

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des
Unfallkrankenhauses Berlin

DISSERTATION

Die Tumorinvasion CD20+ B-Lymphozyten bei
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in
Abhängigkeit einer Infektion mit Humanen Papillomviren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jakob Ihbe

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abstrakt.....	1
1 Einleitung und Fragestellung.....	4
1.1 Karzinome der Kopf-Hals-Region.....	4
1.1.1 Inzidenz.....	4
1.1.2 Risikofaktoren.....	4
1.1.3 Klassifikation.....	8
1.1.4 Klinische Merkmale.....	10
1.1.5 Tumorausbreitung.....	11
1.1.6 Histologische Merkmale.....	12
1.1.7 Molekulare Merkmale.....	13
1.1.8 Therapie.....	13
1.1.9 Prognose.....	15
1.2 Tumormikromilieu.....	16
1.3 Tumor-infiltrierende Lymphozyten.....	16
1.3.1 T-Lymphozyten.....	16
1.3.2 Regulatorische T-Zellen.....	17
1.3.3 B-Lymphozyten.....	17
1.4 HPV.....	18
1.5 Tumor infiltrierende Lymphozyten und HPV-Status.....	21
1.6 Fragestellung.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Laborgeräte.....	23

2.1.2	Chemikalien und Kits	23
2.1.3	Antikörper	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	24
2.2.2	Anfertigung von Gewebe-Mikroarrays.....	25
2.2.3	Erstellung von Schnitten der Gewebe-Mikroarrays	25
2.2.4	Immunhistochemischer Nachweis des p16-Proteins.....	25
2.2.5	Auswertung des immunhistochemischen p16-Nachweises	26
2.2.6	Immunhistochemischer Nachweis des CD20-Antigens.....	26
2.2.7	Auswertung des immunhistochemischen CD20-Nachweises	26
2.2.8	Statistische Analyse.....	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Gesamtpatientenkollektiv	28
3.1.1	Tumorlokalisation.....	28
3.1.2	Tumorstadium.....	28
3.1.3	Lymphknotenstatus.....	28
3.1.4	Grading	29
3.1.5	p16-Protein	29
3.1.6	Assoziation des HPV-Status und des Alters	30
3.1.7	Assoziation des HPV-Status und der Lokalisation des Primärtumors	30
3.1.8	HPV-Status in Abhängigkeit von Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading	31
3.1.9	HPV-Status und Tumorinvasion CD20+ B-Lymphozyten.....	31
3.1.10	HPV-Status und Stromainvasion CD20+ B-Lymphozyten	32
3.1.11	Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Abhängigkeit von Alter, Lokalisation, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading	33
3.2	Subgruppe der OPSCCs	34

3.2.1	Tumorstadium	34
3.2.2	Lymphknotenstatus	34
3.2.3	Grading	34
3.2.4	p16-Protein	34
3.2.5	Assoziation des HPV-Status und des Alters	34
3.2.6	HPV-Status in Abhängigkeit von Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading	35
3.2.7	HPV-Status und Tumorerinvasion CD20+ B-Lymphozyten.....	35
3.2.8	HPV-Status und Stromainvasion CD20+ B-Lymphozyten.....	36
3.2.9	Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Abhängigkeit von Alter, Lokalisation, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading	37
4	Diskussion	38
5	Literaturverzeichnis	44
6	Eidesstattliche Versicherung	57
7	Lebenslauf	58
8	Publikationsliste	59
9	Danksagung.....	60

Abkürzungsverzeichnis

A dest.	Aqua destillata
APS	Adenosinphosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Cdk-4	Cyclin-abhängige Kinase-4
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FFPE	Mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet (<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papillomvirus
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IQR	Interquartilenabstand (<i>interquartile range</i>)
OPSCC	Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (<i>oropharyngeal squamous cell cancer</i>)
OSCC	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (<i>oral squamous cell cancer</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pRb	Retinoblastom-Protein
RNS	Ribonucleinsäure
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>standard error of the mean</i>)

TBE	Trishydroxyaminomethan-Borat-Ethylendiaminetraessigsäure
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMA	Gewebe-Mikroarray (<i>tissue microarray</i>)
T _{REG}	Regulatorische T-Zellen
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (<i>union internationale contre le cancer</i>)
ukb	Unfallkrankenhaus Berlin
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Risikofaktoren für das OSCC und OPSCC	8
Abbildung 2: Onkogene Wirkung der viralen Proteine E6 und E7	21
Abbildung 3: Schnittpräparat eines OSCC, p16-Protein negativ und positiv.....	26
Abbildung 4: Mit CD20-Antikörpern gefärbtes Tumorareal	27
Abbildung 5: Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen	29
Abbildung 6: HPV-Status und Alter der Patienten, gesamtes Patientenkollektiv	30
Abbildung 7: CD20+ B-Lymphozyten im Tumorgewebe, gesamtes Patientenkollektiv ...	32
Abbildung 8: CD20+ B-Lymphozyten im Stromagewebe, gesamtes Patientenkollektiv.	33
Abbildung 9: HPV-Status und Alter der Patienten, Subgruppe OPSCCs	35
Abbildung 10: CD20+ B-Lymphozyten im Tumorgewebe, Subgruppe OPSCCs	36
Abbildung 11: CD20+ B-Lymphozyten im Stromagewebe, Subgruppe OPSCCs.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausdehnung des Primärtumors (T)	8
Tabelle 2: Lymphknotenbefall (N)	9
Tabelle 3: Fernmetastasen (M)	9
Tabelle 4: Stadieneinteilung des OSCC und des OPSCC	9
Tabelle 5: Tumoreigenschaften mit prognostischer Relevanz	15

Abstrakt

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (*oral squamous cell cancer*, OSCC) und des Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell cancer*, OPSCC) stehen mit 275 000 Neuerkrankungen pro Jahr an sechster Stelle der weltweit häufigsten Krebsleiden [1]. Eine kausale Assoziation der Karzinogenese mit Humanen Papillomviren (HPV) wurde für OPSCC, wie z. B. für Tonsillenkarzinome, nachgewiesen [2, 3].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Tumormikromilieu bei OSCC und OPSCC in Abhängigkeit vom HPV-Status zu untersuchen. Von Interesse war hierbei das Vorliegen von CD20+ B-Lymphozyten.

Die Untersuchungen wurden an anonymisierten Gewebeproben von 197 Patienten des Unfallkrankenhauses Berlin (ukb) durchgeführt. Zunächst wurde die Patientenkohorte hinsichtlich des Geschlechts, des Alters, der Lokalisation der Primärtumore, des Tumorstadiums, des Lymphknotenstatus und des Tumorgradings untersucht.

Der HPV-Status wurde mittels Nachweises des p16-Proteins und HPV-spezifischer Ribonukleinsäure (RNS) und –Desoxyribonukleinsäure (DNS) ermittelt. Weiterhin erfolgte die immunhistochemische Quantifizierung von CD20+ B-Lymphozyten im Tumor- und Stromagewebe in Abhängigkeit vom HPV-Status.

77,2% der Patienten waren männlich und 22,8% weiblich mit einem medianen Alter von 60 Jahren. Im Bereich der Mundhöhle waren 55,3%, im Oropharynx 35% und im Hypopharynx 9,1% der Tumore lokalisiert. Die Diagnose erfolgte primär im Tumorstadium IV (45,4%), gefolgt von Stadium III (23,2%), Stadium I (19,2%) und Stadium II (12,4%). Der Anteil positiver Lymphknoten in Abhängigkeit vom Primärtumor lag bei der Mundhöhle bei 49,1%, beim Oropharynx bei 71,6% und beim Hypopharynx bei 88,9%. Bei den Primärtumoren besaßen 42,1% einen mäßigen histologischen Differenzierungsgrad (G2), niedrig differenzierte Tumore (G3) bestanden bei 38,6% der Patienten und hoch differenzierte (G1) bei 11,2%.

11,7% der Patienten zeigten einen positiven Nachweis des p16-Proteins. Ein positiver HPV-Status wurde bei 10,2% der Patienten ermittelt (Ergebnisse publiziert durch [4]). Patienten mit positivem HPV-Status waren im Median signifikant ($p < 0,05$) älter (66 Jahre) als Patienten mit negativem HPV-Status (59 Jahre). Die HPV-positiven Tumore waren signifikant häufig ($p < 0,0005$) im Oropharynx lokalisiert (18 Fälle), zwei

Fälle fanden sich im Bereich der Mundhöhle. Alle Hypopharynxkarzinome waren HPV-negativ.

HPV-assoziierte Tumore zeigten im Median 17 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche, die Infiltrationsrate lag signifikant ($p < 0,0005$) höher als bei HPV-Status negativen Tumoren, wo keine CD20+ B-Lymphozyten vorlagen. Es zeigte sich keine signifikante Assoziation der Invasion CD20+ B-Lymphozyten in das den Tumor umgebende Stromagewebe in Abhängigkeit vom HPV-Status.

Die Notwendigkeit einer strikten Differenzierung von OSCC und OPSCC wird von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unterstützt. Der Nachweis einer vermehrten Infiltration CD20+ B-Lymphozyten bei HPV-positiven OSCC und OPSCC konnte erbracht werden. Hierdurch besteht ein neuer, histologisch begründbarer Erklärungsansatz für die bessere Prognose dieser Tumorentität.

Abstract

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) represent the sixth most common types of cancer worldwide with an annual incidence of 275 000 cases [1]. A causative association of carcinogenesis with the human papilloma virus (HPV) has been proven for OPSCC, specifically tonsillar cancer [2, 3].

The aim of this research was to investigate the tumor microenvironment of OSCC and OPSCC based on the HPV-status of the patient. Of particular interest was the presence of CD20+ B-lymphocytes.

Tissue probes from 197 patients of the Unfallkrankenhaus Berlin (ukb) were diagnosed with OSCC or OPSCC. The patient cohort was then screened for sex, age, location of the primary tumor, tumor stage, nodal stage and grading.

The HPV-status was then determined by the presence of the p16-protein and HPV specific ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid. Immunohistochemical staining for the presence of CD20+ B-lymphocytes in tumoral and stromal tissue as well as quantification of these cells was performed.

The patient population consisted of 77,2% male and 22,8% female with a median age of 60 years. 55,3% of tumors were located inside the oral cavity, 35% in the oropharynx,

and 9,1% in the hypopharynx. Diagnosis was made primarily in tumor stage IV (45,4%), followed by stage III (23,2%), stage I (19,2%) and stage II (12,4%).

Oral cavity tumors were accompanied by positive lymph nodes in 49,1% of patients, oropharyngeal tumors in 71,6% and hypopharynx tumors in 88,9%. Primary tumors showed a medium differentiation in 42,1% of cases, poorly differentiated tumors were found in 38,6%, and highly differentiated tumors in 11,2%.

11,7% of tumors were positive for the p16-protein. 10,2% of patients were found to be positive for HPV (results published by [4]). Patients with a positive HPV-status were significantly ($p < 0.05$) older (66 years) than patients with negative HPV-status (59 years). HPV-positive tumors were more often localized to the oropharynx ($p < 0.0005$, 18 cases) and two cases were found in the oral cavity. All hypopharyngeal tumors were HPV-negative.

HPV-associated tumors showed a median of 17 CD20+ B-lymphocytes per square millimeter tumor area. This was significantly ($p < 0.0005$) higher than HPV-negative patients where no CD20+ B-Lymphocytes were found in the tumor area. There was no significant association between invasion of CD20+ B-lymphocytes in the stromal area and the HPV-status.

The need for strict differentiation between OSCC and OPSCC is supported by the results of this work. Evidence for an increased infiltration of CD20+ B-lymphocytes in HPV-positive OSCC and OPSCC was found. Therefore there exists a new, histologically based explanation to the favorable prognosis of this tumor entity.

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Karzinome der Kopf-Hals-Region

Die Karzinome der Kopf-Hals-Region stellen eine heterogene Tumorgruppe dar, die abhängig vom Ort ihrer Entstehung im oberen Aerodigestivtrakt in Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome unterteilt wird, wobei das Plattenepithelkarzinom mit einer Häufigkeit von 90% vorwiegend anzutreffen ist [1, 5]. Das OSCC ist eine Untergruppe von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region und kann *per definitionem* seinen Ausgang von allen intraoralen, mit Plattenepithel ausgekleideten Strukturen mit Ausnahme der äußeren Lippe und der Speicheldrüsen nehmen. Hierdurch wird die Mundhöhle bis zum vorderen Gaumenbogen miteinbezogen. Die weitere für diese Arbeit relevante Untergruppe der Karzinome der Kopf-Hals-Region ist das OPSCC. Sein Ursprungsraum schließt sich dem des OSCC nach dorsal an, beginnend bei der Zungenwurzel. Nach kranial wird er vom Nasopharynx und nach kaudal zum Hypopharynx durch die pharyngoepiglottische Falte begrenzt. Die Lokalisation des OPSCC stellt somit den mittleren Teil des Pharynx dar und beinhaltet die Gaumentonsillen und deren Logen sowie die Zungenrundtonsille [6, 7].

1.1.1 Inzidenz

Die weltweiten Inzidenzzahlen weisen hohe regionale Unterschiede auf, wobei das Erkrankungsrisiko für Männer drei bis fünf Mal so hoch ist wie für Frauen. In Teilen Asiens (Sri Lanka, Indien, Pakistan, Bangladesch) stehen das OSCC und das OPSCC mit einem Anteil von 25% an 1. Stelle bei den Krebsneuerkrankungen [1]. In Europa sind regional große Unterschiede zu verzeichnen. So zeigt Frankreich mit einer Inzidenzrate von 27 bis 37 auf 100 000 Einwohner die höchste Neuerkrankungsrate. In Deutschland lag die Inzidenzrate mit 19,1 bei Männern und 5,9 bei Frauen auf 100 000 Einwohner im Jahr 2008 im europäischen Mittel [1, 5].

1.1.2 Risikofaktoren

Endogene Risikofaktoren

Voraussetzung für die Entstehung eines OSCC bzw. OPSCC sind eine Reihe von genetischen Mutationen, die durch das Zusammenwirken von exogenen Faktoren und genetischer Disposition bedingt werden [8]. In der Literatur wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Genpolymorphismen beschrieben, die mit einem erhöhten

Erkrankungsrisiko assoziiert sind. Besonders im Fokus stehen Polymorphismen von Genen, die an der Reparatur geschädigter Desoxyribonukleinsäure (DNS) beteiligt sind. So wurde für den Polymorphismus 399 des *excision repair cross-complementing*-Gens 6 eine signifikante Erhöhung der Auftretenswahrscheinlichkeit eines OSCC ermittelt [9]. Gleiches wurde für Polymorphismen der DNS-Reparaturgene Ku70 und XRCC4 nachgewiesen [10, 11]. Es wird eine Rolle der genannten Genpolymorphismen als Biomarker und zur Ermittlung von Hochrisikopatienten diskutiert [10].

Exogene Risikofaktoren

Rauchen

Zigarettenrauch wird als maßgeblicher ätiologischer Faktor bei der Entstehung oraler prämaligener Läsionen und des OSCC bzw. OPSCC angesehen [12]. Er enthält karzinogene Substanzen wie Teer, Nikotin, Benzoapyrene, Nitrosamine, Cyanwasserstoff und Formaldehyd [13, 14]. Hierdurch kommt es zu Beeinträchtigungen der DNS-Reparaturkapazität, der Kontrolle des Zellzyklus sowie zu chromosomalen Aberrationen und Veränderungen von Zellkerngröße, Keratinisierungsgrad sowie erhöhten Zellproliferationsraten [12]. Dadurch steigt das Risiko an einem OSCC bzw. OPSCC zu erkranken um das zwei- bis siebenfache [15]. Auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer oralen prämaligen Läsion korreliert stark mit dem Rauchen [16].

Alkohol

Das in alkoholischen Getränken enthaltene Ethanol wurde als karzinogen für Menschen eingestuft und ein kausaler Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Entwicklung eines OSCC und OPSCC hergestellt [17, 18]. Nach dem Konsum erfolgt die Resorption von Ethanol im Dünndarm und die Metabolisierung in der Leber über das Enzym Alkoholdehydrogenase, das es zu Acetaldehyd oxidiert [19]. Zusätzlich wurde eine Umwandlung von Ethanol in Acetaldehyd durch orale Mikroben nachgewiesen, was zu stark erhöhten Konzentrationen von Acetaldehyd im Speichel führt [20]. Da Acetaldehyd multiple karzinogene Eigenschaften besitzt, wird seine lokale Anreicherung im oberen Aerodigestivtrakt mit für die erhöhte Inzidenz maligner Läsionen bei Alkoholabusus verantwortlich gemacht [19, 21]. Weiterhin sind auch genetische Polymorphismen der Alkoholdehydrogenase für die Toxizität des konsumierten Ethanols von Bedeutung; insbesondere bei asiatischen Bevölkerungspopulationen kommt es dabei zu erhöhten

Auftretenswahrscheinlichkeiten von Karzinomen der oberen Atmungs- und Verdauungsorgane [18, 22].

