Heideman, A. Brink, B. van der Steen, E. Bloemena, S. Koljenovic, R.J. Baatenburg de Jong, C.R. Leemans, and R.H. Brakenhoff, *The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2021. **149**(2): p. 420-430.
 212. Duray, A., G. Descamps, C. Decaestecker, M. Remmelink, N. Sirtaine, J. Lechien, P. Ernoux-Neufcoeur, N. Bletard, J. Somja, C.E. Depuydt, P. Delvenne, and S. Saussez, *Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma*. *Laryngoscope*, 2012. **122**(7): p. 1558-65.
 213. Elango, K.J., A. Suresh, E.M. Erode, L. Subhadradevi, H.K. Ravindran, S.K. Iyer, S.K. Iyer, and M.A. Kuriakose, *Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011. **12**(4): p. 889-96.
 214. Lee, L.A., C.G. Huang, C.T. Liao, L.Y. Lee, C. Hsueh, T.C. Chen, C.Y. Lin, K.H. Fan, H.M. Wang, S.F. Huang, I.H. Chen, C.J. Kang, S.H. Ng, S.L. Yang, K.C. Tsao, Y.L. Chang, and T.C. Yen, *Human papillomavirus-16 infection in advanced oral cavity cancer patients is related to an increased risk of distant metastases and poor survival*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40767.
 215. Annertz, K., K. Rosenquist, G. Andersson, H. Jacobsson, B.G. Hansson, and J. Wennerberg, *High-risk HPV and survival in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma - 5-year follow up of a population-based study*. *Acta Otolaryngol*, 2014. **134**(8): p. 843-51.
 216. Ziemke, P. and K. Marquardt, *[Immunocytochemistry of p16(INK4a) and Ki-67 as adjunctive method for routine gynecological cytology of mild and moderate dysplasia]*. *Pathologe*, 2013. **34**(4): p. 323-8.
 217. Schmidt, D., C. Bergeron, K.J. Denton, R. Ridder, and C.C.S.G. European, *p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study*. *Cancer Cytopathol*, 2011. **119**(3): p. 158-66.
 218. Bazarsad, S., X. Zhang, K.Y. Kim, R. Illeperuma, R.D. Jayasinghe, W.M. Tilakaratne, and J. Kim, *Identification of a combined biomarker for malignant transformation in oral submucous fibrosis*. *J Oral Pathol Med*, 2017. **46**(6): p. 431-438.
 219. Reuschenbach, M., K. Kansy, K. Garbe, S. Vinokurova, C. Flechtenmacher, C. Toth, E.S. Prigge, O.C. Thiele, S. Reinert, J. Hoffmann, M. von Knebel Doeberitz, and K. Freier, *Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany*. *Oral Oncol*, 2013. **49**(9): p. 937-942.
 220. Lange, D., A. Heyden, E. Lie, P. Brandtzaeg, M. Boysen, and O. Clausen, *Lack of prognostic significance for p53-overexpression and Ki-67-immunoreactivity in oral T1-2 squamous cell carcinomas*. *Oncol Rep*, 1997. **4**(4): p. 737-42.
 221. Doll, C., C. Steffen, B. Beck-Broichsitter, M. Richter, K. Neumann, A. Pohrt, P. Lohneis, A. Lehmann, M. Heiland, C. Stromberger, A. Coordes, K. Johrens, and J.D. Raguse, *The Prognostic Significance of p16 and its Role as a Surrogate Marker for Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 281 Cases*. *Anticancer Res*, 2022. **42**(5): p. 2405-2413.
 222. Sritippho, T., P. Chotjumlong, and A. Iamaroon, *Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. **16**(15): p. 6193-200.
 223. Ampur, O., Sudarsa, I., Suryawisesa, I., *Association of p16 expression with clinicopathological features of oral cavity squamous cell carcinoma patients in Bali*. *Bali Medical Journal* 5(3): 362-366., 2016.
 224. Saito, T., T. Nakajima, and K. Mogi, *Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas*. *J Oral Pathol Med*, 1999. **28**(5): p. 226-32.