Die Kombination von hoher Alkoholaufnahme und Rauchen, wie sie bei bis zu 80% von Alkoholkranken anzutreffen ist, führt zu einer überproportional starken Auftretenswahrscheinlichkeit eines OSCC und OPSCC. Im Vergleich mit von Alkohol und Rauchen abstinenter Patienten war diese um das 15- bis 35-fache erhöht [15, 23]. Weiterhin besteht eine positive Korrelation zwischen steigender Alkoholkonzentration und Karzinogenität des betreffenden, unverdünnt zugeführten Getränkes [24, 25].

Betelnuss

Der Konsum der Betelnuss (Arekanuss), Frucht der Betelnusspalme (*Areca catechu*), ist in Teilen Südostasiens verbreitet [26]. Dabei wird die unreife oder reife Betelnuss zerschnitten und, in ein Blatt der Betelnusspalme eingewickelt, für mehrere Stunden kauend und saugend in der Mundhöhle gehalten. Wahlweise werden dieser Mischung auch Tabak und Geschmacksverbesserer hinzugefügt [27]. Weiterhin erfolgt die Zugabe von Kalziumhydroxid, um die Resorption der alkaloiden Hauptwirkstoffe, die eine euphorisierende und stimulierende Wirkung besitzen, durch die orale Mukosa zu vereinfachen [26].

Das Kauen der Betelnuss wurde von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*) 1996 offiziell als karzinogen eingestuft [28]. Es führt durch den prolongierten Kontakt mit der Mundschleimhaut und durch die Freisetzung karzinogener Inhaltsstoffe wie Nitrosamine, Arecolin und reaktiven Sauerstoffspezies zu präkanzerösen Veränderungen und ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an einem OSCC korreliert [26]. Die Anwesenheit von Tabak in der Kaumischung sowie der Konsum von Zigaretten und Alkohol führen zu zusätzlich stark gesteigerten Inzidenzraten [29].

Mundhygiene

Mangelnde Mundhygiene und Parodontitis sind mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines OSCC verbunden [30]. In der Vergangenheit war umstritten, ob es sich dabei um unabhängige Risikofaktoren handelt oder ob sie eine Folge der Hauptrisikofaktoren eines OSCC, Alkoholkonsum und Zigarettenrauchen, sind [31]. Es wurde nachgewiesen, dass bei entsprechender Substratzufuhr Stoffwechselprodukte der oralen mikrobiellen Flora karzinogene Eigenschaften aufweisen können [20].

Weiterhin ist eine chronische Entzündungsreaktion, wie sie im Rahmen einer Parodontitis innerhalb der oralen Mukosa vorliegt, mit einer erhöhten Inzidenz maligner Läsionen assoziiert [32]. Daher ist davon auszugehen, dass mangelnde Mundhygiene und Parodontitis unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung eines OSCC darstellen [30].

Viren

Viren sind ein ätiologischer Faktor für die Entstehung multipler maligner Neoplasien z. B. beim hepatozellulären Karzinom, beim Kaposi-Sarkom oder beim Zervixkarzinom [33-35]. Eine pathogenetische Rolle von HPV in der Genese von OPSCC, z. B. bei Tonsillenkarzinomen, wurde nachgewiesen [2, 3]. Hierbei kommt es durch viral bedingte Degradation zellulärer Tumorsupressorproteine zu einer Störung des Zellzyklus und Immortalisation der betroffenen Zellen [36, 37].

Bei einer weltweit insgesamt leicht rückläufigen Inzidenz von OSCC und OPSCC fällt bei den Neuerkrankungen ein Anstieg HPV-positiver Tumoren auf. Besonders Nichtraucher, Nichttrinker, junge Patienten und das männliche Geschlecht sind betroffen [2, 38-40]. Mögliche Ursachen hierfür sind die vermehrte Exposition gegenüber HPV durch eine erhöhte Anzahl von Sexualpartnern und orogenitale Sexualpraktiken [38]. Auch perinatale und oral-zu-oral-Übertragungsmechanismen werden diskutiert [41].

Patienten mit HPV-positiven Tumoren weisen eine bessere Prognose als Patienten mit HPV-negativen Tumoren auf. Die Überlebensrate ist gesteigert, die Rezidivrate vermindert und ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie wurde nachgewiesen [2, 42-44].

Die Risikofaktoren für die Entstehung eines OSCC und OPSCC sind zusammengefasst in Abbildung 1 dargestellt.

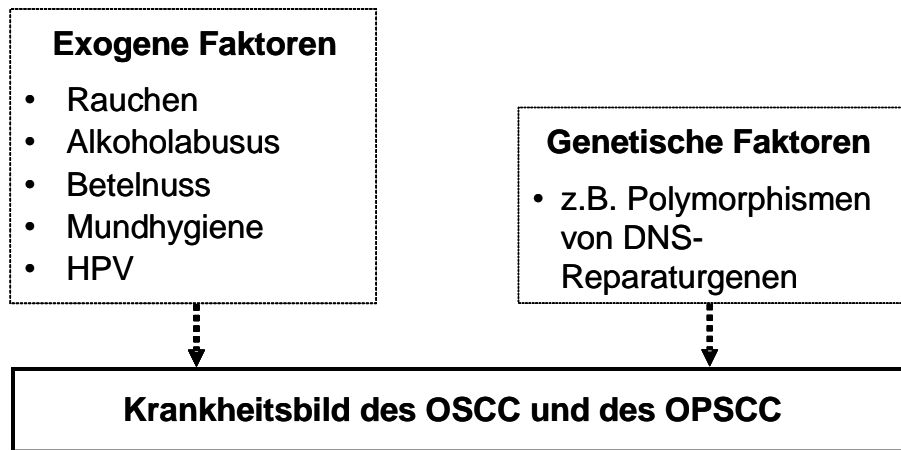


Abbildung 1: Risikofaktoren für das Krankheitsbild des OSCC und des OPSCC

1.1.3 Klassifikation

Nach den Kriterien der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (*Union internationale contre le cancer*, UICC) wird das OSCC und das OPSCC wie folgt unterteilt (Tabellen 1 bis 3, Stadieneinteilung in Tabelle 4) [45]:

Tumorgröße des Primärtumors (T)	Klassifikation
Primärtumor nicht beurteilbar	Tx
Kein Anhalt für Primärtumor	0
<i>Carcinoma in situ</i>	Tis
Tumor bis 2 cm	T1
Tumor von 2 cm bis 4 cm	T2
Tumor mehr als 4 cm	T3
Tumor infiltriert Nachbarstrukturen	T4
OSCC: Tumor infiltriert den kortikalen Knochen, die intrinsische Muskulatur der Zunge, die Gesichtshaut oder die Kieferhöhle OPSCC: Tumor infiltriert den Larynx, die intrinsische Muskulatur der Zunge, den M. pterygoideus medialis, den harten Gaumen oder die Mandibula	T4a
OSCC: Tumor infiltriert das Spatium masticatorium (Inhalt: Ramus mandibulae, Mm. masseter, pterygoideus medialis et lateralis, temporalis kaudal, Teile der A. maxillaris und N. mandibularis,) den Processus pterygoideus, die Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna OPSCC: Tumor infiltriert den M. pterygoideus lateralis, den Processus pterygoideus, den lateralen Nasopharynx, die Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna	T4b

Tabelle 1: Ausdehnung des Primärtumors (T)

Lymphknotenbefall (N)	Klassifikation
Zervikale Lymphknoten können nicht beurteilt werden	Nx
Keine zervikalen Lymphknotenmetastasen	N0
Metastase in solitärem, ipsilateralem Lymphknoten, bis 3 cm	N1
Metastase in solitärem, ipsilateralem Lymphknoten, größer 3 cm, kleiner 6 cm	N2a
Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm	N2b
Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm	N2c
Metastase(n) größer als 6 cm	N3

Tabelle 2: Lymphknotenbefall (N)

Fernmetastasen (M)	Klassifikation
Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	Mx
Keine Fernmetastasen	M0
Fernmetastasen (auch Lymphknoten außerhalb der zervikalen Lymphknoten)	M1

Tabelle 3: Fernmetastasen (M)

Stadium	T	N	M
0	Tis	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	1 oder 2	1	0
	3	0 oder 1	0
IVa	1 oder 2 oder 3	2	0
	4a	0 oder 1 oder 2	0
IVb	Jedes	3	0
	4b	Jedes	0
IVc	Jedes	Jedes	1

Tabelle 4: Stadieneinteilung des OSCC und des OPSCC

1.1.4 Klinische Merkmale

Das OSCC kann an jeder Stelle der Mundhöhle entstehen. Prädelektionsstellen sind der Zungenrand, die Zungenunterseite und der Mundboden. Der Entwicklung eines invasiven Karzinoms kann eine präkanzeröse Läsion der Schleimhaut in Form einer Leukoplakie oder Erythroplakie der Schleimhaut vorausgehen [46, 47].

Bei der klinischen Untersuchung imponiert das OSCC in frühen Stadien als erhabene, indurierte, oft weißlich (Leukoplakie), seltener rötlich (Erythroplakie) gefärbte Plaque oder als unscharf begrenzte, verruköse Schleimhautverdickung. Hier besteht die Gefahr der Fehldiagnose als Prothesendruckstelle oder als unspezifisches Ulcus der Mundschleimhaut. In fortgeschrittenen Stadien entstehen durch die Vergrößerung der Läsion sowohl ulzeröse als auch exophytische Anteile. Typisch ist ein irregulärer, aufgeworfener, derber Randwall [47].

Weitere klinische Symptome eines OSCC stellen gelockerte Zähne, verminderter Prothesenhalt und in einigen Fällen, in Abhängigkeit von der Lokalisation, Schmerzen dar. Oft bleiben die Tumoren lange asymptomatisch und werden zufällig beim Zahnarztbesuch entdeckt. Sprachstörungen durch beeinträchtigte Zungenmobilität, Schluckbeschwerden, Stauungssymptomaten der Kopfspeicheldrüsen durch Verlegung von Ausführungsgängen und pathologische Frakturen im Kieferbereich sind Symptome lokal fortgeschrittener OSCC. Aus Patientensicht sind die Hauptgründe für das Aufsuchen eines Arztes oder Zahnarztes das Auftreten von Schmerzen, insbesondere einer Odynophagie, sowie das Vorliegen eines intraoralen Tumors [46, 47].

OPSCC gehen in 60% der Fälle von der Tonsilla palatina aus. Auf Grund ihrer Lage werden sie klinisch erst in späten Stadien durch Odynophagie, Zungenbewegungseinschränkung oder lokale Schmerzen auffällig. Es kann bei kranialer Ausbreitungstendenz zu einer Verlegung des Nasenrachenraumes und damit zu einem geschlossenen Naseln oder Ohrenscherzen kommen. Oft ist eine Lymphknotenmetastase durch ihre lokale Größenprogredienz diagnostisch hinweisend. In seltenen Fällen manifestiert sich ein OPSCC primär durch Atemwegsverlegung mit konsekutiver Dyspnoe oder durch eine Kieferklemme nach Infiltration der Kaumuskulatur [46, 48].

1.1.5 Tumorausbreitung

Lokale Tumorausbreitung

Die lokale Tumorausbreitung in unbestrahltem Gewebe folgt größtenteils den anatomischen Strukturen und dem Weg des geringsten Widerstandes. So zeigen Tumoren des Mundbodens eine oberflächliche Ausbreitung entlang des M. mylohyoideus, Tumoren der Zunge eine in die Tiefe entlang der Muskelfasern gerichtete Ausbreitung und Tumoren des Gaumens eine oberflächliche Ausbreitung entlang der palatinalen Schleimhaut. OSCC der Zunge bzw. OPSCC der Tonsillen neigen zu einer Unterminierung von gesundem Gewebe, bei anderen Lokalisationen korreliert die lokale Gesamttumorausbreitung mit der Oberflächenausbreitung [45]. Bei zuvor bestrahltem Gewebe erfolgt die Tumorausbreitung extensiver und nicht entlang anatomischer Gegebenheiten [49]. Lokal kann es zu einer Infiltration des Knochens kommen, wobei auf Grund einer deutlich häufigeren Tumorlokalisierung im Unterkieferbereich die Mandibula stärker betroffen ist als die Maxilla [47]. Die Tumorausbreitung erfolgt hierbei entweder entlang des Parodontalspaltes oder direkt an der Kontaktstelle zwischen Tumor und Mandibula [50].

Lokaler Lymphknotenbefall

Der lokale Lymphknotenbefall erfolgt durch Ausbreitung der Tumorzellen in Form von vom Primärtumor ausgehenden Emboli. Dabei sind vor allem die Lymphknoten der Level I, II, III und seltener IV nach Robbins betroffen [51]. Bei einem die Mittellinie überschreitenden Tumorwachstum, vor allem innerhalb des Zungengrundes und des weichen Gaumens, kommt es zu einem bilateralen Befall der zervikalen Lymphknotenkompartimente. Zu den Risikofaktoren für Lymphknotenmetastasen zählen neben der Lokalisation des Primärtumors seine Größe, eine Tumordicke von über 5 mm, eine histologisch diagnostizierte infiltrative Invasionsfront und eine perineurale oder lymphvaskuläre Invasion [45, 52].

Fernmetastasierung

Für das Tumorwachstum ist eine ausreichende Blutversorgung für den Antransport von Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten nötig. Vermittelt durch angiogenetische Wachstumsfaktoren wie z. B. den *vascular endothelial growth factor* (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF) kommt es zunächst zu einer Neubildung lymphatischer und blutführender Kapillaren. Diese finden

Anschluss an das bestehende Gefäßsystem und ermöglichen so eine systemische Aussaat von Tumorzellen [53, 54].

Durch therapeutische Erfolge einer lokoregionalen Tumorausbreitung gewann die zuvor als sekundär betrachtete Fernmetastasierung von OSCC und OPSCC an Bedeutung. Bevorzugter Ort der Fernmetastasierung bei diesen Tumorentitäten ist die Lunge, gefolgt von den mediastinalen Lymphknoten, der Leber und dem Skelett [55].

1.1.6 Histologische Merkmale

Bei den OSCC und OPSCC handelt es sich vorwiegend um Plattenepithelkarzinome. Diese Tumorzellen weisen histologisch einen Verlust der polaren Ausrichtung und eine Zunahme der Größe auf, sind polygonal bis spindelförmig und zeigen Kernatypien sowie atypische Mitosefiguren. Ist ein Überschreiten der Basalmembran des Epithels durch die dysplastischen Zellen nicht gegeben, liegt ein *Carcinoma in situ* vor. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom des Gebärmutterhalses, bei dem eine Ausbreitung der Dysplasie auf die gesamte Epitheldicke einer Invasion der Basalmembran vorausgeht, kann es beim OSCC und OPSCC auch vorher dazu kommen [45]. Das Überschreiten der Basalmembran ist oft mit einer Stromareaktion verbunden, die durch Ausbildung einer kollagenreichen Stromakomponente, einer Proliferation von Myofibroblasten und durch Neovaskularisation gekennzeichnet ist. Weiterhin kann es zur Invasion von Blutgefäßen, Lymphgefäßen oder Nerven durch Tumorzellen kommen [45].

Der Differenzierungsgrad (*Grading*, G) wird im Vergleich zu normalem Plattenepithel festgelegt, wobei hoch differenzierte Tumoren (G1) diesem am stärksten ähneln. Beim Auftreten von nukleären Pleomorphismen und erhöhter Mitoserate wird von einem mäßig differenzierten Tumor (G2) gesprochen. Bei niedrig differenzierten Tumoren (G3) bestehen eine stark gesteigerte Mitoserate sowie das Vorliegen multipler, unreifer Zellen. Obwohl allgemein der Keratinisierungsgrad von hoch zu schlecht differenzierten Tumoren abnimmt, wird ihm bei der Festlegung des G-Status keine übergeordnete Rolle zugeschrieben. Der Differenzierungsgrad korreliert nicht zwangsläufig mit dem klinischen Verhalten des Tumors [45]. Für prognostische Aussagen ist die Beschaffenheit der Tumordinvasionsfront von Bedeutung, wobei zwischen expansiv verdrängendem und infiltrativem Wachstumsmuster unterschieden wird. Eine zusammenhängende, verdrängend wachsende Tumorfrente ist mit einer besseren

Prognose verbunden als eine infiltrative, durch einzelne Tumorzellnester gekennzeichnete, lose zusammenhängende Tumorfront [45, 56].

1.1.7 Molekulare Merkmale

Im klinischen Alltag wird die Einteilung des OSCC und des OPSCC standardmäßig nach histopathologischen Merkmalen durchgeführt. Um Aussagen über Therapie und Prognose verbessern zu können, wird verstärkt an einer weiteren Differenzierung der Tumoren anhand molekularer Marker geforscht [57]. So bietet der Nachweis von molekularen Markern wie z. B. des *epidermal growth factor receptor* (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, EGFR), des VEGF, des Tumorsuppressorprotein p53 oder von den Zellzyklus beeinflussenden Cyclinen bzw. deren Inhibitoren Anhaltspunkte für das Ansprechen des Tumors auf unterschiedliche Therapieformen und ihre Erfolgsaussichten [54, 57]. Jedoch ist die Studienlage auf Grund der komplexen Interaktionen der einzelnen Marker noch unklar und teils widersprüchlich, so dass sie im Großteil der Fälle noch nicht für die klinische Therapieentscheidung bei OSCC bzw. OPSCC herangezogen werden [57].

1.1.8 Therapie

Nachdem in einer interdisziplinären Tumorkonferenz die kurative Resektabilität des Befundes erörtert wurde, besteht die Primärtherapie des OSCC und des OPSCC in der chirurgischen Exzision des Tumors mit einem histologischen Sicherheitsabstand von 5 bis 10 mm in allen Ebenen. Intraoperativ wird die Befallsfreiheit der Schnittländer mittels Schnellschnittdiagnostik kontrolliert [46, 48, 58].

Handelt es sich um kleine Tumore (T1), kann die Rekonstruktion mit Hilfe von lokalen Lappenplastiken erfolgen, wie z. B. dem myokutanen Platysmalappen [59]. Nach Resektion ausgedehnter Befunde wird oft der Einsatz größerer, gestielter Fernlappen nötig, z. B. des muskulokutanen Pectoralis-major-Lappens oder von freien, mikrovaskulär anastomosierten Transplantaten, z. B. des fasziokutanen radialen Unterarmlappens [60, 61]. Muss neben dem Verlust von Weichgewebe auch ein ossärer Resektatdefekt therapiert werden, so kann der Einsatz mikrovaskulär anastomosierter osteomuskulokutaner Transplantate, z. B. aus der Beckenregion, erfolgen [62]. Prinzipiell ist auch eine zweizeitige ossäre Rekonstruktion möglich, wobei ein primärer Weichgewebsverschluss anzustreben ist [46].

Auch bei einer klinischen N0-Situation sollte unabhängig von der TumorgroÙe eine selektive zervikale Lymphadenektomie der Regionen I-III durchgeföhrt werden, da hier in bis zu 20-40% okkulte Lymphknotenmetastasen vorliegen [58, 63]. Besteht klinisch der Verdacht auf eine lymphogene Metastasierung (cN+), so wird die Durchföh rung einer modifizierten radikalen Lymphadenektomie der Regionen I-V unter Erhalt der V. jugularis interna, des M. sternocleidomastoideus und des N. accessorius empfohlen [58, 64]. Die operative Entfernung letztgenannter Strukturen ist bei Tumorinfiltration, dann im Sinne einer radikalen Lymphadenektomie, angezeigt [46]. Bei mittelliniennahen Tumoren, einem T3- oder T4-Tumor oder dem Befall mehrerer ipsilateraler Lymphknoten steigt das Risiko einer kontralateralen Lymphknotenmetastasierung. Daher ist in diesen Fällen eine kontralaterale selektive Lymphadenektomie zu empfehlen [65].

Alternativ kann bei frühen Tumorstadien (I und II) ein primär kurativer strahlentherapeutischer Heilungsansatz gewählt werden. Einen palliativen Charakter erhält die Radiotherapie bei lokal ausgedehntem, inoperablem Tumorwachstum und bei multimorbiden Patienten, deren Operationsrisiko stark erhöht ist [66, 67].

Die Indikation für eine spätestens sechs Wochen nach dem Eingriff beginnende adjuvante Radiotherapie besteht bei großen Primärtumoren (T3 und T4), einem Sicherheitsabstand der Resektionsränder unter 3-5 mm, Lymphknotenbefall, einer Invasion der LymphgefäÙe oder einer perineuralen Invasion [58, 68].

Der Sitz des Primärtumors wird dabei mit einer Gesamtdosis von ca. 70 Gy über einen Zeitraum von fünf bis sieben Wochen mit einer wöchentlichen Dosis von ca. 10 Gy bestrahlt. Für die Lymphabflusswege wird eine Dosis zwischen 45 Gy und 60 Gy gewählt [46]. Es existieren unterschiedliche Fraktionierungsschemata, wobei eine Dosis von 2 Gy pro Tag als konventionelle, von 1,2 Gy pro Tag als hyperfraktionierte und von mehr als 2 Gy pro Tag als hypofraktionierte Bestrahlung bezeichnet wird. Die Hypofraktion findet Anwendung bei palliativem Therapieziel; für die Hyperfraktion wurde bei kurativer Zielstellung vor allem bei Patienten unter 60 Jahren eine Verbesserung im Gesamtüberleben nachgewiesen [58, 69].

Für kleine Primärtumore (T1 und T2) mit singulären Lymphknotenmetastasen und ohne weitere Risikofaktoren kann gegenwärtig keine eindeutige Empfehlung für eine adjuvante Radiotherapie gegeben werden [70].

Bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien (III und IV) besteht die Option einer kombinierten Radiochemotherapie, um eine Reduktion lokoregionaler Rezidive und Fernmetastasen zu erreichen [71]. Das Zytostatikum Cisplatin stellt als Monopräparat und in Kombination mit dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil den therapeutischen Goldstandard, in Form einer simultanen Gabe während der Radiotherapie oder adjuvant, dar [46, 58].

Weiterhin sind immuntherapeutische Therapiestrategien in der klinischen Entwicklungsphase. Ziel ist es, das körpereigene Immunsystem aktiv oder passiv gegen Tumorantigene zu sensibilisieren und so das Tumorstadium zu hemmen. Ein Angriffspunkt der Immuntherapie ist die Inhibition der Neoangiogenese mittels Antikörpern gegen VEGF (Bevacizumab) und EGFR-Inhibitoren (Erlotinib), die sich in frühen klinischen Untersuchungsphasen befinden und augenblicklich zunächst palliativen Charakter besitzen [71, 72]. Primärprophylaktische Ansätze zur Vermeidung der Entstehung von OSCC und OPSCC sind mit der Impfung gegen HPV16 und 18 gegeben, da diesen Viren eine Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben wird [2, 73].

1.1.9 Prognose

Für die Einschätzung der Prognose sind neben den in den Tabellen 1 bis 4 aufgeführten Merkmalen die in Tabelle 5 dargestellten Tumoreigenschaften relevant:

Faktoren und Tumormerkmale mit prognostischer Relevanz	Referenz
R0/R1-Zustand der Resektionsränder	[74]
Eigenschaft der histologischen Tumordinvasionsfront	[56, 75]
Extrakapsulärer Lymphknotenbefall	[74]
Tumordicke	[52]
HPV-Status	[42, 43]

Tabelle 5: Tumoreigenschaften mit prognostischer Relevanz

Die ungewichtete 5-Jahres-Überlebensrate konnte in den letzten Jahren nur unwesentlich verbessert werden und liegt bei ca. 50% [58]. Den stärksten Einfluss auf die Prognose besitzt dabei das T-Stadium. So sinkt die Überlebensrate von 80% bei T1-Tumoren auf 45% bei T4-Tumoren [46].

Eine Ausnahme hiervon bilden kleine Primärtumoren mit Knocheninvasion, die definitionsgemäß unabhängig von der Größe als T4 klassifiziert werden. Gelingt die

Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand, können sie im Vergleich zu T3-Tumoren, die definitionsgemäß ohne Infiltration von Nachbarstrukturen eine Größe von mehr als 4 cm besitzen, eine höhere 5-Jahres-Überlebensrate zeigen [76].

Bei einem Fünftel der Patienten kommt es zu einem Lokalrezidiv, wobei dieses in 87% der Fälle innerhalb der ersten drei Jahre nach der Erstdiagnose auftritt. Dies unterstreicht die Bedeutung regelmäßiger Tumornachsorgeuntersuchungen, die im 1. und 2. Jahr nach Diagnosestellung im Abstand von drei und im 3. bis 5. Jahr nach Diagnosestellung im Abstand von sechs Monaten erfolgen sollten [58, 77].

1.2 Tumormikromilieu

Sowohl an der Grenzfläche zwischen Tumorparenchym und umgebendem Stroma als auch intratumoral lässt sich eine immunologische Interaktion zwischen Tumorzellen und Abwehrzellen nachweisen. Hierbei ist es sinnvoll, seitens des Stromas zwischen Zellen des Binde- und Stützgewebes (z. B. Endothelzellen, Fibroblasten und Perizyten) und Zellen der angeborenen und adaptativen Immunantwort (z. B. Makrophagen, Lymphozyten und dendritischen Zellen) zu unterscheiden. Mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle und Zytokine kommt es zu einer immunologischen Reaktion, die die weitere Tumorprogression positiv oder negativ beeinflusst [78].

Für ortsständige Perizyten, die Endothelzellen aufgelagert sind, wurde gezeigt, dass sie durch Aktivierung der angeborenen Immunantwort tumorhemmende Eigenschaften besitzen [79]. Bei infiltrierenden Makrophagen kann in Abhängigkeit vom Aktivierungsweg ein proinflammatorischer, tumorhemmender Subtyp oder ein antiinflammatorischer Subtyp entstehen, der für ein Mikromilieu verantwortlich gemacht wird, das die Tumorprogression begünstigt [80]. Allerdings wurde ebenso publiziert, dass eine niedriggradige Reaktion des Immunsystems auf Tumorantigene für die Karzinogenese essentiell ist [81].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die sich dynamisch ändernde Zusammensetzung des Mikromilieus von entscheidender Bedeutung für die Tumorentwicklung ist [78].

1.3 Tumor-infiltrierende Lymphozyten

1.3.1 T-Lymphozyten

Als eine Untergruppe Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) werden T-Lymphozyten als Antwort des Immunsystems auf eine Antigenexpression durch Tumorzellen

angesehen [82]. Besonders zytotoxische CD8+ T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der zellulären Tumorabwehr. Sie produzieren Interferon(IFN)- γ , Granzym B sowie Perforin, können chemotaktisch gesteuert zum Tumor migrieren und tragen durch die Induktion von Apoptose zur Bekämpfung von maligne entarteten Zellen bei [78]. Weiterhin gilt ein erhöhtes Level von CD8+ T-Zellen als prognostisch günstiger Faktor bei Subgruppen oropharyngealer Karzinome [83].

1.3.2 Regulatorische T-Zellen

Die Rolle von regulatorischen T-Zellen (T_{REG}) bei der Tumorprogression wird kontrovers diskutiert. Ihnen werden einerseits immunsuppressive Eigenschaften durch die Hemmung von Effektorzellen und somit eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben. Auch ist das Vorliegen von infiltrierenden T_{REG} bei einigen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert [84]. Andererseits wurde ihr Auftreten mit einer besseren Prognose z. B. bei Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung gebracht [85]. Ein Erklärungsansatz für diese gegensätzlichen Wirkungen ist die Spezifität jedes einzelnen Tumormikromilieus. Durch sie kann es zur Rekrutierung unterschiedlicher Subgruppen von T_{REG} kommen, bzw. der Effekt einer Subgruppe sich je nach Mikromilieu hemmend oder fördernd auf das Tumorstadium auswirken [86].

1.3.3 B-Lymphozyten

Funktion

B-Lymphozyten sind ein zellulärer Bestandteil des adaptativen Immunsystems. Sie leiten sich von Vorläuferzellen im Knochenmark ab, stellen 10-20% der zirkulierenden Lymphozyten dar und sind weiterhin im peripheren lymphatischen Gewebe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Gastrointestinaltrakt) anzutreffen [87]. B-Lymphozyten werden in B1- und B2-Lymphozyten unterteilt. B2-Lymphozyten repräsentieren den Großteil der Lymphozyten und sind in der Lage, sich nach Bindung von Antigenen über den B-Zell-Rezeptor-Komplex mit Hilfe von CD4+ T-Helfer-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen zu differenzieren [87, 88]. B1-Lymphozyten sind im Vergleich dazu größer, weisen ein charakteristisches Oberflächenantigenprofil auf (u.a. CD11b, CD21, CD23 und CD43) und sind vor allem in der Peritoneal- und Pleurahöhle, aber auch in der Marginalzone der Milz anzutreffen. Sie werden weiter in CD5-positive (B1a) und CD5-negative (B1b) B1-Lymphozyten unterteilt. Funktional wird B1-Lymphozyten eine Rolle bei der T-Zell-unabhängigen

Sekretion natürlicher Antikörper und bei der mukosalen Immunität zugeschrieben [88, 89].

Die Funktion von B-Lymphozyten bei der Tumorabwehr ist nicht abschließend geklärt. Bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich konnte eine Verbesserung der Überlebensrate durch die Präsenz und Aktivierung intratumoraler B-Lymphozyten nachgewiesen werden [90]. Weiterhin besitzen peritumorale B-Lymphozyten in Lymphknotenmetastasen dieser Tumorentität einen positiven Effekt auf das krankheitsfreie Überleben der Patienten und es ist eine erhöhte Anzahl von Tumorinfiltrierenden B-Lymphozyten in Metastasen im Vergleich zum Primärtumor ermittelt worden [91]. Auch beim Brustkrebs besteht ein positiver Effekt der Infiltration von B-Lymphozyten in das Tumorgewebe auf das metastasenfreie Überleben [92, 93].

Dagegen wurde in murinen Tumormodeluntersuchungen eine nachteilige Wirkung von B-Lymphozyten auf die Tumorabwehr durch die Produktion von Interleukin (IL)10 und die Aktivierung immunsuppressiver Makrophagensubtypen nachgewiesen [94-96].

Nachweismethoden

B-Lymphozyten weisen eine Reihe charakteristischer, immunphänotypischer Unterscheidungsmerkmale an ihrer Zelloberfläche auf, die sich durch immunhistochemische Anfärbung zur Darstellung in histologischen Präparaten eignen. Hierzu zählt CD20, ein Oberflächenantigen, das sich auf Vorläuferzellen von B-Lymphozyten und auf ausgereiften B-Lymphozyten nachweisen lässt [97]. Es besitzt eine Größe von 33 kDa, weist extrazelluläre, transmembranöse und zytoplasmatische Domänen auf und dient als Angriffspunkt für den monoklonalen Antikörper Rituximab in der Therapie maligner B-Zell-Lymphome [98]. Die biologische Funktion von CD20 ist nicht abschließend geklärt. Untersuchungsergebnisse reichen von Aktivierung und Proliferation bis hin zur Apoptoseinduktion. Auch eine Eigenschaft als Kalziummembrantransporter wird diskutiert [97, 98].

1.4 HPV

HPV sind doppelsträngige DNS-Viren mit einem ikosaedrischen Proteinkapsid, einem Durchmesser von ca. 60 nm und einer Genomgröße von ca. 8000 Basenpaaren. Ihr Genom ist in eine frühe (*early*, E), späte (*late*, L) und eine nicht kodierende Region unterteilt. In der E-Region sind sechs, für frühe, replikative Vorgänge verantwortliche und in der L-Region zwei für die Kapsidbildung benötigte Proteine kodiert [99].

Über 120 humanpathogene Subtypen der zur Familie der Papillomaviridae gehörenden HPV wurden beschrieben. Sie infizieren vor allem Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute des Ano-Genital-Bereiches sowie des Mund-Rachen-Raumes und können benigne und maligne Neoplasien auslösen [99, 100]. Es wird bei den HPV bezüglich des Potentials zur Auslösung maligner Transformationen eine Unterteilung in Niedrig-Risiko-Typen (z. B. 6 und 11) und Hoch-Risiko-Typen (z. B. 16, 18, 31 und 45) vorgenommen. Niedrig-Risiko-Typen verursachen Warzen wie die *Verruca vulgaris* der Haut oder die genitalen *Condylomata acuminata* [99, 101]. Die Hoch-Risiko-Typen werden als Ursache für die Entstehung des Gebärmutterhalskrebses angesehen und spielen eine Rolle in der Genese von Analkarzinomen sowie malignen epithelialen Tumoren des Oropharynx, wobei vor allem die Übergangszone zwischen Plattenepithel und Zylinderepithel sowie das tonsilläre Kryptenepithel für eine transformierende HPV-Infektion anfällig sind [35, 37, 102-104].

Onkogene Eigenschaften

In der frühen Infektionsphase liegt das HPV-Genom extrachromosomal vor; dies wird als episomaler Zustand bezeichnet [100]. In späteren Infektionsstadien wird es in das Wirtsgenom integriert. Hierdurch kommt es zu einer Überexpression der viralen Proteine E6 und E7, die durch Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 und des Retinoblastom-Proteins (pRb) für die onkogenen Eigenschaften der HPV-Hoch-Risiko-Typen hauptsächlich verantwortlich gemacht werden [99]. Weiterhin führt die Integration der HPV-DNS zu einer Expressionshemmung und somit zu einem Verlust der kontrollierenden Eigenschaften des proapoptischen Proteins E2 [105, 106].

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein wichtiger Regulator der Zellzyklusaktivität. Bei zellulärem Stress oder Schäden an der DNS induziert p53 einen Stillstand des Zellzyklus bzw. die Apoptose. Durch E6 kommt es zu einem vermehrten Abbau sowie zu einer Transkriptionshemmung von p53, wodurch die den Zellzyklus regulierende Funktion dieses Proteins beeinträchtigt wird [100, 107]. Weiterhin kommt es durch E6 zu einer Aktivierung des Enzyms Telomerase, was eine Aufhebung der natürlichen Zellseneszenz nach sich zieht [108].