225. Dragomir, L.P., C. Simionescu, C. Margaritescu, A. Stepan, I.M. Dragomir, and M.R. Popescu, *p53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas*. Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(1): p. 89-93.
226. Takkem, A., C. Barakat, S. Zakaraia, K. Zaid, J. Najmeh, M. Ayoub, and M.Y. Seirawan, *Ki-67 Prognostic Value in Different Histological Grades of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(11): p. 3279-3286.
227. Kurokawa, H., M. Zhang, S. Matsumoto, Y. Yamashita, T. Tanaka, T. Tomoyose, H. Takano, K. Funaki, H. Fukuyama, T. Takahashi, and S. Sakoda, *The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2005. **34**(10): p. 602-7.
228. Alves, A.V., D.R. Ribeiro, S.O. Lima, F.P. Reis, A.F. Soares, M.Z. Gomes, and R.L.J. Albuquerque, *Expression of Ki-67 and P16 INK4a in chemically-induced perioral squamous cell carcinomas in mice*. Rev Col Bras Cir, 2016. **43**(2): p. 72-9.
229. Miranda Galvis, M., J. Freitas Jardim, E. Kaminagakura, A.R. Santos-Silva, F. Paiva Fonseca, O. Paes Almeida, M. Ajudarte Lopes, C. Lopes Pinto, and L.P. Kowalski, *Expression of cell cycle proteins according to HPV status in oral squamous cell carcinoma affecting young patients: a pilot study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018. **125**(4): p. 317-325.
230. Hu, J., W. Ge, and J. Xu, *HPV 16 E7 inhibits OSCC cell proliferation, invasion, and metastasis by upregulating the expression of miR-20a*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 9433-40.
231. Gotz, C., E. Drecoll, M. Straub, O. Bissinger, K.D. Wolff, and A. Kolk, *Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(47): p. 76704-76712.
232. Kouketsu, A., I. Sato, S. Abe, M. Oikawa, Y. Shimizu, T. Takahashi, and H. Kumamoto, *Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients*. J Oral Pathol Med, 2016. **45**(8): p. 565-72.
233. Kaminagakura, E., L.L. Villa, M.A. Andreoli, J.S. Sobrinho, J.G. Vartanian, F.A. Soares, I.N. Nishimoto, R. Rocha, and L.P. Kowalski, *High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1726-32.
234. Salazar, C.R., R.V. Smith, M.K. Garg, M. Haigentz, Jr., B.A. Schiff, N. Kawachi, N. Anayannis, T.J. Belbin, M.B. Prystowsky, R.D. Burk, and N.F. Schlecht, *Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment*. Head Neck Pathol, 2014. **8**(1): p. 77-87.
235. Mulder, F.J., F. Klufah, F.M.E. Janssen, F. Farshadpour, S.M. Willems, R. de Bree, A. Zur Hausen, M. van den Hout, B. Kremer, and E.M. Speel, *Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus, but Absence of Merkel Cell Polyomavirus, in Head and Neck Cancer of Non-Smokers and Non-Drinkers*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 560434.
236. Tokuzen, N., K.I. Nakashiro, S. Tojo, H. Goda, N. Kuribayashi, and D. Uchida, *Human papillomavirus-16 infection and p16 expression in oral squamous cell carcinoma*. Oncol Lett, 2021. **22**(1): p. 528.
237. Blatt, S., A. Pabst, S. Zimmer, C. Walter, B. Al-Nawas, and M. Kruger, *Clinical efficacy of an antibody-based detection system for human papilloma virus infection in oral squamous cell carcinoma*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(5): p. 2837-2843.
238. Nopmaneepaisarn, T., N. Tangjaturonrasme, W. Rawangban, C. Vinayanuwattikun, S. Keelawat, and A. Bychkov, *Low prevalence of p16-positive HPV-related head-neck cancers in Thailand: tertiary referral center experience*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 1050.
239. Kademani, D., R.B. Bell, S. Bagheri, E. Holmgren, E. Dierks, B. Potter, and L. Homer, *Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(11): p. 1599-605.
240. Rogers, S.N., J.S. Brown, J.A. Woolgar, D. Lowe, P. Magennis, R.J. Shaw, D. Sutton, D. Errington, and D. Vaughan, *Survival following primary surgery for oral cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(3): p. 201-11.
241. *Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. 2021, Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).*

242. Fiedler, M., F. Weber, M.G. Hautmann, F. Haubner, T.E. Reichert, C. Klingelhofer, S. Schreml, J.K. Meier, A. Hartmann, and T. Ettl, *Biological predictors of radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Oral Investig, 2018. **22**(1): p. 189-200.
243. Wensveen, C.W., M.J. Kagie, R.W. Veldhuizen, J.B. Trimbos, and M.E. Boon, *Combining HPV and MIB-1 tests reduces the number of colposcopies in women with equivocal cytology*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2006. **85**(12): p. 1491-5.

7. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maximilian Richter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das orale Plattenepithelkarzinom – Der prognostische und klinische Einfluss einer p16^{INK4a}- und Mib/Ki-67-Expression“/ „The prognostic and clinical significance of p16^{INK4a} and Mib/Ki-67 in oral squamous cell carcinoma“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Maximilian Richter hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Christian Doll, Claudius Steffen, Benedicta Beck-Broichsitter, Maximilian Richter, Konrad Neumann, Anne Pohrt, Philipp Lohneis, Annika Lehmann, Max Heiland, Carmen Stromberger, Annekatriin Coordes, Korinna Jöhrens and Jan-Dirk Raguse; „The Prognostic Significance of p16 and its Role as a Surrogate Marker for Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 281 Cases“, Anticancer Research, 2022

Beitrag im Einzelnen:

Erhebung der klinischen Daten und Auswertung der immunhistochemischen Präparate für p16 und Mib sowie tabellarische Datenkollektion

Mitwirkung an den Überlebensanalysen und an der Generierung der Ergebnisse zu Figure 3 der Publikation

Mitwirkung an der Diskussion im Sinne einer Literaturrecherche zu den Themen p16-Positivität im oralen Plattenepithelkarzinom und Zusammenhang einer p16 Positivität und HPV-Infektion im oralen Plattenepithelkarzinom mit Erstellung der Tabelle zum Vergleich (Table IV. Studies evaluating p16/HPV in oral squamous cell carcinoma (OSCC).)

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9. Lebenslauf

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

10. Komplette Publikationsliste

1. Christian Doll, Claudius Steffen, Benedicta Beck-Broichsitter, Maximilian Richter, Konrad Neumann, Anne Pohrt, Philipp Lohneis, Annika Lehmann, Max Heiland, Carmen Stromberger, Annekatriin Coordes, Korinna Jöhrens and Jan-Dirk Raguse; „The Prognostic Significance of p16 and its Role as a Surrogate Marker for Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 281 Cases“, *Anticancer Research*, 2022
2. Wüster, Jonas MD, DMD; Kreutzer, Kilian MD, DMD; Koerdt, Steffen MD, DMD; Voss, Jan Oliver MD, DMD; Richter, Maximilian MD; Heiland, Max MD, DMD; Doll, Christian MD, DMD; Raguse, Jan-Dirk MD, DMD. Modified McLaughlin's Dynamic Muscle Support in the 21st Century? A Retrospective Study With a Prospective Follow-Up Analysis for Patients With Long Standing Facial Paralysis. *The Journal of Craniofacial Surgery* 33(6):p e594-e598, September 2022. | DOI: 10.1097/SCS.00000000000008668

11. Danksagung

Es versteht sich von selbst, dass wissenschaftliches Arbeiten ein gutes Miteinander aller Beteiligten verlangt und stets ein Zusammenspiel vieler ist.

Deshalb ist es mir an dieser Stelle ein Bedürfnis, Herrn PD Dr. Dr. Raguse für das Überlassen des Themas sowie die angenehme und kompetente Betreuung als mein Doktorvater zu danken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Korinna Jöhrens für die engmaschige und freundliche Unterstützung sowie für die vielen Tage zusammen vor dem Mikroskop.

Ich danke Herrn Dr. Dr. Doll für die großartige, akribische und freundschaftliche Hilfe in allen Belangen sowie das offene Ohr bei auftretenden Problemen und Schwierigkeiten. Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle auch für die kollegiale klinische Ausbildung und das Schaffen von Freiräumen für die Forschung bedanken.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für das freundliche Miteinander und die konstruktive Zeit zusammen danken.

Stellvertretend für meine ganze Familie, die mich in meinem Weg stets zu bestärken und unterstützen weiß, möchte ich insbesondere meiner Lebensgefährtin Nora Frühauf für all Ihre Hilfe und die großartige Zeit zusammen, aber auch das Verständnis für entstehende Abstriche danken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank all meinen Freunden sowie Kolleginnen und Kollegen ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

*Für meine geliebte Großmutter
Dr. Inge Spenke (1942-2022)*

12. Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Richter, Maximilian
Emailadresse: maximilian.richter@charite.de
Matrikelnummer: 218502
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Dr. Raguse
Promotionsinstitution / Klinik: Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr *Maximilian Richter* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 29.03.2019
- Termin 2: 9.01.2020

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Methoden der deskriptiven Statistik
- Auswertung des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens mit Kaplan-Meier Kurven
- Chi-Quadrat-Test für Kreuztabellen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 6.07.2023

Name des Beraters: Dr. Konrad Neumann



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Sitz: Reinhardtstr. 58