Das Protein pRb ist für die Stabilisierung der Zelle in der postmitotischen Phase verantwortlich und wird ebenfalls zu den Tumorsuppressor-Proteinen gezählt. Es hemmt durch Bindung die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F, der die Transkription

von für die Synthese-Phase des Zellzyklus relevanten Genen fördert [100]. Bei proliferativen Signalen wird pRb mittels Phosphorylierung durch die Cyclin-abhängige Kinase-4 (Cdk-4) inaktiviert. Das Cdk-4-Inhibitor-Protein p16INK4a, das durch Transkription des Cdk-4-Inhibitor-Gens p16^{INK4A} entsteht und kurz p16 genannt wird, verhindert durch Inhibition der Cdk-4 eine Phosphorylierung des pRb und eine damit verbundene Transition von der postmitotischen zur Synthese-Phase [99, 106].

Das virale Protein E7 bindet an das aktive pRb und führt zu seinem Abbau. Es kommt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und somit zum Eintritt der Zelle in die proliferative Synthese-Phase [100]. Die Überexpression von E2F führt über einen positiven Feedbackmechanismus zu einem Anstieg der p16-Konzentration. Da jedoch nicht die Cdk-4, das von p16 regulierte Zielprotein, für den Abbau des pRb verantwortlich ist, sondern das virale Protein E7, führt dies nicht zu einer Hemmung der E2F-Aktivität [99, 106, 109].

Zusammenfassend führt die Integration der DNS von Hoch-Risiko-HPV-Typen in das Genom der Wirtszelle durch Expression viraler Proteine zu einer Apoptosehemmung sowie zu einem Eintritt in die Synthese-Phase. Der immunhistochemische Nachweis einer Überexpression von p16 dient als indirekte Nachweismethode für onkogen transformierende HPV-Virus-DNS [106, 110, 111]. Schematisch ist dies in Abbildung 2 dargestellt, siehe S. 21.

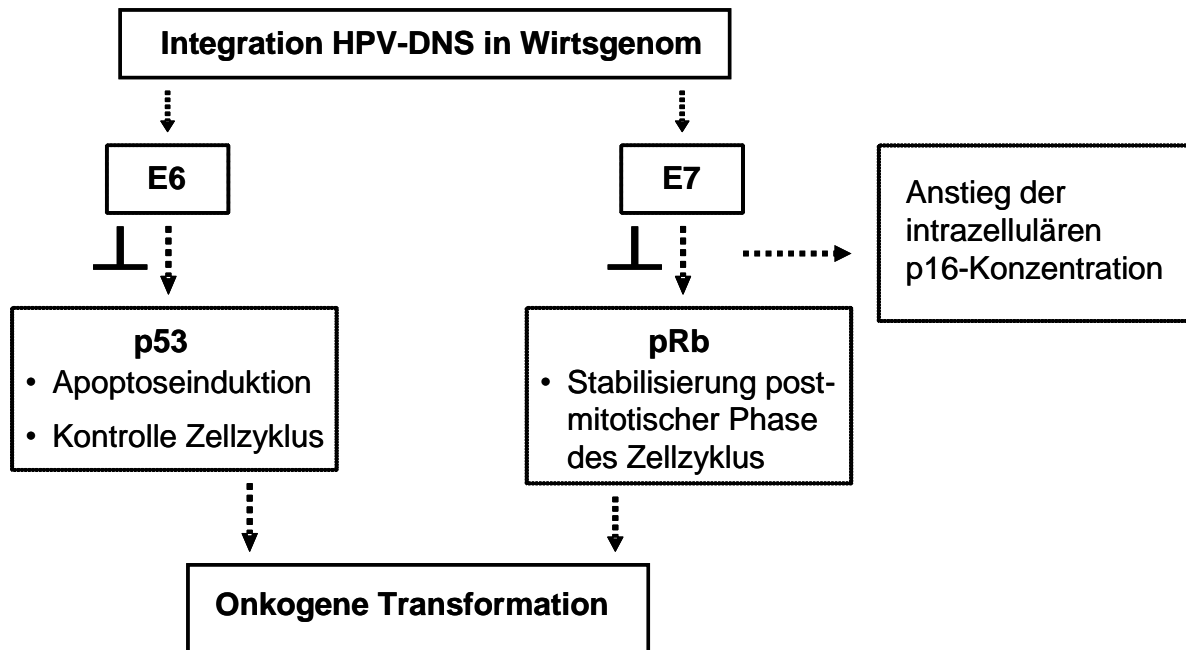


Abbildung 2: Schematische Darstellung der onkogenen Wirkung der viralen Proteine E6 und E7 auf die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb. Durch die Degradation von pRb kommt es nach Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F zu einem indirekten Anstieg der intrazellulären p16-Konzentration.

1.5 Tumor infiltrierende Lymphozyten und HPV-Status

Patienten mit HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen haben ein höheres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben [44]. Dies steht möglicherweise mit einer vermehrten Radiosensivität dieser Tumoren in Verbindung [112]. Weiterhin bestehen Unterschiede im Bereich der zellulären Antwort des adaptativen Immunsystems in Abhängigkeit vom HPV-Status. Es konnte gezeigt werden, dass bei HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen vermehrt CD8+ T-Lymphozyten peripher zirkulieren [83]. Auch im Bereich des Tumormikromilieus bestehen Unterschiede in Abhängigkeit vom HPV-Status. HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome sind verstärkt durch CD8+ Lymphozyten und T_{REG} infiltriert [113, 114]. Weiterhin wurden intratumoral HPV-reaktive T-Zellen in HPV-assoziierten OPSCC nachgewiesen [115, 116]. Eine verminderte Antigenprozessierung könnte einen tumoralen Evasionmechanismus darstellen [116]. Die Rolle von tumorinfiltrierenden T_{REG} wird kontrovers diskutiert, da sie eine Hemmung der adaptativen Immunantwort bedeuten könnten. Allerdings wird in aktuellen Publikationen vermehrt ein prognostisch günstiger Einfluss dieser T-Zell-Subgruppe propagiert [114, 117]. In Anbetracht der ätiologischen Bedeutung von HPV bei der Entstehung eines OSCC oder OPSCC besteht die Forderung, nicht nur

Mädchen zur Prävention von Gebärmutterhalskrebs, sondern auch Jungen gegen HPV impfen zu lassen. Hierdurch käme es zu einer frühen Bildung HPV-spezifischer T-Zellen, die die Virusinfektion rechtzeitig verhindern könnten [118].

Zusammenfassend zeigen HPV-assoziierte Karzinome der Kopf-Hals-Region ein spezifisches Immunprofil, das einen Erklärungsansatz für die günstigere Prognose dieser Tumorentität bieten könnte [117].

1.6 Fragestellung

Die Bedeutung von HPV als karzinogener Faktor in der Entstehung von OSCC und besonders von OPSCC wird immer deutlicher [3, 37]. Zusätzlich erfolgt ein vermehrter Nachweis HPV-positiver Karzinome an anderen Lokalisationen im Kopf-Hals-Bereich [38]. Patienten mit einem HPV-positiven OSCC oder OPSCC sind jünger und besitzen eine höhere 5-Jahres Überlebensrate als Patienten mit einem HPV-negativen OSCC oder OPSCC [44, 119]. Unterschiede des Tumormikromilieus zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Karzinomen können dafür verantwortlich sein.

Diese Arbeit hatte die Beantwortung folgender Fragen zum Ziel:

- Lässt sich der publizierte prozentuale Anteil HPV-positiver OSSC und OPSCC an der Gesamtzahl der Karzinome in dem untersuchten Patientenkollektiv bestätigen?
- Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen HPV-Status und klinischen Parametern wie dem Alter, dem Geschlecht oder der TNM-Klassifikation?
- Besteht in Abhängigkeit vom HPV-Status ein Unterschied im Tumormikromilieu mit Bezug auf die Infiltration durch CD20+ B-Lymphozyten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Axioskop 2 Plus mit AxioCam MRc	Zeiss (Oberkochen)
Benchmark XT Färbereinheit	Ventana (Mannheim)
BOND™ vollautomatisiertes Immunhistochemie- und <i>in-situ</i> Hybridisierung-Färbesystem	Leica Mikrosysteme (Wetzlar)
Gewebekühlplatte COP20	Medite (Burgdorf)
Micro Tissue Arrayer 1	AlphaMetrix (Rödermark)
Mikrotom RM2235	Leica Mikrosysteme
Mixing Block MB-102 Thermomixer	Bioer (Hangzouh, China)
Objektträger-Schnelltrockner	Medite
PyroMark Q24-DNS Sequenzierer	Qiagen (Hilden)

2.1.2 Chemikalien und Kits

Binding Puffer	Qiagen
Bond Polymer Refine Detection Kit	Leica Mikrosysteme
CINtec®-p16 Histologie-Kit	Roche mtm (Grenzach-Wyhlen)
Diaminobenzidin	Leica Mikrosysteme
DNS-Größenstandard 50 bp	Jena Bioscience (Jena)
Epitope Retrieval Solution 1-Pufferlösung	Leica Mikrosysteme
Epitope Retrieval Solution 2-Pufferlösung	Roche mtm
Ethanol	Walter CMP (Kiel)
Hämatoxylin	Leica Mikrosysteme
Hämatoxylin-Eosin (HE)	Leica Mikrosysteme
HotStarTaq Master Mix Kit (DNS-Isolierung)	Qiagen
INFORM® HPV Probes <i>In Situ</i> -Hybridization Assay	Roche mtm
Peroxidase-Block	Leica Mikrosysteme
Post-Primary	Leica Mikrosysteme
Primer GP05	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
Primer GP06	Eurofins MWG Operon
Primer-Mix für DNS-Isolierung	Eurofins MWG Operon

PyroMark Gold Q 24 Reagents 5x24	Qiagen
QIAamp FFPE Tissue Kit 50	Qiagen
RNAscope® HPV 16 Assay Kit	Advanced Cell Diagnostics (Hayward, USA)
Roti®-Safe GelStain	Roth (Karlsruhe)
Streptavidin beschichtete Sepharose <i>beads</i>	GE Healthcare (München)
Trishydroxyaminomethan-Borat-Ethylendiaminetraessigsäure (TBE)-Elektrophoresepuffer	Applichem (Darmstadt)
Xylol	Th. Geyer (Renningen)

2.1.3 Antikörper

CD20 monoklonaler Maus Antikörper, Klon: L 26	Dako (Hamburg)
--	----------------

2.2 Methoden

2.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Auswahl der Patienten des ukb erfolgte mit Hilfe des Patientenverwaltungsprogrammes (medico, Siemens AG) nach folgenden Einschlusskriterien: Im Zeitraum von 1998 bis 2010 wurde die histologisch gesicherte Diagnose eines OSCC oder OPSCC gestellt und konsekutiv erfolgte eine operative Therapie. Intraoperativ gewonnenes Material befand sich im Archiv der Pathologie des ukb in Form von Paraffinblöcken mit Formalin-fixierten Gewebeproben. So konnte eine Datenbank mit insgesamt 197 Patienten erstellt werden, von denen 152 Männer (77,2%) und 45 Frauen (22,8%) waren. Das mediane Alter lag bei 60 Jahren, der jüngste Patient war 25, der älteste 92 Jahre alt.

Der HPV-Status der untersuchten Tumoren wurde freundlicherweise durch J.H. Dreyer und F. Hauck, Institut für Pathologie des ukb, bestimmt. Hierbei kamen drei Verfahren zum Einsatz. Mittels kommerziell erhältlicher *in situ*-Hybridisierungsassays wurden Genome von HPV-Typen mit hohem Transformationsrisiko nachgewiesen (Subtypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 66). Außerdem wurde ein Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) Assay zum Nachweis viraler Genome mittels Konsensusprimern durchgeführt. PCR-Produkte wurden anschließend pyrosequenziert, um den prävalenten HPV-Typ zu bestimmen [4]. Unter Verwendung dieser Verfahren wurde bei

20 Fällen eine HPV-Assoziation nachgewiesen (10,2%; HPV-Hoch-Risiko Typen 16, 33, 35 und 56), 177 Fälle waren HPV-negativ (89,8%).

2.2.2 Anfertigung von Gewebe-Mikroarrays

Nachdem mikroskopisch repräsentative Anteile der in Paraffin eingebetteten Operationsresektate der Plattenepithelkarzinome bestimmt und markiert wurden, erfolgte die Anfertigung von Gewebe-Mikroarrays (*tissue micro arrays*, TMA). Hierzu wurden zunächst auf einem Paraffinträgerblock Stanzzylinder mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm und einer Länge von 3 mm entnommen und verworfen. Anschließend erfolgte die Entnahme von repräsentativem Tumorgewebe aus dem in Paraffin eingebetteten, markierten Gewebblock durch Stanzung und die Einbringung in den vorbereiteten Trägerblock, wobei pro Patient drei Tumorstanzen erstellt und pro Trägerblock 30 bis 57 Stanzen aufgebracht wurden. Durch Erhitzung auf 60°C im Objektträger-Schnelltrockner während 5 min konnte ein Verbund des Träger- und Gewebeparaffins erreicht werden [120].

2.2.3 Erstellung von Schnitten der Gewebe-Mikroarrays

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe-Mikroarrays wurden auf -15°C gekühlt und anschließend in das Mikrotom eingespannt. Es erfolgte die Anfertigung von Gewebeschnitten mit einer Dicke von 3 µm und die Aufbringung auf einen Objektträger mit anschließender Trocknung bei 80°C für 15 min. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit einer Schutzschicht aus Paraffin überzogen und trocken bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.4 Immunhistochemischer Nachweis des p16-Proteins

Unter Verwendung des BOND™ Vollautomaten und des *Polymer Refine* IHC-Protokolls erfolgte die Anfärbung der Schnittpräparate. Zunächst wurde im Präparat enthaltene Peroxidase 5 min mit dem Peroxidase-Blockierungsreagenz inaktiviert. Hiernach wurde mit dem gelösten p16-Antikörper (Bestandteil des CINtec®-p16 Kits) für 20 min inkubiert. Nach Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin erfolgte die Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für 5 min. Durch die antigenspezifische Markierung wird in den untersuchten Schnittpräparaten vorhandenes p16-Protein lichtmikroskopisch mittels chromogener Reaktion sichtbar gemacht.

2.2.5 Auswertung des immunhistochemischen p16-Nachweises

Durch die antigenspezifische Markierung wird in den Schnittpräparaten vorhandenes p16-Protein lichtmikroskopisch mittels chromogener Reaktion sichtbar gemacht. Ein Präparat wurde als p16-Protein positiv bezeichnet, wenn mindestens 70% der Tumorzellen eine nukleäre bzw. zytoplasmatische Färbung zeigten [4]. Exemplarisch sind p16-Protein gefärbte Schnittpräparate in Abbildung 3 dargestellt.

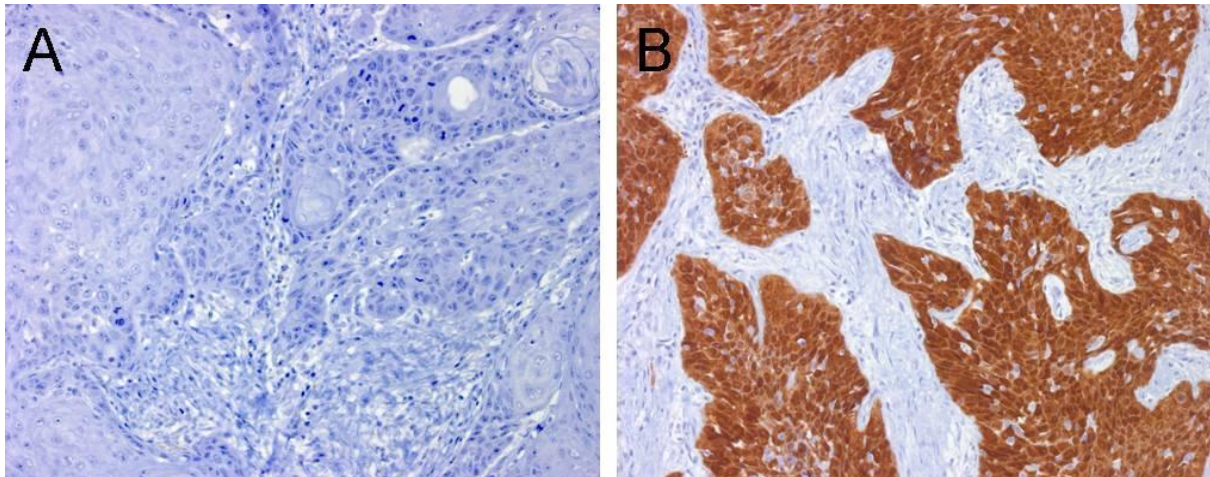


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Darstellung eines p16-Protein-negativen (A) und -positiven Schnittpräparates (B) eines OSCC mit deutlicher nukleärer und zytoplasmatischer Färbung p16-positiver Tumorareale, 200x Vergrößerung.

2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis des CD20-Antigens

Analog zum Nachweis des p16-Proteins erfolgte der immunhistochemische Nachweis des CD20-Antigens unter Verwendung des BOND™ Vollautomaten. Nach Inkubation mit dem CD20-Antikörper (Klon L 26, Dako) und Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin konnten die Schnittpräparate mit Hämatoxylin gegengefärbt werden.

2.2.7 Auswertung des immunhistochemischen CD20-Nachweises

Zunächst wurde bei 200x Vergrößerung ein digitales Bild von jedem Stanzzyylinder mittels der Mikroskop-/Kamerakombination Axioskop 2 Plus mit AxioCam MRc (Fa. Zeiss) erstellt. Die Auswertung der Fotografien erfolgte mittels der Optimas Count Software Version 6.5 (Fa. Media Cybernetics). Zunächst wurde die Fläche des Tumor- und des Stromagewebes für jedes Präparat in mm^2 quantifiziert. Anschließend erfolgte die Markierung CD20-positiver Zellen in Tumor- und Stromagewebe. Hierbei wurden Zellen als CD20+ B-Lymphozyten gewertet, die eine lymphozytenähnliche Morphologie

mit runder Form, prominentem Kern und intensiv braun gefärbtem, saumartigen Zytoplasma besaßen [91, 121]. Eine beispielhafte Färbung ist in Abbildung 4 dargestellt.

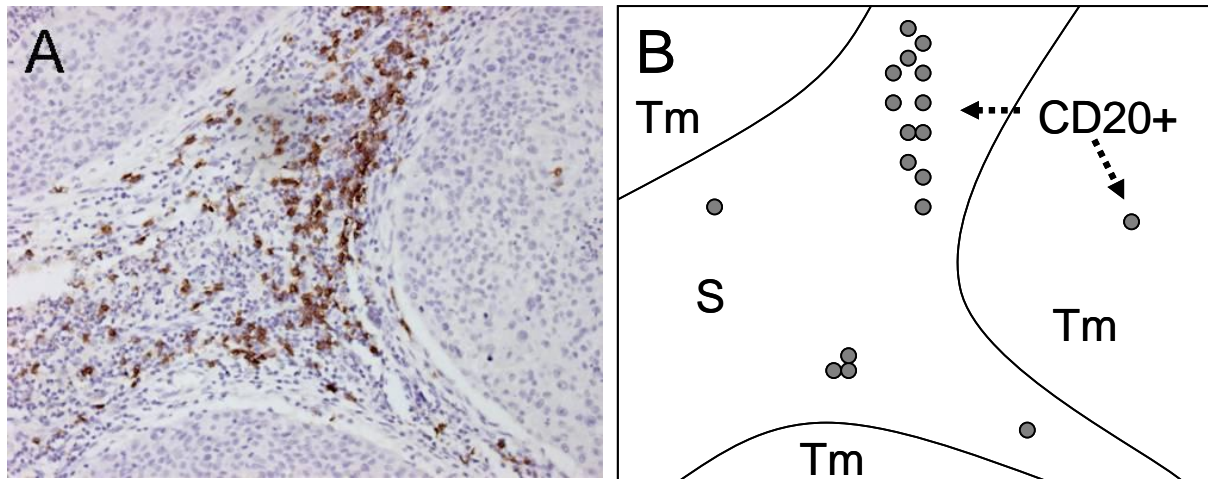


Abbildung 4: Fotografie eines mit CD20-Antikörpern gefärbten Tumorareals 200x Vergrößerung, Lichtmikroskop (Bild A). Schematische Darstellung des Areal (Bild B): Tm – Tumorschnitt, S – Stromafläche, Markierungspunkte – CD20+ B-Lymphozyten. Die digitale Auswertung erfolgte mittels Optimas Count.

2.2.8 Statistische Analyse

Wenn notwendig sind die Ergebnisse als Median und als arithmetisches Mittel aufgeführt. Bei Verwendung des Medians erfolgt zusätzlich die Angabe der Streubreite, bei Verwendung des arithmetischen Mittels die Angabe des Standardfehlers des arithmetischen Mittels (*standard error of the mean*, SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von SPSS 18 (IBM, Armonk, USA) und Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, USA). Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen bei Verwendung von Medianwerten der Mann-Whitney-Test und bei Verwendung des arithmetischen Mittels der ungepaarte t-Test durchgeführt. Bei mehreren Vergleichsgruppen wurde der Likelihood-Quotienten-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von $<0,05$ angenommen. Die grafische Darstellung erfolgte durch Microsoft Power Point 2003 (Microsoft, Redmond, USA).

3 Ergebnisse

Es werden zunächst die Ergebnisse des gesamten Patientenkollektivs gezeigt. Da von einer vermehrten Zahl HPV-positiver Fälle bei den OPSCCs auszugehen war, erfolgt anschließend die isolierte Betrachtung der Ergebnisse dieser Subgruppe [2, 3].

3.1 Gesamtpatientenkollektiv

Es wurden die Gewebeproben von 197 Patienten ausgewertet, von denen 152 Männer (77,2%) und 45 Frauen (22,8%) waren. Das mediane Alter lag bei 60 Jahren, der jüngste Patient war 25, der älteste 92 Jahre alt.

3.1.1 Tumorlokalisation

Bei 109 Patienten (55,3%) war der Primärtumor in der Mundhöhle, bei 69 Patienten (35%) im Oropharynx und bei 18 Patienten (9,1%) im Hypopharynx lokalisiert.

3.1.2 Tumorstadium

Basierend auf der TNM-Klassifikation der UICC lag bei 37 Patienten (19,1%) das Tumorstadium I, bei 24 Patienten (12,4%) das Tumorstadium II, bei 45 Patienten (23,2%) das Tumorstadium III und bei 88 Patienten (45,4%) das Tumorstadium IV vor, wobei die Stadien IVa (84 Patienten), IVb (2 Patienten) und IVc (2 Patienten) unter Stadium IV zusammengefasst wurden. Bei drei Patienten war auf Grund fehlender Daten keine Stadieneinteilung möglich.

3.1.3 Lymphknotenstatus

Bei den postoperativ histopathologisch aufgearbeiteten Lymphknoten zeigte sich bei 58,9% (116 Patienten) ein positiver und bei 38,6% (76 Patienten) ein negativer Tumornachweis. Bei 2,5 % (5 Patienten) war der Lymphknotenstatus nicht bestimmbar. Weiterhin bestand ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Primärtumors (Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx) und der Häufigkeit des Vorliegens von Lymphknotenmetastasen (N>0). Hierbei zeigten in der Mundhöhle lokalisierte Primärtumoren die niedrigste und im Hypopharynx lokalisierte Primärtumoren die höchste Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Dies ist in Abbildung 5 dargestellt, siehe S. 29.

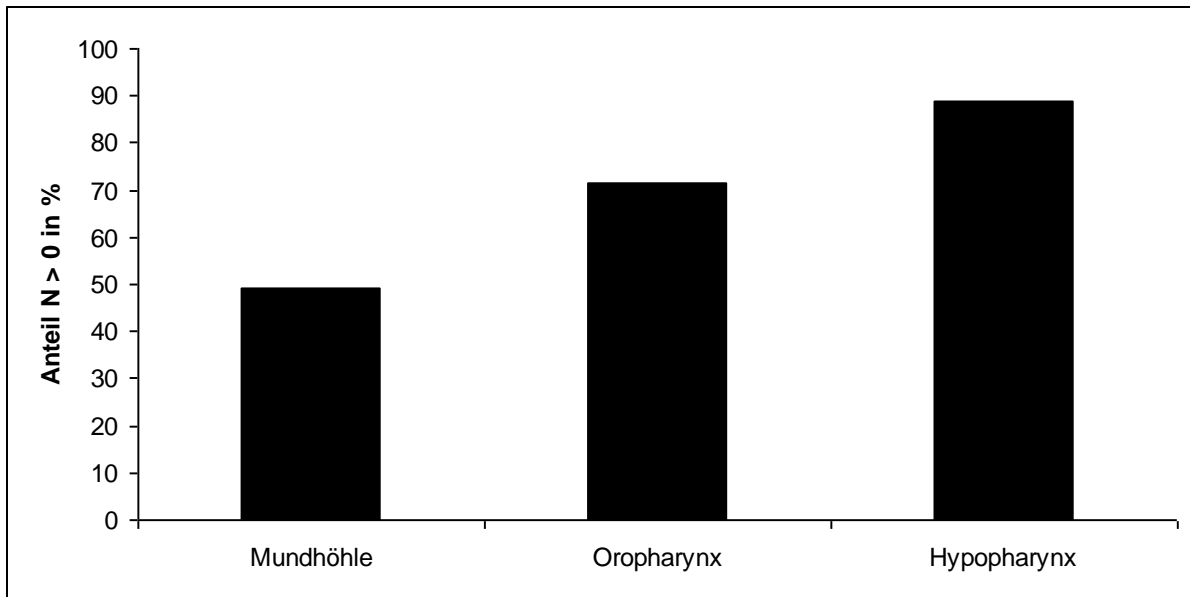


Abbildung 5: Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen (N>0) in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors. Mundhöhle: 49,1% (positive Lymphknoten in 52 von 106 Fällen), Oropharynx: 71,6% (positive Lymphknoten in 48 von 67 Fällen); Hypopharynx: 88,9% (positive Lymphknoten in 16 von 18 Fällen)

3.1.4 Grading

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich histologisch bei 22 Patienten (11,2%) ein hoch differenzierter Tumor (G1), bei 83 Patienten (42,1%) ein mäßig differenzierter Tumor (G2) und bei 76 Patienten (38,6%) ein niedrig differenzierter Tumor (G3). Bei 16 Patienten (8,1%) erfolgte keine Erhebung des Differenzierungsgrades.

3.1.5 p16-Protein

Bei den immunhistochemisch untersuchten Gewebeproben zeigte sich ein Anteil von 11,7% p16-Protein positiver Tumore (23 Patienten) und 88,3% p16-Protein negativer Tumore (174 Patienten). Von den Patienten mit positivem p16-Protein Nachweis wiesen 87% (20 Patienten) einen positiven HPV-Status auf [4].

3.1.6 Assoziation des HPV-Status und des Alters

Im Vergleich zu den 177 HPV-negativen Patienten mit einem medianen Alter von 59 Jahren zeigten die 20 Patienten mit positivem HPV-Status ein signifikant höheres medianes Alter von 66 Jahren, siehe Abbildung 6.

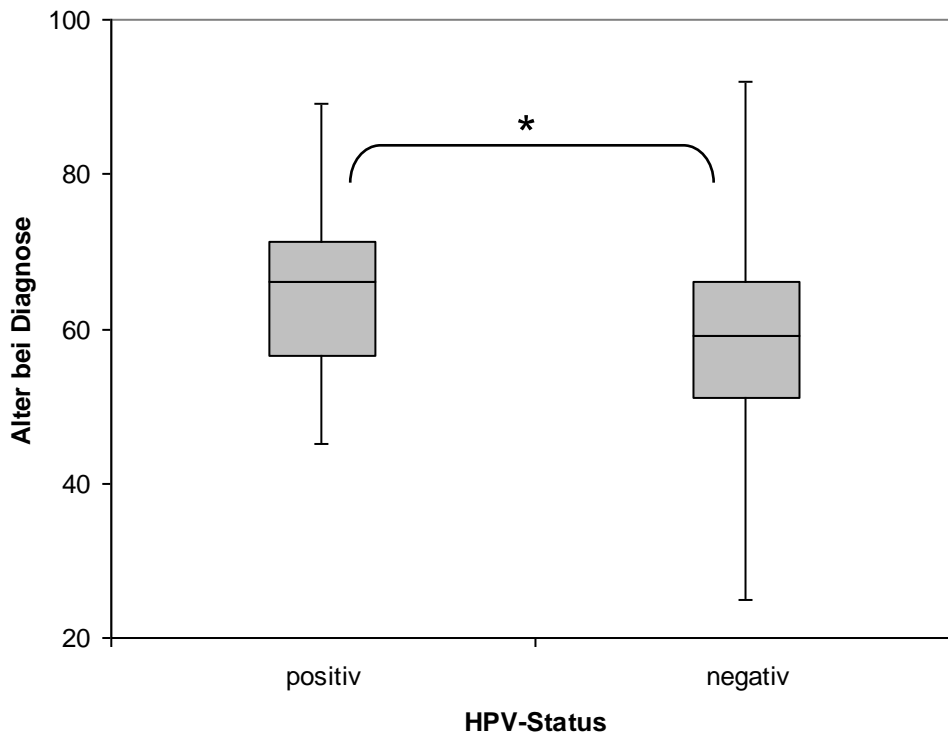


Abbildung 6: HPV-Status und Alter der Patienten: das Alter HPV-positiver Patienten lag im Median bei 66 Jahren; bei HPV-negativen Patienten lag der Median bei 59 Jahren. Dargestellt sind Medianwert, Interquartilenabstand (*interquartile range*, IQR), maximaler und minimaler Wert; * $p < 0,05$ im Mann-Whitney-Test.

3.1.7 Assoziation des HPV-Status und der Lokalisation des Primärtumors

Die HPV-positiven Tumore zeigten ein signifikant verstärktes Auftreten im Bereich des Oropharynx (18 Fälle, $p < 0,0005$ im Likelihood-Quotienten-Test); zwei Fälle fanden sich im Bereich der Mundhöhle. Somit sind 26,1% (18 von 69) der OPSCC HPV-positiv und 1,8% (2 von 108) der OSCC. Alle Hypopharynxkarzinome waren HPV-negativ.

3.1.8 HPV-Status in Abhängigkeit von Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading

Es bestand keine signifikante Assoziation zwischen dem HPV-Status der untersuchten Präparate in Bezug auf das Geschlecht, das Tumorstadium, den Lymphknotenstatus oder das Grading.

3.1.9 HPV-Status und Tumorinvasion CD20+ B-Lymphozyten

Bei den 20 HPV-positiven Präparaten zeigten sich in den Tumorarealen im Median 17 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche bei einer Streubreite von 0 bis 608 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche (arithmetisches Mittel: 64, SEM: 30). Bei den 177 HPV-negativen Präparaten zeigten sich im Median in den Tumorarealen keine CD20+ B-Lymphozyten bei einer Streubreite von 0 bis 133 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche (arithmetisches Mittel: 10, SEM: 1,5). CD20+ B-Lymphozyten wurden im Median signifikant häufiger in Tumorarealen HPV-positiver Präparate nachgewiesen als in Tumorarealen HPV-negativer Präparate siehe Abbildung 7, S.32 (arithmetisches Mittel: $p < 0,0005$; ungepaarter t-Test, Ergebnisse des arithmetischen Mittels nicht grafisch dargestellt).

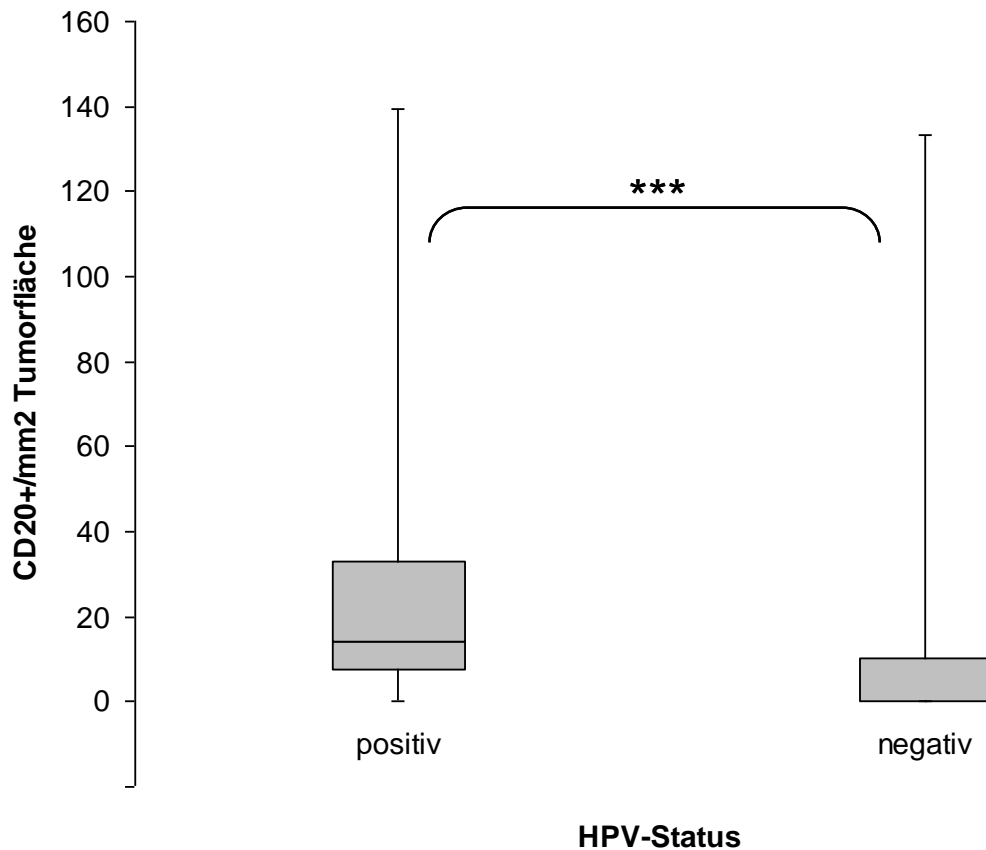


Abbildung 7: Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Tumorgewebe: bei HPV-positiven Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorgewebe bei 17; bei HPV-negativen Tumoren lag der Median bei 0 Zellen pro Quadratmillimeter Tumorgewebe. Dargestellt sind Medianwert, IQR, maximaler und minimaler Wert, *** $p < 0,0005$ im Mann-Whitney-Test, Ausreißer (608 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche) nicht dargestellt.

3.1.10 HPV-Status und Stromainvasion CD20+ B-Lymphozyten

Bei den 20 HPV-positiven Präparaten zeigten sich in den Stromaarealen im Median 240 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stroma bei einer Streubreite von 3 bis 1131 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stroma (arithmetisches Mittel: 349, SEM: 81). Bei den 177 HPV-negativen Präparaten zeigten sich im Median in den Stromaarealen 89 CD20+ B-Lymphozyten bei einer Streubreite von 0 bis 1052 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stromafläche (arithmetisches Mittel: 205 SEM: 19). Es zeigte sich im Median eine Tendenz ($p = 0,06$) zum häufigeren Auftreten von CD20+ B-Lymphozyten in Stromaarealen HPV-positiver Präparate als in Stromaarealen HPV-negativer Präparate, siehe Abbildung 8, S.33 (arithmetisches Mittel $p < 0,05$; ungepaarter t-Test, nicht grafisch dargestellt).

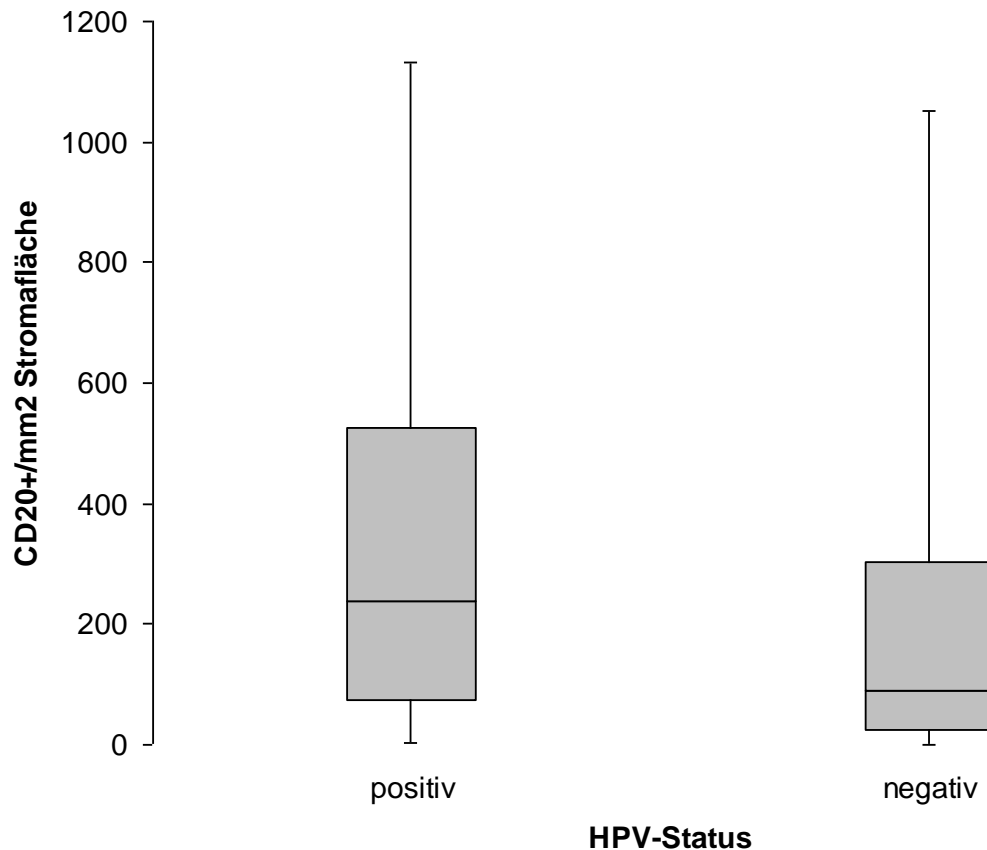


Abbildung 8: Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Stromagewebe: bei HPV-positiven Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stromagewebe bei 240; bei HPV-negativen Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stromagewebe bei 89. Dargestellt sind Medianwert, IQR, maximaler und minimaler Wert, $p=0,06$ im Mann-Whitney-Test.

3.1.11 Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Abhängigkeit von Alter, Lokalisation, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Patienten, der Lokalisation des Primärtumors, dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus oder dem Grading hinsichtlich der Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Tumor- oder Stromagewebe.

3.2 Subgruppe der OPSCCs

Ein OPSCC lag bei 69 Patienten (35% des Gesamtpatientenkollektivs) vor, wobei 54 Männer (78%) und 15 Frauen (22%) waren. Das mediane Alter lag bei 60 Jahren, der jüngste Patient war 33, der älteste 69 Jahre alt.

3.2.1 Tumorstadium

Basierend auf der TNM-Klassifikation der UICC lag bei 5 Patienten (7,2%) das Tumorstadium I, bei 7 Patienten (10,1%) das Tumorstadium II, bei 16 Patienten (23,2%) das Tumorstadium III und bei 40 Patienten (58%) das Tumorstadium IV vor. Bei einem Patienten war auf Grund fehlender Daten keine Stadieneinteilung möglich.

3.2.2 Lymphknotenstatus

Bei 19 Patienten (28,4%) lag ein N0-Status, bei 15 Patienten (22,4%) lag ein N1-Status und bei 33 Patienten (49,3%) lag ein N2-Status vor. Somit zeigten 48 Patienten (71,6%) einen positiven und 19 Patienten (28,4%) einen negativen Lymphknotenstatus. Bei zwei Patienten war auf Grund fehlender Daten keine Einteilung möglich.

3.2.3 Grading

Bei 2 Patienten (2,9%) zeigte sich histologisch ein hoch differenzierter Tumor (G1), bei 29 Patienten (42%) ein mäßig differenzierter Tumor (G2) und bei 30 Patienten (43,5%) ein niedrig differenzierter Tumor. Bei 8 Patienten (11,6%) erfolgte keine Erhebung des Differenzierungsgrades.

3.2.4 p16-Protein

Es zeigte sich bei den immunhistochemisch untersuchten Gewebeproben ein Anteil von 29% p16-Protein positiver Tumore (20 Patienten) und 71% p16-negativer Tumore (49 Patienten). Von den 20 Patienten mit p16-Protein Nachweis zeigten 90% (18 Patienten) einen positiven HPV-Status [4].

3.2.5 Assoziation des HPV-Status und des Alters

Im Vergleich zu den HPV-negativen Patienten mit einem medianen Alter von 59 Jahren zeigten Patienten mit einem positiven HPV-Status ein signifikant höheres medianes Alter von 67 Jahren, siehe Abbildung 9, S.35.

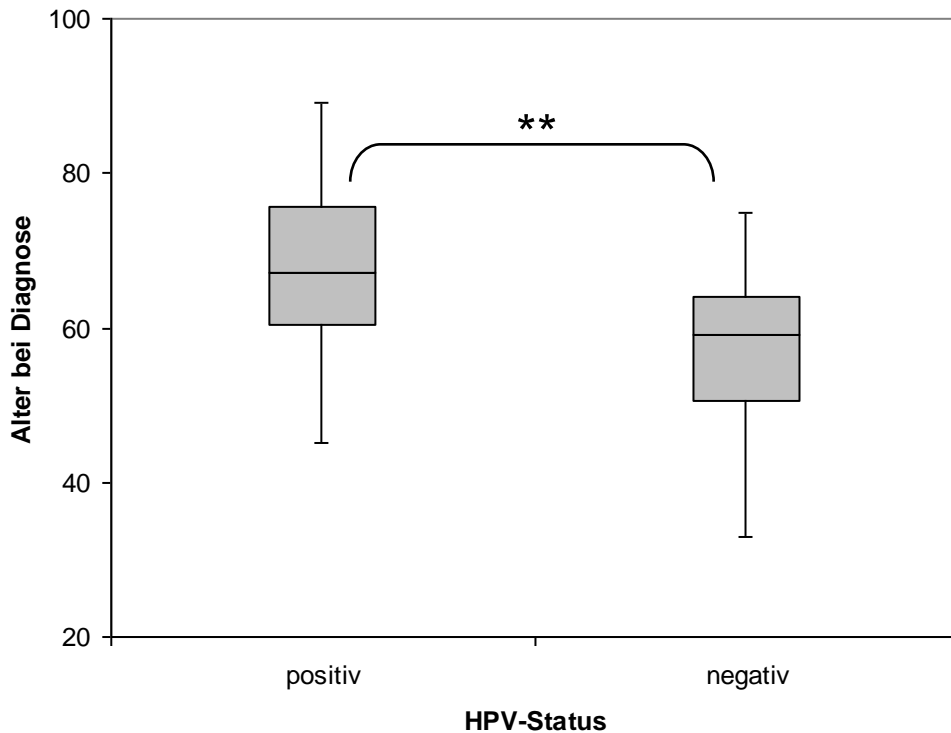


Abbildung 9: HPV-Status und Alter der Patienten: das Alter HPV-positiver Patienten lag im Median bei 67 Jahren; bei HPV-negativen Patienten lag der Median bei 59 Jahren. Dargestellt sind Medianwert, IQR, maximaler und minimaler Wert; ** $p < 0.005$ im Mann-Whitney-Test.

3.2.6 HPV-Status in Abhängigkeit von Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading

Es bestand keine signifikante Assoziation zwischen dem HPV-Status der untersuchten Präparate in Bezug auf das Geschlecht, das Tumorstadium, den Lymphknotenstatus oder das Grading.

3.2.7 HPV-Status und Tumorinvasion CD20+ B-Lymphozyten

Bei den 18 HPV-positiven Präparaten zeigten sich in den Tumorarealen im Median 21 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche bei einer Streubreite von 0 bis 608 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche (arithmetisches Mittel: 70, SEM: 33). Bei den 51 HPV-negativen Präparaten zeigten sich im Median in den Tumorarealen keine CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche bei einer Streubreite von 0 bis 87 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche (arithmetisches Mittel: 8, SEM: 2,4). CD20+ B-Lymphozyten wurden im Median signifikant häufiger in Tumorarealen HPV-positiver Präparate nachgewiesen als

in Tumorarealen HPV-negativer Präparate, siehe Abbildung 10 (arithmetisches Mittel: $p < 0,005$; ungepaarter t-Test, nicht grafisch dargestellt).

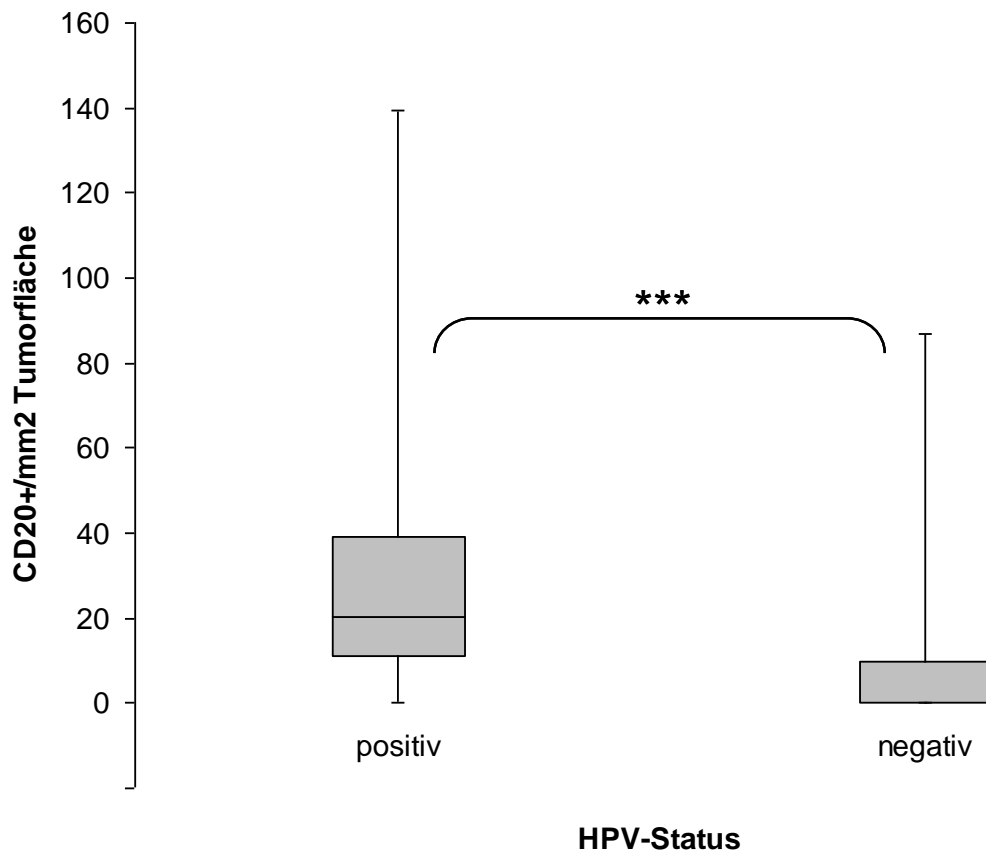


Abbildung 10: Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Tumorgewebe: bei HPV-positiven Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorgewebe bei 21; bei HPV-negativen Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten bei 0 Zellen pro Quadratmillimeter Tumorgewebe. Dargestellt sind Medianwert, IQR, maximaler und minimaler Wert, $***p < 0,0005$ im Mann-Whitney-Test, Ausreißer (608 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Tumorfläche) nicht dargestellt.

3.2.8 HPV-Status und Stromainvasion CD20+ B-Lymphozyten

Bei den 18 HPV-positiven Präparaten zeigten sich in den Stromaarealen im Median 177 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stroma bei einer Streubreite von 3 bis 1131 CD20+ B-Lymphozyten Zellen pro Quadratmillimeter Stroma (arithmetisches Mittel: 347, SEM: 90). Bei den 51 HPV-negativen Präparaten zeigten sich im Median in den Stromaarealen 147 CD20+ B-Lymphozyten bei einer Streubreite von 0 bis 975 CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter

Stromafläche (arithmetisches Mittel: 260, SEM: 38). Es zeigte sich im Median kein signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten CD20+ B-Lymphozyten in Stromaarealen HPV-positiver und in Stromaarealen HPV-negativer Präparate, siehe Abbildung 11 (arithmetisches Mittel: $p=0,3$; ungepaarter t-Test, nicht dargestellt).

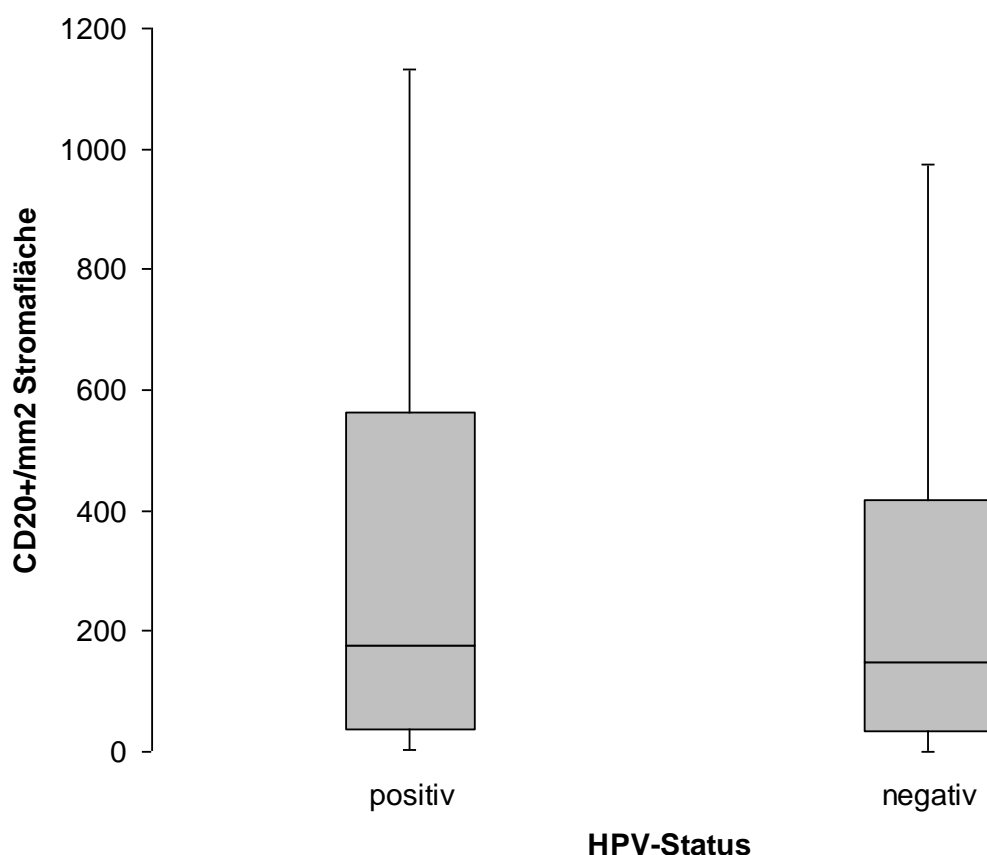


Abbildung 11: Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Stromagewebe: bei HPV-positiven Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stromagewebe bei 177; bei HPV-negativen Tumoren lag der Median CD20+ B-Lymphozyten pro Quadratmillimeter Stromagewebe bei 147. Dargestellt sind Medianwert, IQR, maximaler und minimaler Wert, $p=0,5$ im Mann-Whitney-Test.

3.2.9 Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Abhängigkeit von Alter, Lokalisation, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Patienten, der Lokalisation des Primärtumors, dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus oder dem Grading hinsichtlich der Invasion CD20+ B-Lymphozyten in Tumor- oder Stromagewebe.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, festzustellen, ob histologische Differenzen zwischen HPV-positiven und HPV-negativen OSCC und OPSCC vorliegen, da klinisch Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen in Hinblick auf Therapie und Prognose bestehen [44].

Nachweis der HPV-Infektion

Für den Beweis einer HPV-Infektion in histologischem Material wurde lange Zeit der Nachweis von HPV-DNS bzw. -RNS mittels PCR als Goldstandard angesehen [122-124]. Weiterhin kann das Vorliegen einer HPV-Infektion mittels HPV-DNS und -RNS *in situ*-Hybridisation, immunhistochemischer Färbung des p16-Proteins oder einer Kombination von zwei oder drei dieser Verfahren erfolgen [122]. Dies wird von einigen Autoren bei uneindeutigen Fällen favorisiert, um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen; allerdings ist es kosten- und zeitintensiv [123, 125]. Das bei einer HPV-Infektion vermehrt intrazellulär vorliegende Protein p16 wurde daher als Surrogatmarker vorgeschlagen und zeigte in multiplen Studien eine Sensitivität von nahezu 100% und eine Spezifität von ca. 80% [123, 124]. Kritisch wurde angemerkt, dass Alkohol- und Nikotinabusus die Spezifität des p16-Proteins verringern [124]. Auch scheint eine Korrelation der Lokalisation des Primärtumors mit der Spezifität des p16-Proteins vorzuliegen, wobei z. B. OPSCC eine hohe und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus eine geringe Spezifität aufwiesen [126]. Als Hinweis für die Belastbarkeit des p16-Proteins als HPV-Infektionsmarker kann zusätzlich die Tatsache gewertet werden, dass in der Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie der Gebärmutter der Nachweis von p16-Protein als Surrogatmarker einer HPV-Infektion und damit verbundener erhöhter Malignität verwendet wird [110].

Bereits publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen eine hohe Sensitivität (100%) und Spezifität (87%) des p16-Proteins für das Vorliegen einer HPV-Infektion, wobei der Nachweis von HPV-DNS bzw. -RNS mittels *in situ*-Hybridisation oder PCR als Referenz verwendet wurde [4]. Sie stehen damit im Einklang mit publizierten Ergebnissen [124].

In der Praxis scheint bei negativem p16-Status keine weiterreichende HPV-Nachweismethode indiziert zu sein. Bei positivem p16-Status können unterschiedliche Konfirmationstests verwendet werden, z. B. die HPV-DNS und -RNS

in situ-Hybridisation oder eine HPV-DNS-PCR mit möglicher konsekutiver DNS-Sequenzierung [4, 124, 127]. Weiterhin wurde vorgeschlagen, auf eine Konfirmationstestung zu verzichten, da die bei positivem p16-Status klinisch erwiesene verbesserte Überlebensrate durch den Nachweis von HPV-DNS nicht beeinflusst wurde [128].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der immunhistochemische Nachweis des p16-Proteins eine hohe Sensitivität und Spezifität für das Vorliegen einer HPV-Infektion besitzt und zumindest als Screeningmethode mit möglicher konsekutiver Konfirmationstestung empfohlen werden kann. Auch ist der alleinige Nachweis von p16-Protein als Surrogatmarker einer HPV-Infektion ohne Konfirmationstest bei entsprechender klinischer Fragestellung und insbesondere beim OPSCC in Erwägung zu ziehen.

Klassifikation einer positiven p16-Färbung

Der Schwellenwert, ab dem eine Gewebeprobe als p16-Status positiv gewertet werden kann, wird kontrovers diskutiert. Es existiert in der Literatur ein Spektrum von 1% bis zu über 80% p16-positiver Tumorzellen [125, 128, 129].

Ein zu niedrig angesetzter Schwellenwert könnte für eine Verringerung der Spezifität des p16-Proteins verantwortlich sein, da eine geringradig vermehrte p16-Positivität durch andere Faktoren, wie zum Beispiel eine tumorbedingte Mutationen ohne Zusammenhang mit einer HPV-Infektion, verursacht sein kann [124]. Auch zeigt gesundes Tonsillengewebe ohne Anhalt für HPV-Infektion eine geringradige p16-Expression [130]. Um falsche positive Ergebnisse zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit daher ab einem Schwellenwert von 70% zytoplasmatisch bzw. nukleär gefärbter Tumorzellen von einem positiven p16-Status ausgegangen [4, 127]. Der Schwellenwert von 70% kann ein Grund für den im Vergleich zu publizierten Ergebnissen niedrigen Anteil p16-positiver Tumore sein [129]. Er ist jedoch auf Grund der hohen Spezifität und Sensitivität zu bevorzugen.

Assoziation von HPV und Erkrankungsalter

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv zeigte bei positivem HPV-Status ein signifikant ($p < 0,05$) höheres medianes Alter (66 Jahre) als bei negativem HPV-Status (59 Jahre). Dies steht im Gegensatz zu den in der Literatur veröffentlichten Angaben, demnach Patienten mit positivem HPV-Status ein jüngeres

Erkrankungsalter bezüglich eines OSCC bzw. OPSCC aufweisen als Patienten mit negativen HPV-Status [38, 119]. Ein Grund hierfür könnte der unterschiedliche Maßstab des Nachweises einer HPV-Infektion sein. So plädieren einige Autoren für die alleinige Verwendung des p16-Nachweises als Surrogatmarker für das Vorliegen einer HPV-Infektion, wohingegen andere zumindest den zusätzlichen Nachweis von HPV-DNS für nötig erachten [4, 128, 131]. Dieser uneinheitliche Diagnosestandard sowie unterschiedliche geografische Lokalisationen der Studienpopulationen und der verhältnismäßig hohe Anteil weiblicher Patienten, die bei Diagnosestellung generell älter sind, können für die Diskrepanz des medianen Erkrankungsalters verantwortlich sein [5, 46].

Assoziation von HPV und Lokalisation

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich ein signifikant ($p < 0,0005$) verstärktes Auftreten HPV-positiver Plattenepithelkarzinome im Oropharynx (26% der OPSCC waren HPV-positiv) im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (jeder 50. Patient mit einem OSCC wies einen positiven HPV-Status auf). Dies entspricht bisher publizierten Ergebnissen, wobei bei den OPSCC bereits Inzidenzraten von bis zu 90% HPV-positiver Tumore veröffentlicht wurden [39]. Es unterstreicht die Bedeutung einer getrennten Beurteilung der beiden Tumorentitäten hinsichtlich des HPV-Status, die erst in der neueren Literatur deutlich geführt wird [39, 132].

Seit Mitte der 1980er Jahre ist bekannt, dass HPV im Tonsillenparenchym und im Tumorgewebe von OPSCC nachweisbar ist [3, 133]. Ein Erklärungsansatz für die höhere Prävalenz von HPV beim OPSCC im Vergleich zum OSCC ist der Übergang zwischen mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel der Mundhöhle und dem Epithel des lymphatischen Gewebes im Ursprungsbereich des OPSCC (Waldeyer-Rachenring). Es besteht hier eine Grenzzone ähnlich der Transformationszone der Zervix uteri oder der Übergangszone zwischen mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel und dem einschichtigen Zylinderepithel im Bereich der Linea dentata des Analkanals [103]. Die Basalzellen des Plattenepithels dieser Regionen scheinen nach Infektion mit Hoch-Risiko-HPV-Typen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine maligne Transformation zu durchlaufen als z. B. das Plattenepithel der Mundhöhle oder der Haut [134]. Bislang konnten daraus keine therapeutischen Konsequenzen abgeleitet werden. Aktuell ist die vermehrte Strahlensensitivität des HPV-positiven OPSCC von Interesse, die bei *in vitro*

Versuchen bereits gezeigt werden konnte [112]. Sie bietet die Möglichkeit einer alternativen Primärtherapie unter Umgehung der Nachteile einer chirurgischen Intervention. Auch wird augenblicklich untersucht, ob HPV-positive Plattenepithelkarzinome ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Chemotherapie aufweisen [135]. Der HPV-Status könnte somit zukünftig die Grundlage einer individuellen Krebstherapie darstellen.

Weiterhin lassen sich die ermittelten Daten nicht mit wissenschaftlichen Publikationen vereinbaren, die von einer Epidemie des OSCC mit einem positiven HPV-Status sprechen [2, 136]. In dem in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv zeigt sich eine im Vergleich zum OPSCC niedrige Rate von OSCC mit positivem HPV-Status. Weiterhin ist bei einer Prävalenz von 2-5% HPV-Status positiver OSCC ein Einfluss auf Therapie und Prognose dieser Tumorentität im Gegensatz zum OPSCC fraglich [137].

Tumorinfiltration CD20+ B-Lymphozyten

Als morphologisches Korrelat eines veränderten Prognose- und Therapiecharakters von Plattenepithelkarzinomen mit positivem HPV-Status, besonders des Oropharynx, ist neben den Tumorzellen auch die Konfiguration des Tumormikromilieus und insbesondere die Anwesenheit lymphatischer Zellen von Interesse. So konnte gezeigt werden, dass beim Adenokarzinom des Magens die Invasion des an den Tumor grenzenden Stromagewebes mit Lymphozyten einen positiven Einfluss auf die mittlere Überlebenszeit besitzt [121]. Auch beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches wurde die mögliche Relevanz Tumor-infiltrierender Lymphozyten, insbesondere für Untergruppen von T-Lymphozyten, beschrieben [82]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HPV-positive OSCC und OPSCC eine signifikant ($p < 0,0005$) höhere Invasion CD20+ B-Lymphozyten in das Tumorgewebe aufweisen als HPV-negative OSCC und OPSCC.

Über die potentielle Wirkungsweise von B-Lymphozyten liegen unterschiedliche Auffassungen vor. So konnten nach systemischer Gabe von IL12 bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vermehrt CD20+ B-Lymphozyten peritumoral nachgewiesen werden, was mit einem verbesserten Gesamtüberleben korrelierte. Der Grund hierfür könnte in einer IL12-vermittelten Aktivierung von B-Lymphozyten und damit verbundener Induktion von Tumormunität liegen [90]. Demgegenüber steht die Annahme, dass durch von B-Lymphozyten produziertes IL10 eine antitumorale Immunantwort unterdrückt werden könnte [95, 96].

Die Assoziation von tumorinfiltrierenden, CD20+ B-Lymphozyten und positivem HPV-Status bei OSCC und OPSCC bietet einen neuen Erklärungsansatz für das im Vergleich zu OSCC und OPSCC mit negativem HPV-Status verbesserte Therapieansprechen und die günstigere Prognose [44, 135]. Dies kann neben einer erhöhten Strahlensensibilität HPV-Status positiver plattenepithelialer Tumorzellen auch durch das veränderte Tumormikromilieu begründet sein. Insbesondere ist eine prognostisch günstige Rolle für die bei dieser Tumorentität im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen, vermehrt auftretenden CD20+ B-Lymphozyten denkbar, wie sie für diese Zellen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bereits beschrieben wurde [90]. Da der Nachweis von CD20 als Surrogatmarker für B-Lymphozyten zwar allgemein akzeptiert ist, durch ihn aber sowohl frühe Entwicklungsstufen als auch reife B-Lymphozyten dargestellt werden und auch eine Differenzierung von B1- und B2-Lymphozyten nicht vorgenommen wurde, kann keine Aussage hinsichtlich von B-Zell-Subpopulationen getroffen werden [88, 89, 98].

Ausblick

Zur Prävention des HPV-induzierten Plattenepithelkarzinoms der Zervix uteri wurde 2007 ein bivalenter Impfstoff (*Cervarix*) gegen die onkogenen HPV-Viren 16 und 18 zugelassen. Schon 2006 war ein Vierfach-Impfstoff (*Gardasil*) verfügbar, der eine zusätzliche Immunisierung gegen die Niedrig-Risiko-Typen 6 und 11, die Erreger der Feigwarzen, bietet [73]. Die Impfstoffe enthalten rekombinant hergestellte L1-Proteine der jeweiligen Viruskapside [138]. Die Impfung erfolgt in dreifacher intramuskulärer Injektion bei HPV-nativen Mädchen vor dem ersten Sexualverkehr im Alter von 9-17 Jahren. Hierdurch konnte eine deutliche Reduktion von Krebsvorstufen im Bereich der Zervix uteri erzielt werden und die Impfung wird aktuell durch das Robert-Koch-Institut empfohlen [5, 138, 139]. Auch männliche Jugendliche profitieren von einer Impfung durch die Reduktion des Auftretens genitaler HPV-assoziiertes Läsionen wie Feigwarzen und einer möglichen Verminderung HPV-assoziiertes Penis- und Analkarzinome [102]. Es ist denkbar, dass eine konsequente Impfung aller HPV-nativen Jugendlichen auch eine Reduktion HPV-assoziiertes OPSCC erzielen kann [118]. Um dies belegen zu können, sind prospektive Studien nötig. Ob die Vakzination auch eine signifikante Reduktion HPV-assoziiertes OSCC herbeiführen kann, scheint bei Prävalenzen im Bereich von 5% fraglich. Hier sollte die Prävention klassischer Risikofaktoren wie Rauchen oder Alkoholabusus im Vordergrund stehen.

Eine ausführliche Analyse des Tumormikromilieus beim OSCC und vor allem beim OPSCC in Abhängigkeit vom HPV-Status könnte eine Erklärung für das unterschiedliche prognostische Verhalten liefern. Durch die histologische Färbung von CD20 werden sowohl Vorstufen als auch reife B-Lymphozyten markiert [97, 98]. Um eine genauere Aussage über die Bedeutung der Invasion von CD20+ B-Lymphozyten in Tumorgewebe bei OSCC und OPSCC treffen zu können, wäre eine weitere Differenzierung mittels zusätzlicher histologischer Marker (CD5, CD138) hilfreich [96, 140]. Es könnte so der mögliche Einfluss dieser Zellen auch in prognostischer Hinsicht genauer charakterisiert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Warnakulasuriya S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 45:309-316.
2. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 11:781-789.
3. Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst H, Shepherd P, Finn T, Anagnostopoulos I, Stein H. 1990. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Clin Pathol.* 43:918-921.
4. Dreyer JH, Hauck F, Oliveira-Silva M, Barros MH, Niedobitek G. 2013. Detection of HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma: a practical proposal. *Virchows Arch.* 462:381-389.
5. *Krebs in Deutschland 2007/2008.* 8. ed. Vol. 1. 2012: Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin 2012. 24-27.
6. Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. 2000. 'Oral cancer'--the terminology dilemma. *Oral Dis.* 6:191-193.
7. Benninghoff A, Drenckhahn D, *Anatomie.* 16. ed. Vol. 1. 2003: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 594.
8. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD, Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. 2009. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep.* 22:1277-1282.
9. Chiu CF, Tsai MH, Tseng HC, Wang CL, Tsai FJ, Lin CC, Bau DT. 2008. A novel single nucleotide polymorphism in ERCC6 gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients. *Oral Oncol.* 44:582-586.
10. Bau DT, Tseng HC, Wang CH, Chiu CF, Hua CH, Wu CN, Liang SY, Wang CL, Tsai CW, Tsai MH. 2008. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol.* 44:1047-1051.
11. Chiu CF, Tsai MH, Tseng HC, Wang CL, Wang CH, Wu CN, Lin CC, Bau DT. 2008. A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients. *Oral Oncol.* 44:898-902.
12. Souto GR, Caliani MV, Lins CE, de Aguiar MC, de Abreu MH, Mesquita RA. 2010. Tobacco use increase the number of aneuploid nuclei in the clinically healthy oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 39:605-610.

13. Adams JD, Lee SJ, Hoffmann D. 1984. Carcinogenic agents in cigarette smoke and the influence of nitrate on their formation. *Carcinogenesis*. 5:221-223.
14. Branton PJ, McAdam KG, Winter DB, Liu C, Duke MG, Proctor CJ. 2011. Reduction of aldehydes and hydrogen cyanide yields in mainstream cigarette smoke using an amine functionalised ion exchange resin. *Chem Cent J*. 5:15.
15. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikollajczak A, Zatonski W, Herrero R, Munoz N, Franceschi S. 2003. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev*. 12:25-33.
16. Dombi C, Voros-Balog T, Czegledy A, Hermann P, Vincze N, Banoczy J. 2001. Risk group assessment of oral precancer attached to X-ray lung-screening examinations. *Community Dent Oral Epidemiol*. 29:9-13.
17. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P. 2003. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer*. 105:681-686.
18. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Coglianò V. 2007. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol*. 8:292-293.
19. Seitz HK, Stickel F. 2007. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7:599-612.
20. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. 1997. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis*. 18:1739-1743.
21. Homann N, Karkkainen P, Koivisto T, Nosova T, Jokelainen K, Salaspuro M. 1997. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst*. 89:1692-1697.
22. Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C. 2001. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10:1137-1144.
23. Zygiogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrris A, Kouvaris J, Kelekis N, Kouloulis V. 2011. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol*. 3:2.

24. Huang WY, Winn DM, Brown LM, Gridley G, Bravo-Otero E, Diehl SR, Fraumeni JF, Jr., Hayes RB. 2003. Alcohol concentration and risk of oral cancer in Puerto Rico. *Am J Epidemiol.* 157:881-887.
25. Schlecht NF, Pintos J, Kowalski LP, Franco EL. 2001. Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. *Cancer Causes Control.* 12:579-587.
26. Nair U, Bartsch H, Nair J. 2004. Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative mechanisms. *Mutagenesis.* 19:251-262.
27. Avon SL. 2004. Oral mucosal lesions associated with use of quid. *J Can Dent Assoc.* 70:244-248.
28. IARC. 2004. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 85:1-334.
29. Liao CT, Kang CJ, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Cheng AJ, Chen IH, Huang SF, Yen TC. 2007. Survival of second and multiple primary tumors in patients with oral cavity squamous cell carcinoma in the betel quid chewing area. *Oral Oncol.* 43:811-819.
30. Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. 2008. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control.* 19:895-907.
31. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G. 2005. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 125:1327-1336.
32. Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-867.
33. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, et al. 1993. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med.* 328:1797-1801.
34. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 266:1865-1869.
35. Carter JR, Ding Z, Rose BR. 2011. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 51:103-108.

36. Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. 2009. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol.* 45:486-491.
37. Syrjanen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 17 Suppl 1:58-72.
38. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. 2008. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 26:612-619.
39. Laco J, Vosmikova H, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, Nekvindova J, Vosmik M, Cermakova E, Ryska A. 2011. The role of high-risk human papillomavirus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients: a clinicopathological and molecular study of 46 cases. *Virchows Arch.* 458:179-187.
40. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, Marshak G, Ulanovski D, Feinmesser R. 2004. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope.* 114:915-917.
41. Rintala MA, Grenman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, Syrjanen SM. 2005. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol.* 43:376-381.
42. Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW. 2009. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. *Int J Oral Sci.* 1:119-125.
43. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. 2009. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther.* 5:71-77.
44. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 363:24-35.
45. Barnes L, *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, ed. P. Kleihues. Vol. 1. 2005, Lyon: IARC Press. 164-175.
46. Mast, *Kopf-Hals-Malignome*. 4 ed, ed. Mast. 2009, München: Tumorzentrum München. 243-255.

47. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. 2010. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 46:414-417.
48. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL, Jr. 2009. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 17:88-94.
49. McGregor AD, MacDonald DG. 1989. Patterns of spread of squamous cell carcinoma within the mandible. *Head Neck.* 11:457-461.
50. Brown JS, Lowe D, Kalavrezos N, D'Souza J, Magennis P, Woolgar J. 2002. Patterns of invasion and routes of tumor entry into the mandible by oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 24:370-383.
51. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA. 2008. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 134:536-538.
52. Charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. 2003. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 39:386-390.
53. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 133:275-288.
54. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. 2003. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 3:95-117.
55. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. 2001. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 63:202-207.
56. Bankfalvi A, Piffko J. 2000. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med.* 29:291-298.
57. Kim MM, Califano JA. 2004. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer.* 112:545-553.
58. Wolff KD, Follmann M, Nast A. 2012. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 109:829-835.
59. Futrell JW, Johns ME, Edgerton MT, Cantrell RW, Fitz-Hugh GS. 1978. Platysma myocutaneous flap for intraoral reconstruction. *Am J Surg.* 136:504-507.
60. Hueston JT, McConchie IH. 1968. A compound pectoral flap. *Aust N Z J Surg.* 38:61-63.

61. Benateau H, Laraba C, Alix T, Compere JF. 2002. [Radial forearm or Chinese flap]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 103:35-40.
62. Koshima I, Nanba Y, Tsutsui T, Itoh S. 2004. Sequential vascularized iliac bone graft and a superficial circumflex iliac artery perforator flap with a single source vessel for established mandibular defects. *Plast Reconstr Surg.* 113:101-106.
63. Coatesworth AP, MacLennan K. 2002. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck.* 24:258-261.
64. Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, Shah JP, Suarez C, Medina JE, Kowalski LP, Johnson JT, Strome M, Rodrigo JP, Werner JA, Takes RP, Towpik E, Robbins KT, Leemans CR, Herranz J, Gavilan J, Shaha AR, Wei WI. 2006. Neck dissection: then and now. *Auris Nasus Larynx.* 33:365-374.
65. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC. 2006. Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 28:896-901.
66. de Arruda FF, Puri DR, Zhung J, Narayana A, Wolden S, Hunt M, Stambuk H, Pfister D, Kraus D, Shaha A, Shah J, Lee NY. 2006. Intensity-modulated radiation therapy for the treatment of oropharyngeal carcinoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64:363-373.
67. Inoue T, Yoshida K, Yoshioka Y, Shimamoto S, Tanaka E, Yamazaki H, Shimizutani K, Teshima T, Furukawa S. 2001. Phase III trial of high- vs. low-dose-rate interstitial radiotherapy for early mobile tongue cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51:171-175.
68. Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M. 2004. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 350:1945-1952.
69. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG, O'Sullivan B, Dobrowsky W, Hliniak A, Skladowski K, Hay JH, Pinto LH, Fallai C, Fu KK, Sylvester R, Pignon JP. 2006. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet.* 368:843-854.

-
70. Moergel M, Meurer P, Ingel K, Wendt TG, Al-Nawas B. 2011. Effectiveness of postoperative radiotherapy in patients with small oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and concomitant ipsilateral singular cervical lymph node metastasis (pN1) : A meta-analysis. *Strahlenther Onkol.* 187:337-343.
 71. Hoffmann TK. 2012. Systemic therapy strategies for head-neck carcinomas: Current status. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 11:Doc03.
 72. Cohen EE, Davis DW, Karrison TG, Seiwert TY, Wong SJ, Nattam S, Kozloff MF, Clark JI, Yan DH, Liu W, Pierce C, Dancey JE, Stenson K, Blair E, Dekker A, Vokes EE. 2009. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 10:247-257.
 73. Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brotherton JM. 2012. Human papillomavirus vaccine introduction--the first five years. *Vaccine.* 30 Suppl 5:F139-148.
 74. Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A. 2009. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 38:657-662.
 75. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. 1995. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch.* 427:277-281.
 76. Ebrahimi A, Murali R, Gao K, Elliott MS, Clark JR. 2011. The prognostic and staging implications of bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 117:4460-4467.
 77. Boysen M, Lovdal O, Tausjo J, Winther F. 1992. The value of follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 28:426-430.
 78. Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. 2013. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Front Oncol.* 3:90.
 79. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl ML, Gartner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. 2013. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol.* 14:41-51.

-
80. Hao NB, Lu MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012:948098.
 81. Prehn RT, Prehn LM. 2013. A new kink in an old theory of carcinogenesis. *Theor Biol Med Model.* 10:12.
 82. Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS, Jr. 2008. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun.* 8:16.
 83. Wansom D, Light E, Worden F, Prince M, Urba S, Chepeha DB, Cordell K, Eisbruch A, Taylor J, D'Silva N, Moyer J, Bradford CR, Kurnit D, Kumar B, Carey TE, Wolf GT. 2010. Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 136:1267-1273.
 84. Wang Y, Ma Y, Fang Y, Wu S, Liu L, Fu D, Shen X. 2012. Regulatory T cell: a protection for tumour cells. *J Cell Mol Med.* 16:425-436.
 85. Bron L, Jandus C, Andrejevic-Blant S, Speiser DE, Monnier P, Romero P, Rivals JP. 2013. Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 132:E85-93.
 86. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 12:298-306.
 87. Robbins, *Pathologic Basis of Disease.* 7th edition, ed. Kumar. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 198-199.
 88. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. 2006. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 27:428-433.
 89. Berland R, Wortis HH. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 20:253-300.
 90. van Herpen CM, van der Voort R, van der Laak JA, Klasen IS, de Graaf AO, van Kempen LC, de Vries IJ, Boer TD, Dolstra H, Torensma R, van Krieken JH, Adema GJ, De Mulder PH. 2008. Intratumoral rhIL-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients induces B cell activation. *Int J Cancer.* 123:2354-2361.
 91. Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. 2009. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable

- outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 9:292.
92. Nzula S, Going JJ, Stott DI. 2003. Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res*. 63:3275-3280.
93. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H, Lehr HA, Hengstler JG, Kolbl H, Gehrman M. 2008. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res*. 68:5405-5413.
94. Wong SC, Puaux AL, Chittezhath M, Shalova I, Kajiji TS, Wang X, Abastado JP, Lam KP, Biswas SK. 2010. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur J Immunol*. 40:2296-2307.
95. Mantovani A. 2011. B cells and macrophages in cancer: yin and yang. *Nat Med*. 17:285-286.
96. Dalloul A. 2009. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun Rev*. 8:349-353.
97. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. 1988. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:208-212.
98. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. 2005. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 8:140-174.
99. Hebner CM, Laimins LA. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 16:83-97.
100. Moody CA, Laimins LA. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 10:550-560.
101. zur Hausen H, de Villiers EM. 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol*. 48:427-447.
102. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira ED, Jr., Penny ME, Aranda C, Vardas E, Moi H, Jessen H, Hillman R, Chang YH, Ferris D, Rouleau D, Bryan J, Marshall JB, Vuocolo S, Barr E, Radley D, Haupt RM, Guris D. 2012. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med*. 364:401-411.
103. Doeberitz M, Vinokurova S. 2009. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res*. 40:435-442.

104. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH. 2007. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*. 120:1418-1425.
105. Nair S, Pillai MR. 2005. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis*. 11:350-359.
106. Yuan CH, Filippova M, Duerksen-Hughes P. 2012. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*. 4:3831-3850.
107. Thomas MC, Chiang CM. 2005. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell*. 17:251-264.
108. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 380:79-82.
109. Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KR. 2004. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*. 35:689-696.
110. Kalof AN, Cooper K. 2006. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 13:190-194.
111. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, Wolfensberger M, Terracciano LM. 2010. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol*. 21:1961-1966.
112. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E, Kriegs M. 2013. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*.
113. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, Gey A, Rotem-Yehudar R, Pere H, Tran T, Guerin CL, Chauvat A, Dransart E, Alanio C, Albert S, Barry B, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Bruneval P, Fridman WH, Lemoine FM, Oudard S, Johannes L, Olive D, Brasnu D, Tartour E. 2013. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 73:128-138.

114. Ritta M, Landolfo V, Mazibrada J, De Andrea M, Dell'Oste V, Caneparo V, Peretti A, Giordano C, Pecorari G, Garzaro M, Landolfo S. 2013. Human papillomavirus tumor-infiltrating T-regulatory lymphocytes and P53 codon 72 polymorphisms correlate with clinical staging and prognosis of oropharyngeal cancer. *New Microbiol.* 36:133-144.
115. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ, Gelderblom H, Nortier JW, Gorter A, Smit VT, Langeveld AP, Jansen JC, van der Burg SH. 2012. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer.* 131:E74-85.
116. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, DeLeo A, Ferris RL. 2005. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 65:11146-11155.
117. Andersen AS, Koldjaer Solling AS, Ovesen T, Rusan M. 2013. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.*
118. Palefsky JM. 2011. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health.* 46:S12-19.
119. Gonzalez-Ramirez I, Irigoyen-Camacho M, Ramirez-Amador V, Lizano-Soberon M, Carrillo-Garcia A, Garcia-Carranca A, Sanchez-Perez Y, Mendez-Martinez R, Granados-Garcia M, Ruiz-Godoy L, Garcia-Cuellar C. 2013. Association between age and high-risk human papilloma virus in Mexican oral cancer patients. *Oral Dis.*
120. Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. 2002. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 55:613-615.
121. Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. 2009. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol.* 9:65.
122. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, Smith RV, Burk RD, Prystowsky MB. 2011. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol.*
123. Snow AN, Laudadio J. 2010. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 17:394-403.

124. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, Aquino G, Pedicillo MC, Cagiano S, Campisi G, Rubini C, Papagerakis S, De Rosa G, Tornesello ML, Buonaguro FM, Staibano S, Bufo P. 2012. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer*. 7:4.
125. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. 2011. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 64:308-312.
126. Doxtader EE, Katzenstein AL. 2012. The relationship between p16 expression and high-risk human papillomavirus infection in squamous cell carcinomas from sites other than uterine cervix: a study of 137 cases. *Hum Pathol*. 43:327-332.
127. Singhi AD, Westra WH. 2010. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 116:2166-2173.
128. Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK. 2010. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*. 34:1088-1096.
129. Konig F, Krekeler G, Honig JF, Cordon-Cardo C, Fischer G, Korabiowska M. 2007. Relation between human papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas--a tissue microarray study. *Anticancer Res*. 27:283-288.
130. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, Klussmann JP, Speel EJ. 2010. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology*. 56:957-967.
131. Duncan LD, Winkler M, Carlson ER, Heidel RE, Kang E, Webb D. 2013. p16 Immunohistochemistry Can Be Used to Detect Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*.

132. Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, Benazzo M. 2009. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 29:119-126.
133. Syrjanen KJ, Pyrhonen S, Syrjanen SM. 1983. Evidence suggesting human papillomavirus (HPV) etiology for the squamous cell papilloma of the paranasal sinus. *Arch Geschwulstforsch.* 53:77-82.
134. von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. 2009. [Human papillomaviruses in the pathogenesis of intraepithelial neoplasia (AIN) and carcinoma of the anus]. *Hautarzt.* 61:13-20.
135. Tribius S, Ihloff AS, Rieckmann T, Petersen C, Hoffmann M. 2011. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Lett.* 304:71-79.
136. Ramqvist T, Dalianis T. 2010. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis.* 16:1671-1677.
137. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML. 2013. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 49:1-8.
138. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G. 2007. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 369:2161-2170.
139. Rambout L, Hopkins L, Hutton B, Fergusson D. 2007. Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *Cmaj.* 177:469-479.
140. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. 2004. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 121:254-263.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jakob Ihbe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Tumorinvasion CD20+ B-Lymphozyten bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in Abhängigkeit einer Infektion mit Humanen Papillomviren“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

Ihbe J, Batra A, Glauben R, Stroh T, Fedke I, Zeitz M, Siegmund B

Adipocytes and preadipocytes – phagocytes within mesenteric fat?

Postervortrag, II Falk Gastro Konferenz, Dresden, 9. – 10. Oktober 2007

Batra A, Okur B, Glauben R, Erben U, **Ihbe J**, Stroh T, Fedke I, Chang HD, Zeitz M, Siegmund B

Leptin: A Critical Regulator of CD4+ T-cell Polarization in Vitro and in Vivo.

Endocrinology 2010 Januar; 151 (1): 56-62

Ihbe J, Stoll C, Schmidt-Westhausen AM

Sensibilitätsausfall des N. alveolaris inferior durch ein primär intraossäres Lymphom des Unterkiefers“

zm Heft 24/2012, Der besondere Fall

9 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Dr. Herzog möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für das Feedback beim Verfassen der Arbeit bedanken.

Für das geduldige Beantworten unzähliger Fragen, die Anleitung zum histologischen Arbeiten sowie die kritische Diskussion von Ergebnissen und Ideen geht mein Dank an Professor Dr. Niedobitek und Dr. Dreyer.

Mein Dank gilt weiterhin den medizinisch-technischen Assistentinnen des pathologischen Institutes des ukb, ohne deren professionelle Anfertigung und Färbung der in dieser Dissertation verwendeten Präparate meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Barros bedanken, der ein wichtiger Berater bei der statistischen Datenauswertung war.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat.