

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

HUMANE PAPILLOMVIRUS-INFEKTIONEN BEIM CUP-SYNDROM DES KOPF-HALS-BEREICHS

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SOPHIE BASTROP

aus Rostock

Kiel, 2013

1. Berichterstatter: PD Dr. med Hoffmann
2. Berichterstatter: PD Dr. med Both
Tag der mündlichen Prüfung: 07. Januar 2015
Zum Druck genehmigt, Kiel, den _____

gez.: _____
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellungen	3
3. Material und Methoden	4
3.1 Material	4
3.1.1 Gewebeproben.....	4
3.1.2 Patienten und klinische Daten	4
3.1.3 Verwendete Kits	5
3.1.4 Verwendete Chemikalien	5
3.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	6
3.1.6 Geräte.....	7
3.2 Methoden.....	8
3.2.1 Immunhistochemische Färbung von p16 ^{INK4A}	8
3.2.2 Isolation von DNA aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben	9
3.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	11
3.2.4 HPV ^{Type 3.5} LCD-Array	11
3.2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	11
3.2.4.2 Agarosegelelektrophorese	12
3.2.4.3 LCD-Array.....	13
3.2.5 Statistik.....	14
4. Ergebnisse	15
4.1 Patientencharakteristika	15
4.2 Nachweis der HPV-DNA.....	16
4.3 Immunhistochemischer Nachweis der p16 ^{INK4A} -Expression	16
4.4 Kombination des HPV-Status mit dem p16 ^{INK4A} -Status.....	18
4.5 Korrelation des HPV- und des p16 ^{INK4A} -Status mit den Patientencharakteristika	18
4.6 Korrelation der klinischen Daten der Patienten mit den kombinierten HPV/p16 ^{INK4A} - Status.....	20
5. Diskussion	23
5.1 Humane Papillomviren (HPV).....	23
5.1.1 Aufbau der humanen Papillomviren	24
5.1.2 Pathophysiologie der HPV-Infektion	25
5.1.3 HPV-assoziierte Erkrankungen	27
5.1.4 HPV in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs	28
5.2 Das CUP-Syndrom im Kopf-Hals-Bereich.....	30
5.2.1 HPV beim CUP-Syndrom des Kopf-Hals-Bereichs	32
5.3 Das Expressionsmuster des p16 ^{INK4A} und die Korrelation mit dem HPV-Status	34
5.4 Karzinogene Risikofaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen.....	36
5.5 Korrelationen der p16 ^{INK4A} -Expression, dem HPV-Status und Tumor- sowie Patientencharakteristika	38
5.6 Das CUP-Syndrom im Hamburger und Kieler Patientenkollektiv	39
6. Zusammenfassung	42
7. Literaturverzeichnis	45
8. Anhang	59
Danksagung	60
Lebenslauf	61

Abkürzungen/Legende:

ATP	Adenosintriphosphat
BPV	Bovines Papillomvirus
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CT	Computertomographie
CUP	Cancer of Unknown Primary
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EV	Epidermodysplasia verruciformis
E6-AP	E6-assoziiertes Protein
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HPV	Humanes Papillomvirus
HR-HPV	Humanes Papillomvirus vom "high-risk"-Typ
LCR	Long control region (lange Kontrollregion)
LR-HPV	Humanes Papillomvirus vom "low-risk"-Typ
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaEDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pRB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
TAE	Triessigsäure-Ethylendiamintetraessigsäure
Taq	Termus aquinus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPT	Unknown Primary Tumor
URR	Upstream regulatory region

1. Einleitung

Es erkranken weltweit pro Jahr 12,7 Millionen Menschen an einem Karzinom (Ferlay et al. 2010). Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs sind dabei mit 570.000 neu diagnostizierten Fällen die sechsthäufigsten Karzinome (Kamangar et al. 2006). Die Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs entstehen in den anatomischen Regionen Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Larynx und Hypopharynx (Kamangar et al. 2006). Nikotin- und Alkoholabusus werden als bedeutendste Risikofaktoren der Kopf-Hals-Malignome angesehen. Besonders die karzinogenen Substanzen des Tabakrauchs führen zu einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (Brennan et al. 1995). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist eine Infektion mit humanen Papillomviren. Auch die Ernährungsgewohnheiten, Familien- und Eigenanamnese sowie orale Hygiene spielen bei der Karzinogenese der Kopf-Hals-Malignome eine Rolle (Pai und Westra 2009).

Plattenepithelkarzinome sind mit etwa 90% die häufigsten Malignome des Kopf-Hals-Bereichs (Marur et al. 2010). Bei zwei Prozent aller Kopf- und Hals-Karzinome liegt dagegen ein "Cancer of unknown primary" (CUP-Syndrom) vor. Bei dieser Tumorentität können nach Abschluss der Diagnostik nur die zervikalen Lymphknotenmetastasen ohne Nachweis eines Primärtumors gefunden werden (Grau et al. 2000). Die diagnostische Routine sieht bei Vorliegen eines CUP-Syndroms die Durchführung einer Panendoskopie, die Tonsillektomie sowie die Probeentnahme aus dem Zungengrund und dem Nasopharynx bei fehlendem Anhalt für einen Primärtumor vor (Cianchetti et al. 2009). Die Durchführung der Tonsillektomie wird empfohlen, da die Tonsillen und der Zungengrund die häufigsten Lokalisationen der diagnostizierten Primärtumoren darstellen (Cianchetti et al. 2009). Die Panendoskopie beinhaltet die Tracheobronchoskopie, Ösophagoskopie, Mikrolaryngoskopie und Naso-/Oro-/Hypopharyngoskopie sowie die gründliche Inspektion der Mundhöhle. Die Panendoskopie führt in bis zu 39% der Fälle mit vermeintlichem CUP-Syndrom zur Detektion eines klinisch nicht erkennbaren Primärtumors (Lapeyre et al. 1997, Koch et al. 2001).

Epidemiologische Untersuchungen zeigen eine Infektion mit humanen Papillomviren in 20 bis 30% der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Kreimer et al. 2005, Dayyani et al. 2010, Hoffmann et al. 2010). Die Prävalenz der HPV-Infektion ist dabei in den

verschiedenen anatomischen Regionen des Kopf-Hals-Bereiches nicht einheitlich. Die Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings sind mit einer Prävalenz von bis zu 60% besonders prädestiniert für eine solche Infektion (Gillison et al. 2000, Klusmann et al. 2001, Hoffmann et al. 2005b, D'Souza et al. 2007). Die Expression von p16^{INK4A}, einem zellulären Tumorsuppressor, welcher bei viraler biologischer Aktivität vermehrt sein soll, gilt insbesondere bei Tonsillenkarcinomen als Marker für eine aktive HPV-Infektion (Hoffmann et al. 2012).

HPV-DNA-positive Karzinome, wiederum insbesondere Tonsillenkarcinome, zeichnen sich durch eine frühe Metastasierung in die lokoregionären Lymphknoten aus, die auf ein aggressiveres biologisches Verhalten des Tumors zurückgeführt wird (Hoffmann et al. 2005b, Hoffmann et al. 2010, Syrjänen 2010). Der Lymphknotenstatus ist somit bei Diagnosestellung regelmäßig höher als bei HPV-negativen Karzinomen (Hoffmann et al. 2005b). Gewebe von zervikalen Lymphknotenmetastasen HPV-positiver Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs können ebenfalls HPV-DNA aufweisen und zeigen dabei in der HPV-Prävalenzbestimmung und in der Genotypisierung eine hohe positive Korrelation zum Primärtumorgewebe derselben Patienten (Hoffmann et al. 2005b, Weiss et al. 2011). Es ist daher anzunehmen, dass die Prävalenz HPV-positiver Lymphknotenmetastasen in einem Patientenkollektiv mit CUP-Metastasen die HPV-Prävalenz des Primärtumors im Kopf-Hals-Bereich widerspiegelt und so auf die potentielle Lokalisation des Indextumors der Metastasen hindeutet.

Die vorliegende Promotionsarbeit hat vor diesem Hintergrund das Ziel, die Prävalenz der Infektion mit humanen Papillomviren bei CUP-Syndromen zu ermitteln. Es stellt sich die Frage, ob mittels dieser Prävalenz auf einen bestimmten Tumorausgangspunkt geschlossen werden kann. Weiterhin wird untersucht, inwiefern das p16^{INK4A}-Expressionsmuster mit dem HPV-DNA-Status korreliert. Es wird zudem die Bedeutung der Noxen Alkohol und Nikotin für HPV-Infektion, p16^{INK4A}-Expression und Überleben statistisch ausgewertet. Es sind zu diesem Zweck 35 Tumorproben von Patienten mit CUP-Syndromen des Kopf-Hals-Bereichs retrospektiv untersucht worden. Die HPV-DNA ist mittels LCD-Array und das p16^{INK4A}-Expressionsmuster mittels Immunhistochemie bestimmt worden. Die Ergebnisse beider Untersuchungen sind miteinander sowie mit dem Alkohol- und Nikotinabusus der Patienten korreliert worden. Sämtliche Ergebnisse sind einer statistischen Analyse unterzogen worden.

2. Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle humaner Papillomviren bei CUP-Syndromen zu untersuchen. Dieses soll mit der Beantwortung folgender Fragestellungen avisiert werden:

1. *Wie hoch ist die HPV-Prävalenz in den untersuchten Biopsaten aus CUP-Syndromen?*

Die Prävalenz einer Infektion mit humanen Papillomviren ist bei 35 Patienten mit zervikalen Metastasen eines CUP-Syndroms ermittelt worden. Es ist dafür der HPV-DNA-Nachweis mittels LCD-Chip-Array durchgeführt worden.

2. *Lassen sich durch die Prävalenz der humanen Papillomviren in CUP-Syndromen Rückschlüsse auf den Primärtumorort ziehen?*

Die bestimmte Prävalenz der HPV-positiven CUP-Syndrome ist in den Kontext mit den unterschiedlichen Prävalenzen der Regionen Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Larynx und Hypopharynx gestellt worden.

3. *Wie ist das Expressionsmuster von $p16^{INK4A}$? Lassen sich durch den immunhistochemischen Nachweis von $p16^{INK4A}$ Rückschlüsse auf den HPV-Status ziehen?*

Das Expressionsmuster des Proteins $p16^{INK4A}$ ist durch Immunhistochemie semiquantitativ bestimmt worden. Anschließend ist es mit den Ergebnissen der HPV-DNA-Untersuchung auf Korrelationen untersucht worden.

4. *Gibt es signifikante Korrelationen des HPV- und/oder $p16^{INK4A}$ -Status zu Tumorcharakteristika und den Risikofaktoren Nikotin und Alkohol?*

Die in den Untersuchungen gewonnenen Daten sind statistisch ausgewertet und interpretiert worden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Gewebeproben

Es sind 35 in Paraffin fixierte Gewebeproben von 27 männlichen und 8 weiblichen Patienten untersucht worden, die in der Zeit von September 2002 bis September 2009 in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Eingriffen entnommen worden sind. Es ist entsprechend einer von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Kiel befürworteten Einverständniserklärung von allen Patienten die Zustimmung zur wissenschaftlichen Bearbeitung des Gewebes eingeholt worden (D 464/10). Die Gewebeproben aus den Präparaten sind in 30 Fällen im Rahmen der Neck dissection, in 4 Fällen durch Exzision einzelner Lymphknotenmetastasen in der Region des lateralen Halses und in einem Fall durch Exzision einer Weichgewebismetastase zervikal links entnommen worden. Vierunddreißig Gewebeproben sind im Rahmen der histopathologischen Untersuchung des Präparates durch das Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken) der Universitätsklinik Schleswig-Holstein als Metastasen eines Plattenepithelkarzinoms identifiziert worden; eine Probe entspricht histologisch einem spindelzelligen Tumor. Die in Paraffin fixierten Gewebeproben, mit denen in der vorliegenden Untersuchung gearbeitet worden ist, sind von dem Institut Pathologie zur Verfügung gestellt worden.

3.1.2 Patienten und klinische Daten

Die Patienten haben bei Diagnosestellung ein mittleres Alter von 57 Jahren (SD: 7,6; Min: 43; Max: 72) gezeigt. Die Geschlechterverteilung entspricht einem Verhältnis von einer Frau zu drei Männern (8 Frauen und 27 Männer); der Anteil der weiblichen Patienten liegt somit bei 29,6%. In Tabelle 1 (siehe Anhang) werden die Patienten mit TNM-Klassifikation (Tumor-, Nodal- und Metastasenstatus), Alter und Geschlecht sowie den Untersuchungsergebnissen zusammengefasst dargestellt.

3.1.3 Verwendete Kits

QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit	QIAGEN (Hilden/ Deutschland)
QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2ml)	3x50
Buffer ATL	10ml
Buffer AL	12ml
Buffer AW1	19ml
Buffer AW2	13ml
Buffer ATE	12ml
Proteinase K	1,25ml
Handbook	1
CINtec® Histology Kit	Mtm laboratories AG (Heidelberg/ Deutschland)
Peroxidase-Blocking Reagent	2 x 11,5ml
Mouse anti-Human p16 ^{INK4A} Antibody	11,5ml
Visualization Reagent	2 x 11,5ml
Negative Reagent Control	11,5ml
DAB Buffered Substrate	31ml
DAB Chromogen	0,85ml
Epitope Retrieval Solution 10x	500ml
Handbook	1
LCD-Array Kit	Chipron GmbH (Berlin/Deutschland)
Primer Mix A: My11/09	
Primer Mix B: `125`	
LCD-Arrays	
HYBIDIZATION Buffer	
Modulator	
DILUTION Buffer	
LABEL	
STAIN Solution	
Wash Powder	
Humidity Chamber	
Product Information Cd	

3.1.4 Verwendete Chemikalien

Ampuwa® (Aqua dest.)	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg/ Deutschland)
100% Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V. (Griesheim/Deutschland)
96% Ethanol	BÜFA Chemikalien GmbH Co.KG (Hude- Altmoorhausen/Deutschland)
80% Ethanol	400ml 100% Ethanol, 100 ml Aqua dest.
70% Ethanol	350ml 100% Ethanol, 150ml Aqua dest.
Xylol	Merck KGaA (Darmstadt/ Deutschland)
Eukitt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim/Deutschland)
Waschpuffer	Mtm laboratories AG (Heidelberg/Deutschland)
Mayers Hämalaun	Merck KGaA (Darmstadt/Deutschland)
Aceton	Mallinckrodt Baker B.V. (Griesheim/Deutschland)
Xylol-Ersatz	Vogel GmbH &Co.KG (Giessen/Deutschland)
„HotStar Taq DNA Polymerase“	QIAGEN (Hilden/ Deutschland)
PCR-Reaktionspuffer	Mitgeliefert mit HotStar Taq DNA Polymerase
dNTP Mix	Fermentas GmbH (St. Leon- Rot/Deutschland)
H ₂ O für PCR	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
DNA Längenstandarts (Molekulargewichtsmarker)	Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder – Fermentas GmbH (St. Leon- Rot/Deutschland)
EDTA	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf/Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
6x Orange Loading Dye (Farbmarker)	Fermentas GmbH (St. Leon- Rot/Deutschland)

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH &Co.KG (Braunschweig/Deutschland)
Deckgläser (14 x 32mm, 24 x 60mm, 18 x 18mm)	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH &Co.KG (Braunschweig/Deutschland)
Einweghandschuhe Peha-soft ®	Paul Hartmann AG (Heidenheim/ Deutschland)
Mikrotomklinge A35	Produkte für die Medizin AG (Köln/

Einwegpipettenspitzen (10 µl farblos, 200µl gelb, 1000µl blau)	Deutschland)
Eppendorfhütchen	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co (Nümbrecht/Deutschland)
Reagiergefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co (Nümbrecht/Deutschland)
Kimberly-Clark® Professional Einwegtücher	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co (Nümbrecht/Deutschland)
UV-transparente Einmal-Küvetten	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH (Mainz/Deutschland)
Filterpapier	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co (Nümbrecht/Deutschland)
Färbeschalen	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Halterung für die Objektträger	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Messzylinder	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Halterung für Reagiergefäße	Eppendorf reference (Hamburg/Deutschland)
Glastrichter	neoLab (Heidelberg/Deutschland)
Spritzflasche	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Kamm	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
	MWG Biotech (Ebersberg/ Deutschland)

3.1.6 Geräte

Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Vortexer	Fisher Scientific GmbH (Schwerte/Deutschland)
Thermocycler	PerkinElmer (Waltham, USA)
	DNA Engine –BioRad (München/Deutschland)
Stoppuhren	Carl Roth GmbH +Co.KG (Karlsruhe/Deutschland)
Mikrowelle	Samsung (Schwalbach / Ts/ Deutschland)
Wasserbad	Julabo (Seelbach/Deutschland)
	Memmert (Schwabach/Deutschland)
Mikrotom	Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH (Nussloch/Deutschland)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)

Model 200/2.0 Power Supply	BioRad (München/Deutschland)
UV-Licht und Bilderfassungssystem GelDoc XR+	BioRad (München/Deutschland)
Chip ^{spin} FVL2400N	Chipron GmbH (Berlin/Deutschland)
Scanner PF 3650u	Chipron GmbH (Berlin/Deutschland)
Elektrophoresekammer	MWG Biotech (Ebersberg/Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbung von p16^{INK4A}

Das CINtec® Histology Kit der Firma mtm laboratories AG (jetzt Roche mtm laboratories AG) ist für die p16^{INK4A}-Immunhistochemie verwendet worden. Dies ist ein immunzytochemischer Assay für die Bestimmung des p16^{INK4A}-Antigens. Für das Verfahren sind 5µm dicke Schnitte verwendet worden, die zuvor aus Paraffinblöcken mit den eingebetteten Formalin-fixierten Gewebeproben geschnitten worden sind. Es sind bis zu zwanzig Schnitte unterschiedlicher Gewebeproben gleichzeitig gefärbt worden, wobei jeweils eine Negativkontrolle zusätzlich untersucht worden ist. Es ist nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen worden:

Die Schnitte sind zunächst einer Entparaffinisierung und Rehydrierung unterzogen worden:

2x10 min Xylol

2x10 min 100% Ethanol

5 min 96% Ethanol

5 min 80% Ethanol

5 min 70% Ethanol

30 s Spülen mit Aqua dest.

Die Objektträger sind folgend zur Epitopdemaskierung in 220ml Epitopdemaskierungslösung (20ml Epitope Retrieval Solution, 200ml Aqua dest.) für 2x7min in der Mikrowelle bei 450W erhitzt worden. Die Lösung ist zwischen den Zeiteinheiten mit 50ml Aqua dest. aufgefüllt worden. Nach 20-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur sind die Objektträger für 5min

mit 220ml Waschpuffer (20ml Wash Buffer, 200ml Aqua dest.) gewaschen worden. Das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität ist anschließend durch eine 5-minütige Inkubation mit 100-200µl Peroxidase-Blockierungsreagenz erfolgt. Die Schnitte sind nach Waschen für weitere 5min mit 220ml Waschpufferlösung für 30min mit 200µl Primärantikörper (Maus-Anti-Human p16^{INK4A} oder negative Reagenzienkontrolle) bei Raumtemperatur inkubiert worden. Daraufhin ist ein erneutes Spülen für 5min in 220ml Pufferlösung erfolgt. Die Objektträger sind anschließend mit 100-200µl Visualisierungsreagenz bedeckt und 30min inkubiert worden. Es ist nach zweimaligem Waschen für 5min in jeweils 220ml Pufferlösung eine Inkubation der Schnitte mit 100µl DAB Gebrauchslösung (1ml DAB Substratlösung und 1 Tropfen DAB Chromogen [Diaminbenzidin-Chromogenlösung] für circa 10 Schnitte) erfolgt. Die Gegenfärbung mit frisch gefilterter Hämaalaun-Lösung (1:2) für 5s ist nach Spülen mit Aqua dest. durchgeführt worden. Die Schnitte sind nach 10-minütigem Spülen unter fließendem Wasser nach folgendem Schema dehydriert worden:

3 min 70% Ethanol

3 min 80% Ethanol

2x3 min 96% Ethanol

2x3 min 100% Ethanol

2x10 min Xylol

Die Proben sind schließlich mit Deckgläschen ausreichender Größe und Eukitt eingedeckt worden.

3.2.2 Isolation von DNA aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben

Das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit der Firma QIAGEN ist für die Isolation von DNA verwendet worden, wobei nach dem darin beschriebenen Protokoll vorgegangen worden ist. Im Rahmen der Qualitätskontrolle ist zusätzlich eine Negativprobe ohne Probenmaterial untersucht worden. Außerdem sind die Arbeitsgeräte zur Vermeidung einer Kontamination der einzelnen Schnitte mit Ethanol und Aceton gereinigt beziehungsweise gewechselt

worden. Die Paraffinblöcke sind zunächst mit Hilfe des Mikrotoms nach folgendem Algorithmus geschnitten worden:

Durchmesser der Probe $\geq 0,5\text{cm}^2 \rightarrow 1$ Schnitt a' $5\mu\text{m}$

Durchmesser der Probe zwischen $0,1$ und $0,5\text{cm}^2 \rightarrow 3$ Schnitte a' $5\mu\text{m}$

Durchmesser der Probe $\leq 0,1\text{cm}^2 \rightarrow 3$ Schnitte a' $10\mu\text{m}$

Es sind $1000\mu\text{l}$ Xylol zur Auflösung des Paraffins auf die Proben in den 1,5er Eppendorfhütchen gegeben worden. Der Überstand ist nach Vortexen und Zentrifugation über 2min entfernt worden. Die Proben sind folgend mit $1000\mu\text{l}$ 96% Ethanol versetzt und nach Zentrifugieren sowie Abpipettieren des Überstandes 10min inkubiert worden. Die vollständige Lyse der Proben ist durch Zugabe von $180\mu\text{l}$ Buffer ATL und $20\mu\text{l}$ Proteinase K erfolgt. Das Gemisch ist nachfolgend zunächst 60min bei 56°C im Wasserbad und anschließend in 0,5er Eppendorfhütchen 60min bei 90°C im Thermocycler inkubiert worden. Die Proben sind nun entsprechend des Protokolls zentrifugiert und in 1,5er Eppendorfhütchen überführt worden. Es sind dem Gemisch $200\mu\text{l}$ Buffer AL und $200\mu\text{l}$ 96% Ethanol zur Präzipitation der DNA hinzugefügt und mittels Vortexer vermischt worden. Der Inhalt der Eppendorfhütchen ist nach kurzer Zentrifugation auf die Membran der QIAamp MinElute® Columns geschichtet worden. Das Gemisch ist bei $8000\text{U}/\text{min}$ in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die DNA während der Zentrifugation selektiv von der Membran der Extraktionssäule absorbiert worden. Kontaminierende Proteine und Polysaccharide sind nicht an die Membran gebunden und dadurch entfernt worden. Das Waschen der gebundenen DNA ist anschließend in zwei Eppendorfhütchen mittels der im Set enthaltenen Waschpuffer AW1 und AW2 erfolgt. Die Proben sind zunächst nach der Zugabe von $500\mu\text{l}$ Buffer AW1 1min bei $8000\text{U}/\text{min}$ zentrifugiert worden. Dieser Vorgang ist mit $500\mu\text{l}$ des Buffers AW2 wiederholt worden. Restliche Kontaminationen sind mittels der Waschvorgänge entfernt worden; dadurch ist der Reinheitsgrad der DNA erhöht worden. Die QIAamp Extraktionssäule mit der gebundenen DNA ist nun nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in 1,5er Eppendorfhütchen überführt worden. Die Proben sind zur Eluierung der reinen, konzentrierten DNA mit $50\mu\text{l}$ Aqua dest. für 5min inkubiert und schließlich bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert worden. Die Filter sind entsorgt worden; das Aqua dest. mit der darin extrahierten DNA ist nach der photometrischen Bestimmung bei -80°C eingefroren worden.

3.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration der einzelnen Proben ist photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einem UV-Spektralphotometer erfolgt. Eine Eichung des Photometers ist mit 95µl Aqua dest. durchgeführt worden. Für die Messung sind UV-transparente Einmal-Küvetten benutzt worden. Die DNA-Konzentration in den Proben ist in einem Verhältnis von 1:20 (5µl Probe, 95µl Aqua dest.) festgestellt worden.

3.2.4 HPV^{Type} 3.5 LCD-Array

Der LCD-Array dient der Detektion und Typisierung von HPV-DNA. Diese Chip-basierte Detektionsmethode der Firma Chipron GmbH erlaubt die Identifizierung von 32 HPV-Typen. Es wird zunächst eine Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt, um die daraus entstandenen Amplifikate dann unter Verwendung eines ‚low cost and density‘ (LCD) Arrays analysieren zu können. Die Software übernimmt anschließend die Auswertung der Ergebnisse, die Sortierung nach Signalstärke und den Ergebnisreport. Die RT-PCR sowie der Array wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Faloona im Jahr 1986 erstmalig beschriebene Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro Technik, die der Vervielfältigung von Nukleinsäurefragmenten mittels einer enzymatischen, zyklischen Reaktion dient. Die PCR besteht aus drei Teilen: Der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. Das zu vervielfältigende DNA-Fragment ist eingerahmt von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer). Das thermostabile Enzym Taq-Polymerase (original isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, vervielfältigt in *E.coli*) synthetisiert von den Primern aus die komplementären Stränge zu den vorhandenen DNA-Ausgangssträngen in 3`-5`-Richtung.

Das *LCD-Array* HPV 3.5-Kit beinhaltet zwei Primer-Gemische: Primer Mix A- My11/09 (~430bp) und Primer Mix B- `125` (~125-155bp); mittels dieser werden HPV-spezifische DNA-Segmente (L1-Region) amplifiziert. Beide Primerpaare müssen in unabhängigen

Polymerasekettenreaktionen angewendet und vor der Hybridisierung kombiniert werden. Für vier Reaktionen à 25µl für beide Primer-Mischungen sind zwei Master-Mischungen (jeweils 125µl) hergestellt worden:

Mix My 11/09			Mix `125`	
12,5		Puffer(µl)		12,5
5,0		dNTP Mix(µl)		5,0
5,0		Primer Mix A oder B(µl)		10,0
1,5		Taq-Polymerase(µl)		1,5
91		H ₂ O(µl)		86

Zu jedem Reaktionsgefäß sind nach Aufteilung der Mastergemische auf jeweils 4 PCR-Reaktionsansätze 2µl virale DNA gegeben worden. Die Reaktionsansätze sind nun in den Thermocycler gegeben worden, der nach folgendem Ablaufplan Amplifikate produziert hat:

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
1)	3:00	96
2)	1:00	94
3)	1:30	45
4)	1:30	72
5)	Wiederholung ab 2) 42 Mal	
6)	3:00	72

3.2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, die der Trennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe im elektrischen Feld dient.

Es ist zunächst das Gel hergestellt worden: Die Mischung aus 1,5% Agarose und TAE-Puffer (48,4g Tris, 20ml 0,5M NaEDTA, 11,42ml Essigsäure, Wasser) ist in der Mikrowelle zur Lösung der Bestandteile erhitzt worden. Das Gießen der Lösung in einen Gelträger mit Kämmen ist nach einer Abkühlung erfolgt. Das Gel ist nach vollständig abgeschlossener Polymerisation und Entfernung der Kämmen in eine Gelelektrophoresekammer mit darin befindlichen TAE-Puffer und Ethidiumbromidlösung gebracht worden. Fünf µl der PCR Lösung und 1µl des 6x Orange Loading Dye sind zusammen mit DNA Längenstandards und Farbmarkern in die Gelkammern gegeben worden. Die Banden sind nach Anlegen einer Spannung von 70V für 25min mittels UV-Licht sichtbar gemacht und durch ein Bilderfassungssystem archiviert worden.

Nach der Auswertung der Gelelektrophorese mit Hilfe einer Skala über die Amplifikationsstärke von eins bis fünf ist die Entscheidung erfolgt, welche PCR Proben mittels Array weiter untersucht werden sollen. Eine Amplifikatstärke von null ist als kein Amplifikat und eine Amplifikatstärke von fünf als starkes Amplifikat bewertet worden. Ein Gemisch beider Reaktionen ist auf dem Array hybridisiert worden, wenn beide Primersets ein Amplifikat ergeben haben. Wenn nur die „125“-Amplifikation erfolgreich gewesen ist, ist nur diese hybridisiert worden.

Es sind auf diese Weise 12 Proben ausgeschlossen und der Array ist bei 23 Proben durchgeführt worden.

3.2.4.3 LCD-Array

Der LCD-Array besteht aus vier Arbeitsschritten: Der Hybridisierung, Markierung, Färbung und der Analyse. Alle Teilschritte werden auf LCD-Chips (Objektträger) durchgeführt, die jeweils aus acht Kammern bestehen. Diese Kammern beinhalten die sogenannten Capture Probes, welche Subtyp-spezifische Sonden darstellen. Die Capture Probes sind für folgende 33 HPV-Typen aufgebracht: 06, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 90, 91. An drei Ecken der Kammern befinden sich zusätzlich Kontrollpunkte, die der Überwachung der Hybridisierung und Färbung dienen.

Die Hybridisierung ist als erster Teilschritt durchgeführt worden. Für die Herstellung des Hybridisierungsgemisches sind 22µl HYBRIDIZATION Buffer, 2µl MODULATOR und 10µl der PCR-Reaktionsprodukte (jeweils 5µl aus PCR von Mix A und Mix B) vermengt worden. Es sind 30µl des PCR-Hybridisierungsgemisches auf die Felder der Objektträger in der Feuchtkammer pipettiert worden. Die LCD-Chips sind anschließend 30min in einem Wasserbad von 35°C inkubiert worden. Daraufhin fanden zwei Waschvorgänge in jeweils 300ml Waschpufferlösung statt. Diese ist zuvor aus 50ml 20xconcentrate-Lösung (1Packung WASH Powder und 1l Aqua dest.) und 950ml Aqua dest. hergestellt worden. Die Inkubation der Objektträger ist anschließend in einem dritten Behälter mit Waschpufferlösung für 1min erfolgt. Die LCD-Chips sind schließlich für 15s in den CHIP^{Spin}2400N überführt und so getrocknet worden.

Der zweite Schritt des Arrays -das Markieren, Labeling,- ist nachfolgend durchgeführt worden. Die Labeling-Mischung ist zunächst aus DILUTION Buffer und MODULATOR in einem Verhältnis von 9:1 hergestellt worden, um nachfolgend 150µl dieser Mischung mit 1µl LABEL zu versetzen. Der Objektträger ist mit 30µl der Lösung pro Feld 5min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die drei Waschvorgänge sind anschließend wie in dem Schritt der Hybridisierung durchgeführt worden; ebenso wie die Trocknung in dem CHIP^{Spin}2400N für 15s.

Der Array ist schließlich mit der Färbung, Staining, der LCD-Chips beendet worden. Es sind zunächst 30µl der STAIN Solution auf jedes Feld der Objektträger gegeben worden. Anschließend ist eine Inkubation von 1 bis 3min bei Raumtemperatur erfolgt, der sich ein Spülen der Objektträger in dem letzten der drei Waschpufferbehälter von dem Schritt des Markierens für 11 bis 15s anschloss. Die LCD-Chips sind nun erneut in dem CHIP^{Spin}2400N für 15s getrocknet worden.

Die LCD-Chips sind abschließend mittels des Scanners PF 3650u analysiert worden.

3.2.5 Statistik

Alle statistischen Berechnungen sind mit dem Programm SPSS/PC+ Version 10 (SPSS Inc. /IBM, Ehningen, Deutschland) vorgenommen worden. Es sind der exakte Test nach Fisher und der Chi-Quadrat-Test angewandt worden. Die gesamten p-Werte waren zweiseitig und Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ (5%) sind als signifikant bezeichnet worden.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Die Untersuchung umfasst 35 Patienten; die Patientencharakteristika werden in Tabelle 2 aufgezeigt.

Die Histologie der Lymphknotenmetastasen zeigt überwiegend ein Plattenepithelkarzinom (34/35, 97,1%) mit einer Ausnahme eines spindelzelligen Tumors. Die Mehrzahl der Patienten hat einen Nodalstatus von N2a oder höher (33/35, 94,3%); lediglich bei zwei Patienten ist ein Nodalstatus von N1 festgestellt worden (2/35, 5,7%). Das histopathologische Grading zeigt bei elf Patienten eine niedrige Differenzierung (G3, 11/35, 31,4%), bei zwei Patienten eine niedrige bis moderate Differenzierung (G2-3, 2/35, 5,7%), bei 19 Patienten eine moderate Differenzierung (G2, 19/35, 54,2%) und bei einem Patienten eine moderate bis hohe Differenzierung (G1-2, 1/35, 2,9%). Bei zwei Patienten ist das histopathologische Grading nicht bestimmt worden. Der Großteil der Patienten sind ehemalige oder aktive Raucher (30/35, 85,7%); auch regelmäßiger Alkoholabusus kann bei 15 Patienten in der Anamnese festgestellt werden (16/35, 45,7%).

Tabelle 2. Patientencharakteristika

Patientencharakteristik	Anzahl (n=35)
Geschlecht, n (%)	
<i>Männlich</i>	27 (77,1)
<i>Weiblich</i>	8 (22,9)
Mittleres Alter, Jahre (Rang)	57,54 (43-73)
pN, n (%)	
1	2 (5,7)
2	21 (60)
(2a)	7 (20)
(2b)	13 (37,1)
(2c)	1 (2,9)
3	12 (34,3)
pG, n (%)	

<i>1</i>	0
<i>1 bis 2</i>	1 (2,9)
<i>2</i>	19 (54,3)
<i>2 bis 3</i>	2 (5,7)
<i>3</i>	11(31,4)
<i>Unbekannt</i>	2 (5,7)
Nikotinabusus in Anamnese, n (%)	
<i>Ja</i>	5 (14,3)
<i>Nein</i>	30 (85,7)
Alkoholabusus in Anamnese, n(%)	
<i>Ja</i>	16 (45,7)
<i>Nein</i>	19 (54,3)
HPV16 Status, n (%)	
<i>Positiv</i>	14 (40)
<i>Negativ</i>	21 (60)
P16^{INK4A}-Status, n (%)	
<i>Positiv</i>	11 (31,4)
<i>Negativ</i>	24 68,6)

4.2 Nachweis der HPV-DNA

Die extrahierte DNA aus den 35 Karzinomgewebeproben wird unter Anwendung des LCD-Array-Kits auf das Vorhandensein von DNA der humanen Papillomviren untersucht.

Die generierten Produkte der PCR geben nach Auswertung durch die Agarosegelelektrophorese Auskunft über das Vorhandensein bestimmter Sequenzen von HPV. Dreiundzwanzig der 35 Karzinomgewebeproben werden aufgrund der Amplifikationsstärke mittels LCD-Array zur Identifizierung auf Subtypenebene untersucht. Die DNA des humanen Papillomvirus Typ 16 wird bei 14 dieser Proben identifiziert (14/35; 40% [siehe Tabelle 2]). Ein anderer Genotyp der humanen Papillomviren kann trotz der Möglichkeit der Identifizierung von 33 Papillomviren durch den Array nicht detektiert werden.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis der p16^{INK4A}-Expression

Die p16^{INK4A}-Immunhistochemie wird insgesamt bei 35 Lymphknotenmetastasen von CUP-Syndromen durchgeführt. Die Schnitte werden von zwei unabhängigen Experten ausgewertet. Es werden sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbungen als positiv gewertet. Elf von den 35 Proben (31,4%) sind in der Immunhistochemie bei der Cintec-Färbung positiv für p16^{INK4A} (siehe Tabelle 2).

Die untersuchten Proben werden klassifiziert nach Klaes et al. (2001). Bei dieser Klassifikation werden die Ergebnisse je nach Intensität der immunhistochemischen Färbung wie folgt unterschieden:

negativ (<1% der Zellen sind positiv)

sporadisch (<5% der Zellen positiv),

fokal (<25% der Zellen positiv)

und diffus (>25% der Zellen positiv).

Drei (27,27%) der p16^{INK4A}-positiven Proben zeigen nach dieser Klassifikation in der Immunhistochemie eine sporadische, zwei (18,18%) Proben eine fokale und sechs (54,5%) Proben eine diffuse Anfärbung.

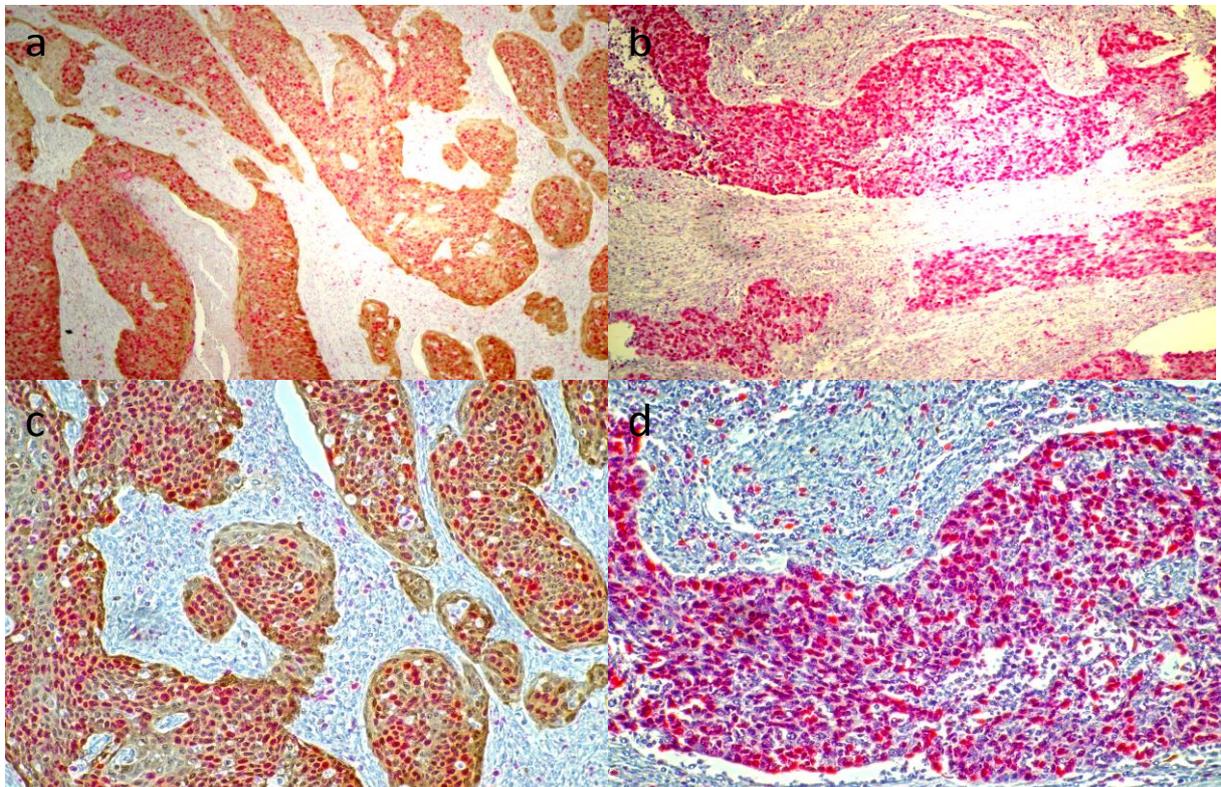


Abb.1 P16^{INK4A}-immunhistochemie eines Plattenepitheliomkarzinoms unter Verwendung des Kits CIntec®PLUS CYTOLOGY. a und c zeigen eine p16^{INK4A}- und Ki67-positive Reaktion. In c ist

besonders gut die intrazelluläre Anfärbung des Ki67 und des p16^{INK4A} zu sehen. Die Anfärbung des p16^{INK4A} wurde hier nach Klaes et al. (2001) als diffus klassifiziert. Zum Vergleich sieht man in b und d eine p16^{INK4A}-negative Färbung, Ki67 ist positiv. (a und b: x200; b und c: x400)

4.4 Kombination des HPV-Status mit dem p16^{INK4A}-Status

Es ergeben sich durch die Kombination des HPV-Status mit dem p16^{INK4A}-Status vier Gruppen:

Tabelle 3.

Kombinierter HPV/ p16 ^{INK4A} -Status	Abkürzung	Anzahl der Patienten
		n/35 (%)
HPV-negativ/p16 ^{INK4A} -negativ	HPV[-]/p16 ^{INK4A} [-]	16 (45,7)
HPV-negativ/p16 ^{INK4A} -positiv	HPV[-]/p16 ^{INK4A} [+]	5 (14,3)
HPV-positiv/p16 ^{INK4A} -negativ	HPV[+]/p16 ^{INK4A} [-]	8 (22,9)
HPV-positiv/p16 ^{INK4A} -positiv	HPV[+]/p16 ^{INK4A} [+]	6 (17,1)

Von den 35 untersuchten Karzinomgewebeproben sind 16 Proben HPV[-]/p16^{INK4A}[-] (16/35, 45,7%), fünf Proben HPV[-]/p16^{INK4A}[+] (5/35, 14,3%), acht Proben HPV[+]/p16^{INK4A}[-] (8/35, 22,9%) und sechs Proben sind HPV[+]/p16^{INK4A}[+](6/35, 17,1%).

4.5 Korrelation des HPV- und des p16^{INK4A}-Status mit den Patientencharakteristika

Die Beziehung der klinischen Parameter der Patienten mit dem Status von HPV und p16^{INK4A} wird in Tabelle 3 dargestellt. Die hier berücksichtigten Parameter sind Geschlecht, durchschnittliches Alter, Nodalstatus, Grading (Tumorstadium nach TNM-Klassifikation), Nikotinabusus und Alkoholabusus.

Tabelle 4. Klinische Daten in Korrelation mit dem HPV- und p16^{INK4A}-Status

Charakteristik	Anzahl	HPV-Status			P16 ^{INK4A} -Status		
		Negativ	Positiv	P-Wert	Negativ	Positiv	P-Wert
Patienten, n(%)	35	21(60)	14(40)		24(68,6)	11(31,4)	
Geschlecht, n(%)							
<i>Männlich</i>	27	15(71,4)	12(85,7)	0,431	18(75)	9(81,8)	1
<i>Weiblich</i>	8	6(28,6)	2(14,3)		6(25)	2(18,2)	
Durchschnittliches Alter, Jahre	63	58,7	55,8	0,459	57,17	58,36	0,46
pN, n (%)							
1	2	1(4,8)	1(7,1)	0,765	1(4,2)	1(9,1)	0,856
2	21	12(57,1)	9(64,3)		14(58,3)	7(63,6)	
2a	7	3(14,3)	4(28,8)		5(20,8)	2(18,2)	
2b	13	8(38,1)	5(35,7)		8(33,3)	5(45,5)	
2c	1	1(4,8)	0		1(4,2)	0	
3	12	8(38,1)	4(28,6)		9(37,5)	3(27,3)	
pG, n (%)							
1	0	0	0	0,669	0	0	0,88
1-2	1	0	1(7,1)		1(4,2)	0	
2	19	13(62)	6(43)		13(54,2)	6(54,5)	
2-3	2	1(4,7)	1(7,1)		1(4,2)	1(9,1)	
3	11	6(28,6)	5(35,7)		8(33,3)	3(27,3)	
Unbekannt	2	1(4,7)	1(7,1)		1(4,2)	1(9,1)	
Nikotinabusus, n(%)							
<i>Ja</i>	30	20(95,2)	10(71,4)	0,134	23(95,8)	7(63,6)	0,026
<i>Nein</i>	5	1(4,8)	4(28,6)		1(4,2)	4(36,4)	
Alkoholabusus, n(%)							
<i>Ja</i>	16	11(52,4)	5(35,7)	0,491	13(54,2)	3(27,3)	0,167
<i>Nein</i>	19	10(47,6)	9(64,3)		11(45,8)	8(72,7)	

Nikotinabusus in der Anamnese kann als einzig signifikanter Parameter zwischen p16^{INK4A}-positiven im Vergleich zu p16^{INK4A}-negativen Fällen identifiziert werden ($p=0,026$, Chi-Quadrat-Test). In der Gruppe der 24 p16^{INK4A}-negativen Patienten geben 23 Patienten (23/24, 95,8%) einen regelmäßigen Tabakkonsum in der Anamnese an; nur ein Patient ist

kein aktiver oder ehemaliger Raucher (1/24, 4,2%). Der Anteil der Raucher bei den p16^{INK4A}-positiven Patienten liegt dagegen bei 63,6% (7/11). Vier der elf p16^{INK4A}-positiven Patienten sind Nichtraucher (4/11, 36,4%).

Die ungleichmäßige Verteilung von Rauchern und Nicht-Rauchern findet sich auch in der HPV-positiven Gruppe im Vergleich zu der HPV-negativen Gruppe. Der Anteil der Patienten mit positiver Raucheranamnese liegt in der HPV-positiven Gruppe bei 71,4% (10/14). In der HPV-negativen Gruppe sind dagegen 95,2% (20/21) ehemalige oder aktive Raucher. Dieser Unterschied zwischen der HPV-positiven und HPV-negativen Gruppe zeigt jedoch bei Betrachtung der absoluten Zahlen keine statistische Signifikanz ($p=0,134$), was am ehesten auf die kleine Stichprobengröße zurückzuführen ist. Die statistische Auswertung der prozentualen Verhältnisse zeigt dagegen mit $p=0,0024$ eine hohe statistische Signifikanz.

Die Korrelation des angegebenen Alkoholkonsums mit dem HPV- beziehungsweise p16^{INK4A}-Status ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den positiven und negativen Gruppen. Es fällt allerdings auf, dass die HPV-positive und die p16^{INK4A}-positive Gruppe weniger Patienten mit Alkoholabusus aufweisen als die HPV-negative und p16^{INK4A}-negative Gruppe. Der Anteil der Patienten mit regelmäßigem Alkoholkonsum liegt bei den HPV-positiven Patienten bei 35,7% (5/14). Bei der HPV-negativen Gruppe weisen dagegen 52,4% (11/22) der Patienten einen Alkoholabusus in der Anamnese auf. Ähnlich verhält es sich bei den p16^{INK4A}-Gruppen: Die p16^{INK4A}-positive Gruppe enthält einen Anteil an Patienten mit positiver Alkoholanamnese von 27,3% (3/11). Dagegen geben 54,2% (13/24) der p16^{INK4A}-negativen Patienten einen regelmäßigen Alkoholkonsum an.

4.6 Korrelation der klinischen Daten der Patienten mit den kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status

Die Beziehung der klinischen Patientendaten mit den kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status wird in Tabelle 5 aufgezeigt.

Als Patientencharakteristika werden erneut die schon in Tabelle 3 untersuchten Merkmale Geschlecht, durchschnittliches Alter, Nodalstatus, Grading (Tumorstadium nach TNM-Klassifikation), Nikotinabusus und Alkoholabusus verwendet.

Tabelle 5. Korrelation der klinischen Patientendaten mit dem HPV/p16^{INK4A}-Status

Charakteristik	Anzahl	HPV[-]/ p16[-]	HPV[-]/ p16[+]	HPV[+]/ p16[-]	HPV[+]/ p16[+]	p-Wert
Patienten, n(%)	35	16(45,7)	5(14,3)	8(22,9)	6(17,1)	
Geschlecht, n(%)						
<i>Männlich</i>	27	11(68,8)	4(80)	7(87,5)	5(83,3)	0,734
<i>Weiblich</i>	8	5(31,2)	1(20)	1(12,5)	1(16,7)	
Durchschnittliches Alter, Jahre	63	58,5	59,4	54,5	57,5	0,723
pN, n (%)						
<i>1</i>	2	1(6,3)	0	0	1(16,7)	0,877
<i>2</i>	21	8(50)	4(80)	6(75)	3(50)	
<i>2a</i>	7	2(12,5)	1(20)	3(37,5)	1(16,7)	
<i>2b</i>	13	5(31,3)	3(60)	3(37,5)	2(33,3)	
<i>2c</i>	1	1(6,3)	0	0	0	
<i>3</i>	12	7(43,7)	1(20)	2(25)	2(33,3)	
pG, n (%)						
<i>1</i>	0	0	0	0	0	
<i>1-2</i>	1	0	0	1(12,5)	0	
<i>2</i>	19	11(68,8)	2(40)	2(25)	4(66,7)	
<i>2-3</i>	2	1(6,2)	0	0	1(16,7)	
<i>3</i>	11	4(25)	2(40)	4(50)	1(16,7)	
<i>Unbekannt</i>	2	0	1(20)	1(12,5)	0	
Nikotinabusus, n(%)						
<i>Ja</i>	30	16(100)	4(80)	7(87,5)	3(50)	0,028
<i>Nein</i>	5	0	1(20)	1(12,5)	3(50)	
Alkoholabusus, n(%)						
<i>Ja</i>	16	8(50)	3(60)	5(62,5)	0	0,09
<i>Nein</i>	19	8(50)	2(40)	3(37,5)	6(100)	

Der einzige signifikante Unterschied wird auch hier durch die Korrelation des Nikotinabusus mit den kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status ermittelt ($p=0,028$; exakter Test nach Fisher). So zeigt sich ein Raucheranteil von 100% in der HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Gruppe (16/16). Die

HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten geben dagegen nur in 50% (3/6) der Fälle einen Nikotinabusus in der Anamnese an.

Bei der Korrelation des Alkoholabusus mit den HPV/p16^{INK4A}-Status sind deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede festzustellen. Die Patienten mit dem HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Status zeigen keinen regelmäßigen Alkoholkonsum in der Anamnese (0/6, 0%). In der HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Gruppe sind dagegen 50% (8/16) positiv für Alkoholabusus in der Anamnese.

Bezüglich der anderen Patientencharakteristika können keine signifikanten oder auffälligen Unterschiede festgestellt werden.

5. Diskussion

5.1 Humane Papillomviren (HPV)

Die infektiöse Natur von Warzen wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts von Payne erkannt. Ciuffo lieferte 1907 den ersten eindeutigen Beweis für die Entstehung von Warzen nach einer Infektion. Der Wissenschaftler übertrug virulentes Material aus Warzen von Mensch zu Mensch. Richard Shope isolierte im Jahr 1932 aus einem Kaninchen das erste Papillomvirus (Shopes Kaninchenpapillomvirus [Shope 1932]). Die viralen Proteine wurden erstmals 1949 durch Strauss und Mitarbeiter im Elektronenmikroskop demonstriert. Die ersten Veröffentlichungen über die doppelsträngige zirkuläre DNA des humanen Papillomvirus erschienen einige Jahre später (zur Hausen 2009). In den siebziger Jahren zeigte sich die Vielzahl der Papillomvirustypen. Die Heterogenität dieser Familie wurde durch eine Untersuchung von zur Hausen und Mitarbeiter im Jahr 1974 offenkundig. Die ersten vollständigen Genome konnten 1982 sequenziert werden: das BPV1 (bovines Papillomvirus) durch Chen und Mitarbeiter und das HPV1 (humanes Papillomvirus) durch Danos und Mitarbeiter. Die Anzahl der damals entdeckten Papillomviren ist seitdem stetig gestiegen. Heute können circa 200 Papillomviren unterschieden werden, von denen etwa 150 beim Menschen nachgewiesen werden konnten (Bernard et al. 2010, Kovanda et al. 2011). Ein neuer Papillomvirus-Typ wird dabei nur anerkannt, wenn das gesamte Genom vollständig sequenziert wurde. Das Genom darf weiterhin in dem Leserahmen für das späte Protein L1 (L1 ORF) mit dem nächst verwandten HPV-Typ nur in weniger als 90% übereinstimmen (de Villiers et al. 2004). Unterschiede in dieser Sequenz von zwei bis zehn Prozent definieren ein Papillomvirus als Subtyp und unter zwei Prozent als varianten Typ (de Villiers et al. 2004).

Papillomviren konnten bislang in mehr als zwanzig Säugetierspezies, Vögeln und Reptilien gefunden werden (Doorbar 2005). Sie besitzen eine stark ausgeprägte Wirts- und Gewebsspezifität, sind strikt epitheliotrop und obligatorisch intrazellulär (Modrow et al. 2010, Horvath et al. 2010). Die Papillomviren sind ursprünglich mit den Polyomaviren als Familie der Papovaviridae zusammengefasst worden. Es sind dann aber aufgrund unterschiedlicher Genomgröße, unterschiedlicher Genomorganisation und nur unbedeutenden Übereinstimmungen in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz zwei separate Familien durch das International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) festgelegt

worden (de Villiers et al. 2004). Die Papillomviren gehören seitdem der Familie der Papillomaviridae an. Die Papillomviren werden aufgrund ihrer DNA-Sequenz in fünf Supergruppen A-E eingeteilt (IARC Monographs Vol. 90 2007). Die humanpathogenen Papillomviren gehören zu den Gruppen A, B oder E (Chan et al. 1995). Die Papillomviren der Supergruppe A, zu der unter anderem die HPV-Typen 6,7,11,16,18,10 und 32 gehören, sind besonders für die Entstehung der benignen und malignen Tumore ursächlich.

Die Terminologie unterscheidet weiterhin in Abhängigkeit des Tropismus der Infektionen durch die verschiedenen Genotypen kutane von mukokutanen Papillomviren (de Villiers et al. 2004). Die mukokutanen Papillomviren werden zusätzlich nach ihrem onkogenen Potenzial in zwei Gruppen eingeteilt: In „high-risk“-Papillomviren (HR-PV) und „low-risk“-Papillomviren (LR-PV [zur Hausen und de Villiers 1994]). Die HR-Papillomviren haben im Gegensatz zu den LR-Papillomviren ein hohes Potenzial eine maligne Läsion zu induzieren.

5.1.1 Aufbau der humanen Papillomviren

Humane Papillomviren haben einen Durchmesser von 55-60nm. Die Viruspartikel besitzen in ihrem Inneren eine doppelsträngige zirkuläre DNA. Diese ist von kleinen Kapsiden umgeben. Die Proteinkapsidhülle hat eine ikosaedrische Form, welche aus zwei Strukturproteinen besteht: Das Hauptkapsidprotein L1 (Major Capsid Protein, 57kD) bildet 72 pentamere Kapsomere. Zusätzlich zu L1 finden sich 12 bis 72 Moleküle des Strukturproteins L2 (Minor Capsid Protein, 75kD). Die Viruspartikel sind unbehüllt, was die Viren gegenüber Inaktivierung, Frost und Austrocknung resistent macht (Chang et al. 1991).

Das kovalent geschlossene, zirkuläre und doppelsträngige DNA-Genom der humanen Papillomviren umfasst eine Größe von 7500 bis 8000bp. Alle viralen Funktionen sind auf einem Strang kodiert. Das Genom weist eine typische Organisation auf: Die lange Kontrollregion (LCR [Long Control Region] oder auch URR [upstream regulatory region]) enthält den überwiegenden Anteil der Kontrollelemente wie frühe Promotoren, Enhancer und den Replikationsursprung [ori (origin of replication)]. Die Gene für die früh im Vermehrungszyklus gebildeten Proteine schließen sich im Uhrzeigersinn an die LCR an. Diese frühe Region (E [Early Region]) beinhaltet sechs bis acht offene Leserahmen (ORF [open

reading frames]) für die regulatorischen Proteine E1 bis E8. Die Gene für das Protein E4 sind in den E2-Leserahmen integriert. Der späte Genombereich befindet sich zwischen dem E5-Leserahmen und der LCR. Dieser beinhaltet die Gene für die spät im Replikationszyklus synthetisierten Proteine L1 und L2 (Terai et al. 2002, Chen et al. 2006)

Die frühen Proteine E1 und E2 interagieren mit der DNA der Wirtszelle, wobei E1 ein wichtiger Bestandteil der Replikation in den Zellkernen der Wirtszellen ist (Conway und Meyers 2009). E1 ist weiterhin eine ATP-abhängige DNA-Helicase (Yang et al. 1993) und bindet mit Hilfe einer Komplexbildung mit dem frühen Protein E2 an den Replikationsursprung. E1 rekrutiert nach der Bindung zelluläre Replikationsproteine, unter anderem die DNA Polymerase α und die Topoisomerase 1. Das frühe Protein E2 reguliert die Transkription der frühen Proteine E6 und E7 und gilt als sog. *silencer* der Region E6/E7. Die Funktionen des Proteins E4 bestehen unter anderem in der Induktion von Apoptose und der Stimulation der Aktivität von E2 (Nakahara et al. 2005). Das Protein E5 aktiviert durch die Bindung an zelluläre Transmembranproteine wachstumsstimulierende Signalkaskaden (Crusius et al. 1998). Die E6- und E7-Proteine besitzen die Fähigkeit Zellen zu transformieren und zu immortalisieren (zur Hausen 2000). Beide Onkoproteine interagieren mit wichtigen Regulatoren des menschlichen Zellzyklus. Es kommt durch die Wirkung der Onkogene zu vermehrten DNA-Schäden und letztlich zu einer Transformation der Wirtszelle (Zerfass et al. 1995, Havre et al. 1995). L1 ist das Hauptkapsidprotein und stellt das gruppenspezifische Antigen der Papillomviren dar (de Villiers 1997). L2-Proteine sind für die Bindung und Verpackung des Virusgenoms zuständig (Zhou et al. 1994, Zhao et al. 1998).

5.1.2 Pathophysiologie der HPV-Infektion

Viruspartikel gelangen durch Verletzungen der äußeren Hornschicht in das Epithel und können dort die Stammzellen in der Basalzellschicht infizieren. Eine Infektion kann über Jahre hinweg subklinisch bleiben.

Es wird davon ausgegangen, dass sekundäre Ereignisse wie somatische Mutationen der zellulären Gene zusätzlich zu der persistierenden Infektion mit HP-Viren eintreten müssen um konsekutiv zur malignen Transformation beizutragen (Vousden 1993). Ein anerkanntes

Charakteristikum der malignen Progression ist die Integration der Virus-DNA in das humane Genom (Shirasawa et al. 1986, Schneider-Maunoury et al. 1987, zur Hausen 1989, Peitsaro et al. 2002). Die viralen Sequenzen liegen nämlich bei benignen und geringgradigen intraepithelialen Läsionen nach derzeitigem Kenntnisstand überwiegend episomal vor, während sie bei Karzinomen regelmäßig in das Wirtsgenom integriert sind (Das et al. 1992, Peitsaro et al. 2002). Die E1 und/oder E2 ORFs gehen durch die Integration ebenso regelmäßig verloren; die Leserahmen für die frühen Proteine E6 und E7 sowie die LCR bleiben jedoch intakt (Peitsaro et al. 2002). Die negative Feedbackregulation auf den Promoter der frühen Proteine E6 und E7 geht durch den konsistenten Verlust der E2-*silencer*-Proteine verloren (Chow et al. 2010), was die hohe Expressionsrate der viralen Onkogene E6 und E7 zur Folge hat. Es existieren allerdings auch Karzinome mit nachgewiesener episomaler Lokalisation des viralen Genoms. Der virale Promoter wird hier vermutlich in Folge einer mutagenen Deletion enthemmt (May et al. 1994).

Das Onkoprotein E7 der Papillomviren greift am Übergang der G1-Phase zur S-Phase ein. Es bindet an das Retinoblastoma-Genprodukt pRB und den verwandten Pocket-Proteinen (McLaughlin-Drubin und Münger 2009), wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird und es zu einem unkontrollierten Eintritt in die Synthesephase kommt (McLaughlin-Drubin und Münger 2009). Die Inhibitoren der Cyclin D abhängigen Kinasen, welche im normalen Zellzyklus E2F durch Phosphorylierung des pRb freisetzen, werden hierdurch aktiviert. P16^{INK4A} gehört zu der Gruppe der Inhibitoren der Cyclin D abhängigen Kinasen, wodurch es zu einer Überexpression von p16^{INK4A} kommt (Li et al. 1994).

Das zweite virale Onkoprotein E6 greift an einem weiteren wichtigen Kontrollmechanismus in der G2-Phase des Zellzyklus ein. Die transformierende Eigenschaft des E6 entsteht durch die Komplexbildung mit dem zellulären Protein E6-AP (E6-assoziiertes Protein). Dieses agiert als E3-Ubiquitin-Ligase (Scheffner et al. 1993). Das E6-Protein bindet an das Tumorsuppressorprotein p53 und induziert dessen ubiquitinabhängigen Abbau (Huibregtse et al. 1991, Scheffner et al. 1993). P53 kann so in seiner Funktion als Tumorsuppressorprotein und Regulator der Zellteilung nicht wirken. Ein weiteres Tumorsuppressorprotein, Notch1, wird durch die fehlende Funktion des p53 gehemmt. Dies hat ein abnormes Zellwachstum und Differenzierungsdefekte der Zelle zur Folge (Yugawa et al. 2007). Das E6-Protein übt seine onkogene Potenz auch über andere Wege aus: Es

induziert die humane Telomerase hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase). E6 interagiert zudem mit den pro-apoptischen Proteinen Bak, FADD (Fas-associated Death Domain) und Procaspase 8 (Thomas und Banks 1999, Garnett et al. 2006), was die HPV-infizierte Zelle vor einer Apoptose schützt. Das Onkogen interagiert weiterhin mit Proteinen, die PDZ-Domänen beinhalten. Diese Proteine sind in zelluläre Funktionen wie Signaltransduktion und Zelladhäsion involviert. Es kann durch den Abbau dieser Proteine zu einer Transformation der Zelle kommen (Narisawa-Saito und Kiyono 2007).

5.1.3 HPV-assoziierte Erkrankungen

Humane Papillomviren sind kausale Faktoren für eine Vielzahl von benignen und malignen Tumorerkrankungen kutaner und muköser Epithelien. Zu den benignen Läsionen der Haut zählen eine Reihe verschiedener Typen von Warzen (Papillome): Die Verrucae plantares und vulgares (HPV1 und 4), die Fleischerwarzen (HPV7) oder die Verrucae planae (HPV3 [de Villiers 1989]). Die Mehrzahl der für die gutartigen kutanen Warzen ursächlichen Papillomviren sind im Zusammenhang mit der Erkrankung Epidermodysplasia verruciformis (EV) beschrieben worden (de Villiers 1989). EV tritt in Form von disseminierten und persistierenden flachen Warzen auf. (Pfister 2008, Pfister 2011). Die Läsionen der EV weisen sowohl HPV-Genotypen mit niedrigem (HPV14, 20 und 21) als auch mit hohem onkogenen Potenzial (HPV5, 8 und 47) auf (Chang et al. 1991, Majewski und Jablonska 1995, Marcuzzi et al. 2009). Bei 30 bis 60% der hellhäutigen EV-Patienten kann 10 bis 30 Jahre nach dem ersten Auftreten benigner Läsionen an vorwiegend sonnenexponierten Arealen ein Plattenepithelkarzinom der Haut auftreten (Majewski und Jablonska 1997).

Humane Papillomviren infizieren auch diverse Schleimhäute. Die „low-risk“ HPV sind für benigne genitale Warzen (Condylomata accuminata) und intraepitheliale Neoplasien unterschiedlichen Dysplasiegrades der Zervix, Vulva, Penis, Vagina und Anus verantwortlich (Pfister 2008). Die humanen Papillomviren 6 und 11 können bei 90% aller genitalen Warzen isoliert werden (Steben und Duarte-Franco 2007). Die Infektion mit „high-risk“ Papillomviren kann zudem anogenitale Karzinome bedingen. Anfang der siebziger Jahre sind die ersten Studien zum möglichen Zusammenhang von HPV und Zervixkarzinomen von Harald zur Hausen durchgeführt worden (zur Hausen et al. 1974, zur Hausen 1976), die letztlich zu der

Erkenntnis führten, dass Viren Krebs verursachen können. Für die Entwicklung dieser Erkenntnis ist Harald zur Hausen der Nobelpreis für Medizin 2008 verliehen worden. HPV-Infektionen werden heute für Neoplasien der Zervix uteri als ursächlich anerkannt (zur Hausen 1996). HPV kann in über 99,7% aller Zervix-uteri-Neoplasien gefunden werden, wobei in über 70% eine Infektion mit HPV16 oder HPV18 identifiziert wird (Steben und Duarte-Franco 2007).

Humane Papillomviren sind darüber hinaus mit der Ätiologie von benignen und malignen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes vergesellschaftet (Franceschi et al. 1996). Zu den benignen Tumorerkrankungen gehört die rezidivierende respiratorische Papillomatose (RRP, früher „Larynxpapillomatose“). Die rezidivierende Papillomatose kann in seltenen Fällen nach langem Verlauf eine maligne Transformation durchmachen (Mahnke et al. 1998).

HPV-Infektionen werden ebenfalls als Ursache für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs angesehen (Gillison et al. 2000, Klussmann et al. 2001, Herrero et al. 2003, Smith et al. 2004, Hoffmann et al. 2005a, Wittekindt et al. 2005, Mannarini et al. 2009).

5.1.4 HPV in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Kopf-Hals-Karzinome sind in 20 bis 30% mit einer HPV-Infektion vergesellschaftet (Kreimer et al. 2005, Dayyani et al. 2010, Hoffmann et al. 2010), wobei die überwiegende Mehrzahl HPV-positiver Tumoren durch den Hochrisikotyp HPV16 verursacht wird (Klussmann et al. 2001, Hoffmann et al. 2003, Gillison 2004, Begum et al. 2005, Furniss et al. 2007). Die Prävalenz humaner Papillomviren wird in Abhängigkeit der Lokalisation des Primärtumors unterschiedlich beschrieben. Die anatomische Region des Oropharynx hat mit 60% die höchste HPV-Prävalenz (Gillison et al. 2000, Klussmann et al. 2001, Hoffmann et al. 2005a, D'Souza et al. 2007). Kreimer und Mitarbeiter (2005) haben in einer Metaanalyse von 60 separaten Studien mit insgesamt 5046 Patienten gezeigt, dass die HPV-Prävalenz der Oropharynxkarzinome (35,6%) signifikant höher ist als die in Larynx (24%) und Mundhöhle (23,5%). Die HPV-Nachweisbarkeit in Kopf-Hals-Karzinomen scheint zusätzlich abhängig von der geographischen Region zu sein, in der die untersuchten Populationen leben. Eine

Untersuchung in Schweden hat so beispielsweise eine HPV-Prävalenz von 85% in den untersuchten Tonsillenkarzinomen ermittelt, der vorwiegende Genotyp war HPV16 mit 93% (Näsman et al. 2009). Die HPV-Prävalenz in Oropharynxkarzinomen in europäischen Ländern mit dem höchsten Tabakkonsum liegt dagegen bei unter 20% (Marur et al. 2010).

Der Grund für die signifikant häufigeren HPV-positiven Oropharynxkarzinome im Vergleich zu Karzinomen anderer Lokalisationen ist unklar. Die Tonsilla palatina und die Tonsilla lingualis des Waldeyer'schen Rachenrings, der mit Ausnahme der Adenoide im Epipharynx zur anatomischen Region des Oropharynx gehört, scheinen aber besonders prädestiniert für eine Infektion mit HPV zu sein. Die Tonsillen zeichnen sich durch eine besonders exponierte Lage aus, da sie zwischen der äußeren Umwelt und den inneren Organen lokalisiert sind und zusätzlich durch immunogene und karzinogene Stimulationen beansprucht werden (Wilczynski et al. 1998). In den tiefen Krypten der Tonsillen befindet sich zudem teilweise lediglich einschichtiges Epithel, welches der Basalzellschicht entspricht und eine geringe Differenzierung zeigt. Die höhere Permissivität des Kryptenepithels weist so auf eine erhöhte Sensitivität für HPV-Infektionen hin (Klussmann et al. 2001, Klussmann et al. 2004); die geringe Virusclearance in den tiefen Krypten ist weiterhin als begünstigender Faktor denkbar (Klussmann et al. 2004).

HPV-positive Plattenepithelkarzinome, insbesondere Tonsillenkarzinome, können aus folgenden Gründen als eigene Tumorentität angesehen werden (Gillison et al. 2000, Klussmann et al. 2003a, Klussmann et al. 2003b): Patienten mit HPV-positiven Tumoren sind im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren jünger und weisen in der Anamnese weniger häufig die Hauptrisikofaktoren der Kopf-Hals-Karzinome Alkohol- und Nikotinabusus auf (Chaturvedi et al. 2008, Gillison et al. 2008). HPV-positive Karzinome zeichnen sich weiterhin durch ein aggressiveres biologisches Verhalten aus (Hoffmann et al. 2005a, Hoffmann et al. 2010, Syrjänen 2010) und haben eine Tendenz zu weniger differenzierten Tumoren (Hobbs et al. 2006, Gillison et al. 2008). Die Karzinome metastasieren zudem früh in die lokoregionären Lymphknoten und weisen bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf (Hoffmann et al. 2005b, Hobbs et al. 2006, Gillison et al. 2008). Eine Untersuchung von Hoffmann und Mitarbeiter (2005b) zeigte so eine Metastasierung der HPV-positiven Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs in 93%. Die HPV-negativen Karzinome metastasierten im Gegensatz dazu im Verlauf der Erkrankung in nur 63% in die

zervikalen Lymphknoten. Die Lymphknotenmetastasen der HPV-positiven Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs zeigen eine hohe Korrelation zum HPV-Status der jeweiligen Primärtumoren (Hoffmann et al. 2005b, Weiss et al. 2011).

Patienten mit HPV-positiven Karzinomen haben trotz des oben genannten aggressiveren biologischen Verhaltens im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Karzinomen ein besseres Gesamt- und rezidivfreies Überleben (Lindquist et al. 2007, Fakhry et al. 2008, Hoffmann et al. 2009). Letzteres wird auf ein besseres Ansprechen HPV-positiver Tumore auf die Therapie, vor allem Strahlentherapie, zurückgeführt (Mellin et al. 2000, Hoffmann et al. 2005a, Hoffmann et al. 2010, Rischin et al. 2010, Syrjänen 2010, Tribius et al. 2011). Das erhöhte Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung wird durch ein intaktes p53 in HPV-positiven Tumoren erklärt, wodurch eine apoptotische Antwort auf den durch Chemotherapie erzeugten Stress erfolgen kann (Ferris et al. 2005).

5.2 Das CUP-Syndrom im Kopf-Hals-Bereich

Unter dem Begriff CUP-Syndrom (Cancer of Unknown Primary) werden diejenigen Tumorerkrankungen zusammengefasst, bei denen nach Abschluss der Diagnostik nur Metastasen, jedoch kein Primärtumor gefunden wird (Krämer et al. 2008). CUP-Syndrome sind mit einer Inzidenz von 2,3 bis 4,2% die siebt- bis achthäufigsten Karzinomerkrankungen weltweit (Pavlidis und Fizazi 2005). Zervikale CUP-Syndrome haben allerdings einen geringen Anteil an der Gesamtheit der CUP-Syndrome. Kopf-Hals-Karzinome werden in nur 2% als CUP-Syndrom diagnostiziert (Grau et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit sind Proben von 35 Patienten mit einem zervikalen CUP-Syndrom untersucht worden, die von September 2002 bis September 2009 entnommen worden sind. Die Histologie der untersuchten Lymphknotenmetastasen zeigt, wie in der Literatur beschrieben, überwiegend ein Plattenepithelkarzinom (34/35, 97,1% [Vaamonde et al. 2002, Issing et al. 2003]). Die zervikalen CUP-Syndrome weisen, wie die Gesamtheit der Kopf-Hals-Karzinome, eine hohe Prädisposition für das männliche Geschlecht auf (Issing et al. 2003). Das männliche Geschlecht überwiegt auch in der vorliegenden Untersuchung mit 77,1% (27/35). Das Durchschnittsalter der Patienten mit zervikalem CUP-Syndrom und Kopf-Hals-

Karzinomen generell wird in der Literatur mit 55-59 Jahren angegeben (Issing et al. 2003, Cianchetti et al. 2009). Betrachtet man das Durchschnittsalter der Patienten in der vorliegenden Untersuchung, so liegt es mit 57,5 Jahren gerade in diesem Altersintervall.

Es ist wenig bekannt über die Entstehung und Biologie zervikaler CUP-Syndrome. Sie zeichnen sich durch einen kurzen Krankheitsverlauf mit unspezifischen Symptomen und eine unterschiedliche Wachstumsdynamik des Primärtumors und der Metastasen aus (van de Wouw et al. 2003, Sandler et al. 2008). Die Metastasen proliferieren deutlich aggressiver, der Primärtumor hingegen bleibt meist asymptomatisch (Sandler et al. 2008). Es ist ebenfalls denkbar, dass die Primärtumoren schnell proliferieren und metastasieren, die Gefäßversorgung aber aufgrund des starken Wachstums zu inkompetent ist und die Primärtumorzellen mittels Apoptose untergehen (Naresh 2002).

Der Primärtumor der zervikalen CUP-Syndrome ist höchstwahrscheinlich ein Karzinom des Kopf-Hals-Bereiches (Weber et al. 2001). Die Diagnostik bezieht sich aus diesem Grund insbesondere auf den Bereich des oberen Aerodigestivtraktes und umfasst die körperliche Untersuchung, die HNO-ärztliche Spiegeluntersuchung einschließlich Endoskopie, die B-Sonographie der Halsweichteile inklusive Gewinnung einer Feinnadelaspiration zur zytologischen Untersuchung, CT und/oder MRT des Halses, Panendoskopie mit Tonsillektomie der Tonsillae palatinae und Probebiopsien aus der Tonsilla lingualis (Weber et al. 2001, Neben et al. 2008). Die Panendoskopie führt in bis zu 39% der Fälle mit vermeintlichem CUP-Syndrom zur Detektion eines klinisch nicht erkennbaren Primärtumors (Lapeyre et al. 1997, Koch et al. 2001). Die Tonsillektomie zum Nachweis des Primärtumors wird besonders empfohlen, da die Tonsillen und der Zungengrund die häufigsten Lokalisationen der diagnostizierten Primärtumoren darstellen (Cianchetti et al. 2009).

Die Detektion des Primärtumors hat eine therapeutische und prognostische Relevanz. Die therapeutischen Strategien beim CUP-Syndrom unterscheiden sich deutlich von den Behandlungskonzepten bei detektiertem Primärtumor. Patienten mit CUP-Syndrom werden mit einer Neck Dissection der Regionen I bis V und einer adjuvanten Radiochemotherapie unter Einbeziehung der Mukosa des Naso-, Oro-, Hypopharynx und des Larynx sowie der bilateralen zervikalen Lymphabflussstromgebiete behandelt (Colletier et al. 1998, Grau et al. 2000). Diese Behandlung geht aufgrund der erhöhten Strahlenbelastung im Vergleich zu

Fällen mit bekanntem Primarius mit einer erhöhten akuten und chronischen Morbidität einher (Grau et al 2000, Nieder et al. 2001). Die Detektion des Primärtumors führt dagegen zu einer Eingrenzung der Therapie auf den Bereich des Primärtumorsitzes, was die Selektion der zur Neck dissection indizierten Regionen und die Eingrenzung des Strahlentherapiefeldes auf die Primärtumorlokalisation zur Folge hat.

5.2.1 HPV beim CUP-Syndrom des Kopf-Hals-Bereichs

Es ist, wie oben bereits erwähnt, bekannt, dass Kopf-Hals-Karzinome, insbesondere Oropharynxkarzinome, eine hohe HPV-Prävalenz zeigen. HPV-Infektionen sind auch bereits in zervikalen CUP-Syndromen vereinzelt nachgewiesen worden (Hoffmann et al. 2005b, Desai et al. 2009, Barward et al. 2011, Compton et al. 2011).

Die untersuchten CUP-Syndrome des Kopf-Hals-Bereichs der vorliegenden Arbeit weisen eine HPV-Infektion in 14 der 35 Fälle auf. Damit liegt die HPV-Prävalenz mit 40% über den in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Angaben zur HPV-Infektion in Kopf-Hals-Karzinomen von 20 bis 30% (Kreimer et al. 2005, Dayyani et al. 2010, Hoffmann et al. 2010). Die HPV-Prävalenz deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen. Barward und Mitarbeiter (2011) haben beispielsweise eine HPV-Prävalenz in CUP-Syndromen von 52,9% (9/17) ermittelt.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass das Vorhandensein von HPV in Lymphknotenmetastasen eine deutliche Korrelation zu HPV-Infektionen der Primärtumoren zeigt und mit dem Tumorausgangspunkt im Oropharynx assoziiert ist (Begum et al. 2003, Hoffmann et al. 2005b, Begum et al. 2007, El-Mofty et al. 2008, Desai et al. 2009). Hoffmann und Mitarbeiter (2005b) haben eine der ersten Untersuchungen zum Zusammenhang von HPV-Infektionen der Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Der HPV-Status ist in 18 Primärtumoren und den dazugehörigen 19 Lymphknotenmetastasen sowie von 17 Lymphknotenmetastasen ohne Primärtumor untersucht worden. Sieben der 18 Patienten mit Primärtumor zeigten einen positiven HPV-Status sowohl des Primärtumors als auch der Lymphknotenmetastasen. Weitere sieben Patienten zeigten für beide Gewebeproben einen negativen HPV-Status. Drei Patienten hatten HPV-positive

Lymphknotenmetastasen, aber einen HPV-negativen Primärtumor. Die 17 untersuchten Lymphknoten ohne untersuchten Primärtumor zeigten in 11 Fällen einen positiven HPV-Status. Begum und Mitarbeiter (2007) haben 77 Aspiate von Plattenepithelkarzinometastasen mit in 67 Fällen bekanntem Primärtumor auf das Vorhandensein von HPV untersucht und sie detektierten HPV in 13 Metastasen. Zehn der Metastasen mit HPV-Infektion hatten den Primärtumorsitz im Oropharynx und drei Metastasen waren Metastasen eines CUP-Syndroms. HPV konnte somit in keiner „nicht-oropharyngealen“ Metastase identifiziert werden. El Mofty und Mitarbeiter (2008) haben in einer ähnlichen Untersuchung das Vorhandensein von HPV in 93 zervikalen Lymphknotenmetastasen eines Plattenepithelkarzinoms mit bekanntem Primärtumor auf HPV untersucht. Eine HPV-Infektion ist bei 23 aller Metastasen festgestellt worden. Zweiundzwanzig dieser HPV-positiven Proben waren Metastasen von oropharyngealen Karzinomen. Daraus lässt sich eine Sensitivität von 95,7% und eine Spezifität von 85,7% bei zervikalen Metastasen mit einer HPV-Infektion von einem Primärtumor im Oropharynx errechnen (El-Mofty et al. 2008). Desai und Mitarbeiter (2009) haben dagegen in einer Untersuchung neben dem Oropharynx beispielsweise die Mundhöhle und die Haut als Primärtumorlokalisationen für HPV-positive Metastasen festgestellt.

Es wird zusammenfassend vermutet, dass die HPV-Diagnostik bei CUP-Syndromen auf den Ursprungsort deuten kann: Bei einem negativen HPV-Status werden Tumorlokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches außerhalb des Oropharynx als Primärtumorsitz angenommen. Ein positiver HPV-Status weist dagegen stark auf den Oropharynx, insbesondere die Tonsillen, als den möglichen Primärtumorsitz hin. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte HPV-Prävalenz in CUP-Metastasen von 40% weist aufgrund dieser vergleichsweise hohen HPV-Prävalenz eher auf die Tonsillen als Primärtumorsitz hin als auf Primärtumoren des Larynx, Hypopharynx oder der Mundhöhle (HPV-Prävalenz außerhalb des Oropharynx im Kieler Patientenkollektiv: 20 bis 30%; HPV-Prävalenz im Oropharynx im Kieler Patientenkollektiv: 50 bis 60%).

Die DNA aus den Karzinomproben ist in der vorliegenden Untersuchung mittels eines hochspezifischen Typisierungs-Arrays auf das Vorhandensein von 33 humanen Papillomviren untersucht worden. Dabei ist der HPV-Typ 16 als einziger infizierender Genotyp identifiziert worden (14/14, 100%). HPV16 ist der Genotyp, der in der überwiegenden Mehrheit der HPV-

positiven Kopf-Hals-Karzinome beschrieben worden ist (Kreimer et al. 2005, Hoffmann et al. 2005a und b, Hoffmann et al. 2010, Dayyani et al. 2010), während die HPV-Typen 18 und 33 als zweit- bzw. dritthäufigste Genotypen in Kopf-Halskarzinomen vorkommen (Kreimer et al 2005, Dayyani et al 2010).

5.3 Das Expressionsmuster des p16^{INK4A} und die Korrelation mit dem HPV-Status

Das humane Tumorsuppressorprotein p16^{INK4A} wurde erstmals 1993 isoliert (Serrano et al. 1993, Xiong et al. 1993). Die Funktionen des p16^{INK4A} bestehen in der zellulären Seneszenz, also dem permanenten Arrest der Zellproliferation, und in der Regulation der Lebensdauer (Hara et al. 1996, Cánepa et al. 2007). P16^{INK4A} führt zu einer funktionellen Inaktivierung des pRB (Serrano et al. 1993, Kamb et al. 1994) und die Transkription des p16^{INK4A} wird wiederum durch einen regulatorischen Rückkopplungsmechanismus durch den Status des pRB reguliert (Serrano et al. 1993, Li et al. 1994, Hara et al. 1996). Es ist folglich detektierbar bei Mutation, Deletion oder Inaktivierung des pRB, aber nicht bei intaktem pRB.

Das p16^{INK4A} ist in den ersten Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der p16^{INK4A}-Immunhistochemie und dem HPV-Status stetig als Ersatzmarker einer Infektion mit den humanen Papillomviren bestätigt worden (Fregonesi et al. 2003, Klussmann et al. 2003a). Die Korrelation der p16^{INK4A}-Überexpression und des HPV-Status waren hochsignifikant (Wittekindt et al. 2005, Cunningham et al. 2006, Klussmann et al. 2009, Hoffmann et al. 2010). An der Aussagekraft der p16^{INK4A}-Überexpression über eine HPV-Infektion kam jedoch in den letzten Jahren durch verschiedene Studien Zweifel auf (Klingenberg et al. 2010, Rischin et al. 2010, Hoffmann et al. 2012). Hoffmann und Mitarbeiter (2012) haben in einer aktuellen Untersuchung festgestellt, dass die p16^{INK4A}-Immunhistochemie oder die HPV-Detektion alleine nicht aussagekräftig genug sind, um auf eine aktive oder inaktive HPV-Infektion schließen zu lassen. In der Untersuchung von Hoffmann und Mitarbeiter (2012) waren sechs der 78 Proben HPV-positiv aber p16^{INK4A}-negativ. Es gab zusätzlich 13 Fälle mit einer p16^{INK4A}-Überexpression ohne das Vorhandensein von detektierbarer HPV-DNA.

Das Expressionsmuster von p16^{INK4A} ist in der vorliegenden Arbeit mittels Immunhistochemie untersucht worden. Es ist insgesamt bei elf Patienten eine p16^{INK4A}-Überexpression

festgestellt worden (11/35, 31,4%). Sechs der 35 Patientenproben sind sowohl p16^{INK4A}-positiv als auch HPV-positiv (17,14%). Weitere fünf Patienten haben einen positiven p16^{INK4A}-Status, aber einen negativen HPV-Status (5/35, 14,3%). Eine Überexpression des p16^{INK4A} kann dagegen bei acht HPV-positiven Patienten nicht festgestellt werden (8/35, 22,9%). Die insgesamt elf p16^{INK4A}-positiven Proben weisen somit nur in sechs Fällen einen positiven HPV-Status auf. Andererseits kann bei acht Patienten mit positivem HPV-Status keine p16^{INK4A}-Überexpression festgestellt werden.

Es gibt für die p16^{INK4A}-Überexpression ohne eine nachweisbare HPV-Infektion unterschiedliche Erklärungsansätze: Die Infektion mit anderen Viren, beispielsweise mit Adenoviren, stellt eine Möglichkeit dar. Das Onkoprotein E1A der Adenoviren kann wie das E7 der humanen Papillomviren das pRB inaktivieren. Dies hat eine erhöhte Expression des p16^{INK4A} zur Folge (Whyte et al. 1988, Helt und Galloway 2003). Das p16^{INK4A} akkumuliert weiterhin als Resultat des Alterns. Es kommt somit durch Kürzung der Telomerase, DNA-Schäden oder oxidativem Stress zu einer sogenannten „replikativen Seneszenz“ (Klingenberg et al. 2010). Das physiologische Altern der Gewebezellen führt ebenfalls zu einer vermehrten Expression des p16^{INK4A} (Krishnamurthy et al. 2004). Es wird weiterhin die Möglichkeit diskutiert, dass HPV früh in der Krebsentstehung beteiligt ist, aber während des Fortschreitens des Tumors verloren geht (Lewis et al. 2010). Lewis und Mitarbeiter (2010) untersuchten in diesem Zusammenhang die Erfolgsaussichten einer Therapie bei HPV[-]/p16^{INK4A}[+] -, HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -, HPV[+]/p16^{INK4A}[-] – und HPV[-]/p16^{INK4A}[-] –Patienten. Innerhalb der p16^{INK4A}[+]-Gruppe hat der Vergleich der HPV[-]- und HPV[+]-Patienten keinen Unterschied in den Erkrankungsverläufen gezeigt. Die gleichen Erfolgsaussichten bei den p16^{INK4A}[+]-Tumoren sind somit ein Hinweis auf eine mögliche HPV-Beteiligung in der Karzinogenese auch ohne Detektierbarkeit der Viren. Die p16^{INK4A}[+]-Patienten zeigen zudem unabhängig vom HPV-Status im Vergleich zu den p16[-]-Patienten eine signifikant bessere Prognose.

Die fehlende p16^{INK4A}-Überexpression bei positivem HPV-Status kann entweder durch einen technischen Fehler bei der Immunhistochemie oder durch den Funktionsverlust des p16^{INK4A} bedingt sein (Chung und Raben 2010). Eine fehlende Expression des p16^{INK4A} wird weiterhin durch eine biologisch inaktive HPV-Infektion erklärt (Smeets et al. 2007). Eine biologisch inaktive HPV-Infektion zeichnet sich durch eine persistierende Infektion mit dem humanen

Papillomvirus aus, bei der das virale Genom als autonomes Plasmid in der Wirtszelle vorliegt, wobei es zu keiner Expression der viralen mRNA kommt. Diese Infektion kann über Jahre hinweg subklinisch bleiben.

Es ist zudem aufgefallen, dass HPV[+]/p16^{INK4A}[-] -Fälle vermehrt bei starken Rauchern auftreten. Dieser zusätzliche Risikofaktor könnte zu genetischen oder epigenetischen Veränderungen geführt haben, die einen Verlust des p16^{INK4A} trotz einer HPV-Infektion zur Folge hatte (Reimers et al. 2007). Es sind auch in der vorliegenden Untersuchung sieben der acht Patienten mit einem HPV[+]/p16^{INK4A}[-] -Status aktive oder ehemalige Raucher. Die HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Fälle haben dagegen nur zur Hälfte einen Nikotinabusus in der Anamnese angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression des p16^{INK4A} als alleiniger Marker für eine HPV-Infektion auch im CUP-Metastasen-Gewebe nicht ausreichend zu sein scheint. Es ist trotz des technischen Aufwandes vielmehr sinnvoll, die HPV-Detektion, die Ermittlung des E6/E7mRNA-Expressionsstatus und die p16^{INK4A}-Immunhistochemie zu kombinieren (Hoffmann et al. 2012).

5.4 Karzinogene Risikofaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen

Die kanzerogenen Substanzen des Alkohols und Tabakrauches wurden für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs früh als Hauptrisikofaktoren erkannt (Blot et al. 1988, Franceschi et al. 1990). Diese beiden Risikofaktoren sind tatsächlich in 75% der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu finden (Blot et al. 1988). Eine Infektion mit humanen Papillomviren wird heute als ein eigenständiger Risikofaktor angesehen (Gillison et al. 2000, Applebaum et al. 2007, Gillison 2008). Es werden somit ausgehend von einigen Untersuchungen zwei unabhängige ätiologische Risikogruppen der Kopf-Hals-Tumore unterschieden: Eine Risikogruppe ist assoziiert mit Alkohol- und Tabakkonsum. Die Infektion mit dem humanen Papillomvirus steht bei der anderen Risikogruppe im Vordergrund (Gillison et al. 2000, Applebaum et al. 2007, Gillison et al. 2008). HPV-negative Tumore sind zusätzlich zum Tabak- und Alkoholkonsum regelmäßig mit einer mangelnden Mundhygiene assoziiert. HPV-positive Karzinome zeichnen sich dagegen

insbesondere durch den zusätzlichen Risikofaktor des Sexualverhaltens aus (Gillison et al. 2008). Der Faktor des Sexualverhaltens erklärt sich in der angenommenen Transmission der Viren durch sexuellen, vor allem orogenitalen, Kontakt (Smith et al. 2004). Diese Zusammenhänge sind für Populationen außerhalb der USA allerdings bisher nicht untersucht und können nur mit Vorsicht für andere Populationen angenommen werden.

Eine Untersuchung von Smith und Mitarbeitern (2010) hat folgendes Verhältnis des Alkohol- und Tabakkonsums in der HPV-negativen und HPV-positiven Gruppe gezeigt: Die HPV-negativen Patienten gaben in 76% einen Alkohol- und Nikotinabusus in der Anamnese an, während die HPV-positiven Patienten in über 90% ehemalige oder aktive Alkoholiker und Raucher waren. Smith und Mitarbeiter haben dementsprechend geschlussfolgert, dass die Infektion mit HPV allein keine ausreichende Ursache für die Entstehung der Hals-Kopf-Tumoren darstellt, sondern zusätzliche endo- oder exogene karzinogene Faktoren zur malignen Transformation der Zelle beitragen.

Aktuelle Studien zeigen, dass Rauchen einen negativen Effekt auf die Prognose HPV-positiver Patienten und Nichtrauchen einen positiven Effekt auf HPV-negative Patienten hat (Maxwell et al. 2010, Ang et al. 2010). Ang und Mitarbeiter (2010) beschreiben aufgrund dessen drei Risikogruppen der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen, die sich aus den Charakteristika HPV-Status, Packungsjahre und Tumorstatus zusammensetzen. Die Gruppen geben das Sterbens-Risiko an und werden aufgeteilt in: Hohes Risiko, intermediäres Risiko und geringes Risiko. Die Hochrisikogruppe beinhaltet HPV-negative Raucher. Die intermediäre Risikogruppe setzt sich aus HPV-positiven Rauchern und HPV-negativen Nichtrauchern zusammen. HPV-positive Nichtraucher werden als Risikogruppe mit geringem Risiko zusammengefasst.

Unabhängig von den Rauchgewohnheiten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei HPV-positiven Patienten 75-80% und bei HPV-negativen Patienten 45-50% (Ang et al. 2010). Die Überlebenszeiten HPV-positiver Patienten werden allerdings proportional zu der Anzahl der pack years (py=Packungsjahre, Anzahl der Zigarettenschachteln pro Tag multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre) kürzer (Ang et al. 2010). Es wurde zudem in der Untersuchung von Maxwell und Mitarbeitern (2010) für HPV-positive aktive Raucher im Vergleich zu HPV-positiven Nichtrauchern eine fünffach höhere Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs ermittelt. Es

ist somit davon auszugehen, dass sich das biologische Verhalten des Tumors durch Tabakkonsum ändert (Ang et al. 2010).

5.5 Korrelationen der p16^{INK4A}-Expression, dem HPV-Status und Tumor- sowie Patientencharakteristika

Es wurde in der vorliegenden Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen der HPV-positiven und der HPV-negativen Gruppe untersucht. Die Parameter Geschlecht, durchschnittliches Alter, Nodalstatus, Grading (Tumorstadium nach TNM-Klassifikation), Nikotinabusus und Alkoholabusus sind dafür mit dem HPV-Status, mit dem p16^{INK4A}-Status und mit dem kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status korreliert worden.

Die Korrelation des Risikofaktors Rauchen mit dem p16^{INK4A}-Status bzw. mit dem kombinierten HPV-Status/p16^{INK4A}-Status zeigt den einzigen signifikanten Unterschied. Die p16^{INK4A}-positiven Patienten geben in 63,6% (7/11) Tabakkonsum in der Anamnese an, die p16^{INK4A}-negativen Patienten sind dagegen in 95,8% (23/24) ehemalige oder aktive Raucher. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,026 signifikant. Die Unterschiede zwischen den vier Gruppen HPV[-]/p16^{INK4A}[-], HPV[-]/p16^{INK4A}[+], HPV[+]/p16^{INK4A}[-] und HPV[+]/p16^{INK4A}[+] bezüglich des Nikotinabusus sind mit einem p-Wert von 0,028 ebenfalls signifikant. Es sind 100% (16/16) der HPV[-]/p16^{INK4A}[-]-Patienten ehemalige oder aktive Raucher. Die HPV[+]/p16^{INK4A}[+]-Patienten verzeichnen im Gegensatz dazu nur in 50% (3/6) einen Tabakkonsum. Der Anteil an Rauchern ist bei den HPV-positiven Patienten geringer (10/14, 71,4% versus 20/21, 95,2% der HPV-negativen Gruppe).

Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Alkoholkonsums kann nicht festgestellt werden. Es ist trotzdem zu bemerken, dass HPV-positive Patienten zu 35,7% (5/11) und im Gegensatz dazu HPV-negative Patienten zu 52,4% (11/21) einen Alkoholabusus in der Anamnese aufzeigen. Bei Vergleich der HPV[+]/p16^{INK4A}[+]-Patienten mit den HPV[-]/p16^{INK4A}[-]-Patienten bezüglich des Alkoholkonsums sind die Unterschiede noch deutlicher: Die HPV[+]/p16^{INK4A}[+]-Patienten wiesen keinen Alkoholkonsum in der Anamnese auf (0/6, 0%), die HPV[-]/p16^{INK4A}[-]-Patienten waren dagegen zu 50% alkoholabhängig (8/16).

Eine Untersuchung bezüglich der Prognose und der Auswirkung von Risikofaktoren, insbesondere des Nikotinabusus, auf den Behandlungserfolg ist von Interesse. Aufgrund der kleinen Fallzahl von 35 Patienten ist hier auf eine Lebensdatenanalyse verzichtet worden. Es ist allerdings eine Lebensdatenanalyse der vorliegenden Daten zusammen mit Ergebnissen einer Untersuchung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt worden, die im folgenden Kapitel behandelt wird.

5.6 Das CUP-Syndrom im Hamburger und Kieler Patientenkollektiv

Es sind parallel zu der vorliegenden Promotionsarbeit im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation Untersuchungen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) an CUP-Syndromen und HPV durchgeführt worden. Die Untersuchung der CUP-Syndrome ist dort mit den gleichen wissenschaftlichen Methoden wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden.

Es sind CUP-Syndrome von insgesamt 63 Patienten (35 Patienten am UKSH Kiel, 28 Patienten am UKE Hamburg) untersucht worden. Vier der Patienten (6%) haben einen Primärtumor im Krankheitsverlauf entwickelt: Zwei Primärtumoren sind im Zungengrund (nach drei und 45 Monaten), ein Primärtumor im Parapharynx (nach neun Monaten) und ein Primärtumor in der Tonsille (nach 24 Monaten) gefunden worden. Der nach drei Monaten gefundene Primärtumor am Zungengrund ist streng genommen kein CUP-Syndrom. Der Primärtumor im Parapharynx ist dagegen am ehesten eine Metastase und kein Primärtumor. In diesem Fall wäre eine genauere Untersuchung des Nasopharynx sinnvoll gewesen, da die parapharyngealen Metastasen oft ihren Ursprung im Nasopharynx haben.

Rezidive sind bei 16 Patienten nach einer medianen Zeit von 6,9 Monaten aufgetreten. Fernmetastasen sind nach einer medianen Zeit von 10,2 Monaten bei acht Patienten diagnostiziert worden. Ein Patient hat lokoregionale und Fernmetastasen entwickelt.

Eine HPV-Infektion zeigte sich bei der Untersuchung am UKE bei 19 der 28 untersuchten CUP-Syndrome (68%). Der Unterschied zwischen den HPV-Prävalenzen in Kiel und Hamburg ist statistisch signifikant ($p=0,0266$) und kann gegebenenfalls auf geographische Einflüsse zurückgeführt werden. Die Typisierung der Hamburger Untersuchung hat wie in Kiel eine

überwiegende Prävalenz des HPV-Genotyps 16 mit 84% (16/19) ergeben. Es waren allerdings auch drei CUP-Syndrome positiv für HPV33 (3/19, 16%). Eine Überexpression des p16^{INK4A} konnte in 24 der 28 Fälle (86%) ermittelt werden, was wiederum ein signifikanter Unterschied zur p16^{INK4A}-Expression in Kiel mit nur 31,4% darstellt ($p < 0,0001$).

Der Nikotinabusus insgesamt ist in Hamburg mit einem Anteil von 68% (19/28) ebenfalls geringer als in Kiel ($p = 0,0722$). Es ist ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen der Raucher mit über zehn pack years festgestellt worden ($p = 0,0493$): Die Hamburger Patienten verzeichnen in 16 Fällen über zehn pack years (16/28, 57%), die Kieler Patienten geben dagegen in 28 Fällen über zehn pack years in der Anamnese an (28/35, 80%). Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den CUP-Syndromen des UKE Hamburg und des UKSH Kiel ist in dem Charakteristikum des extrakapsulären Wachstums gefunden worden (11/28 [39%] für Hamburg vs. 23/35 [65%] für Kiel, $p = 0,0356$).

Die Korrelation des kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status mit Tumor-beziehungsweise Patientencharakteristika hat in zwei Fällen ein signifikantes Ergebnis erbracht: CUP-Syndrome, die negativ für HPV-DNA, p16^{INK4A} oder beides waren, zeigten ein extrakapsuläres Wachstum in 65% (26/40). Das Wachstum der HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -CUP-Syndrom-Metastasen ging dagegen in nur 35% (8/23) über die Kapsel hinaus ($p = 0,0199$). Die HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten sind zudem signifikant häufiger aktive oder ehemalige Raucher (9/23, 61%) als HPV[-], p16^{INK4a}[-] oder HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Patienten (4/40, 10% [$p = 0,0067$]).

Die Lebensdatenanalyse hat eine mediane Nachbeobachtungszeit von insgesamt 23 Monaten ergeben (UKE Hamburg 15 Monate, UKSH Kiel 32 Monate). Die 2-Jahresüberlebensrate beträgt bei den HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten 75,7 Jahre. Es gibt hier keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten und den HPV[-], p16^{INK4a}[-] oder HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Patienten (75,3 Jahre). Es ist aber auffällig, dass das progressionsfreie Überleben über zwei Jahre bei den HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten numerisch höher ist als bei den HPV[-], p16^{INK4a}[-] oder HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Patienten (79,5% vs. 67,8%). HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten mit über 10 pack years haben allerdings ein schlechteres therapeutisches Ergebnis als HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten mit weniger als zehn pack years in der Anamnese gezeigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit zusammen mit den Ergebnissen der Hamburger Untersuchung zeigen insgesamt einen Zusammenhang humaner Papillomviren mit der Pathogenese der CUP-Syndrome im Kopf-Hals-Bereich. Die Detektion des Primärtumorsitzes aufgrund der HPV-Prävalenz ist nicht sicher möglich, allerdings scheinen die Tonsillen als Ausgangspunkt der HPV-positiven CUP-Syndrome sehr wahrscheinlich: Die Tonsillen des Oropharynx sind zum einen mit einer HPV-Prävalenz von 50% besonders prädestiniert für HPV-Infektionen. Die Tonsillenkzinome zeichnen sich zudem durch besondere Tumorcharakteristika wie schnelles Wachstum und frühe lokoregionale Metastasierung aus. Es ist desweiteren eine inverse Korrelation der HPV-positiven CUP-Syndrome mit dem Nikotinabusus festzustellen. Ein Tabakkonsum in der Anamnese kann so signifikant häufiger in HPV-negativen CUP-Syndrom-Patienten festgestellt werden. Die Rolle des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4A} als verlässlichen Ersatzmarker für eine HPV-Infektion konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Humane Papillomviren sind als Erreger benigner und maligner Läsionen an Haut und Schleimhäuten seit den siebziger Jahren intensiv erforscht worden. Die HP-Viren sind ebenfalls an der Pathogenese von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs beteiligt. Die HPV-Prävalenz in Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs liegt insgesamt bei 20 bis 30%; die humanen Papillomviren sind aber besonders mit Plattenepithelkarzinomen der Tonsillen assoziiert. HPV-positive Tonsillenkarzinome zeichnen sich neben der hohen HPV-Prävalenz von 50% durch ein aggressives biologisches Wachstum mit früher Metastasierung in die lokoregionären Lymphknoten aus. Patienten mit solchen HPV-positiven Karzinomen zeigen dennoch vergleichsweise gute Überlebensdaten, was auf das bessere Ansprechen auf die Therapie, insbesondere auf die Strahlentherapie zurückgeführt wird.

Die infektiöse Pathogenese durch humane Papillomviren wird auch bei zervikalen Lymphknotenmetastasen ohne bekanntem Primärtumor - dem CUP-Syndrom des Kopf-Hals-Bereichs - diskutiert. Es wird angenommen, dass der Ausgangsort der zervikalen CUP-Metastasen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Karzinom des oberen Aerodigestivtrakts, insbesondere der Tonsillae palatinae und lingualis, ist; die Diagnostik beschränkt sich daher auf diese anatomischen Lokalisationen. Die via solcher Diagnostik erreichte Detektion eines Primärtumors zöge die Eingrenzung der Therapie und folglich der Morbidität der Therapie nach sich. Dem sorgfältigen Ausschluss des Vorhandenseins eines Primärtumors kommt demnach beim Verdacht auf ein CUP-Syndrom besondere Bedeutung zu. Die HPV-Analyse an CUP-Metastasengewebe böte einen innovativen diagnostischen Ansatz zur Identifikation des Primärtumorsitzes, wenn sich durch HPV-Prävalenzbestimmungen bestätigen ließe, dass tatsächlich Tonsillenkarzinome Ausgangsort der CUP-Metastasen sind.

Es ist in der vorliegenden Promotionsarbeit untersucht worden, ob CUP-Metastasen HPV-Infektionen zeigen und wie hoch die HPV-Prävalenz in den Lymphknotenmetastasen ist, um anhand der Prävalenzrate Rückschlüsse auf den zu vermutenden Primärtumorsitz zu ziehen. Die extrahierte DNA aus 35 Metastasen-Gewebeproben von Patienten mit CUP-Syndrom des Kopf-Hals-Bereichs ist dafür mittels LCD-Array auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht worden. Histopathologische Schnitte der zervikalen Lymphknotenmetastasen

sind desweiteren mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein des zellulären Tumorsuppressorproteins p16^{INK4A} untersucht worden. Eine Überexpression des p16^{INK4A} wird bei Vorhandensein einer biologisch relevanten HPV-Infektion angenommen. Der HPV-Status, der p16^{INK4A}-Status sowie der kombinierte HPV/p16^{INK4A}-Status sind mit Tumor- und Patientencharakteristika korreliert worden. So ist auch der Frage nachgegangen worden, (i) inwiefern man durch das Expressionsmuster des p16^{INK4A} Rückschlüsse auf den HPV-Status ziehen kann und (ii) ob es signifikante Korrelationen des HPV- und/oder p16^{INK4A}-Status zu Tumorcharakteristika und den Risikofaktoren Nikotin und Alkohol gibt.

Es wird gezeigt, dass eine HPV-Infektion bei 14 der 35 (40%) zervikalen CUP-Syndrome vorliegt. Der HPV-Genotyp 16 ist in allen 14 HPV-positiven CUP-Syndromen gefunden worden. Eine Überexpression des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4A} ist bei 11 der 35 (31,4%) Tumorgewebeproben nachgewiesen worden. Die Korrelation des HPV-Status mit der p16^{INK4A}-Expression ergibt in nur sechs Fällen einen positiven HPV- als auch p16^{INK4A}-Status (6/35, 17,2%). Acht Patienten zeigen den Status HPV[+]/p16^{INK4A}[-] (8/35, 22,9%), fünf Patienten den Status HPV[-]/p16^{INK4A}[+] (5/35, 14,3%) und 16 Patienten sind negativ für HPV und p16^{INK4A} (16/35, 45,7%). Die Korrelation des HPV- und/oder p16^{INK4A}-Status mit den Tumor- und Patientencharakteristika hat zwei signifikante Ergebnisse ergeben: Ein signifikanter Unterschied ist zwischen den p16^{INK4A}-positiven und p16^{INK4A}-negativen Proben bezüglich des Risikofaktors Nikotinabusus festgestellt worden. Die p16^{INK4A}-positiven Patienten sind so in 63,6% (7/11) Raucher, bei den p16^{INK4A}-negativen Patienten kann dagegen in 95,8% (23/24) ein Tabakkonsum in der Anamnese festgestellt werden. Das zweite signifikante Ergebnis hat die Korrelation des Risikofaktors Nikotinabusus mit dem kombinierten HPV/p16^{INK4A}-Status ergeben. Der Anteil an Rauchern ist auch hier bei den HPV[+]/p16^{INK4A}[+] -Patienten mit 50% (3/6) deutlich geringer als bei den HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Patienten mit 100% (16/16).

Es kann somit aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass humane Papillomviren auch in der Pathogenese des zervikalen CUP-Syndroms eine Rolle zu spielen scheinen. Die HPV-Prävalenz von 40% in den CUP-Metastasen macht die Tonsillen als Ausgangsort für die Metastasierung wahrscheinlich, sodass bei positivem HPV-Status der CUP-Metastasen der Oropharynx, insbesondere die Tonsillen, als Primärkarzinomregion

angenommen werden kann, wohingegen ein negativer HPV-Status für eine Lokalisation des Primärtumors außerhalb des Oropharynx spricht.

Es sind parallel zu der vorliegenden Promotionsarbeit identische Untersuchungen an einem Patientenkollektiv mit CUP-Syndromen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt worden. Die Verlaufsdaten der Patienten beider Zentren sind gemeinsam und vergleichend statistisch ausgewertet worden. Die Auswertung hat eine mediane Nachbeobachtungszeit von insgesamt 23 Monaten ergeben. Vier Patienten (6%) haben einen Primärtumor im Krankheitsverlauf entwickelt. Es konnte bezüglich der 2-Jahresüberlebensrate kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HPV[+]/p16^{INK4A}[+] - Patienten und den HPV[-], p16^{INK4a}[-] oder HPV[-]/p16^{INK4A}[-] -Patienten gezeigt werden. HPV[+]/p16^{INK4A}[+] –Patienten mit über 10 pack years haben allerdings ein schlechteres therapeutisches Ergebnis als HPV[+]/p16^{INK4A}[+] –Patienten mit weniger als zehn pack years in der Anamnese gezeigt. Die Ergebnisse bestätigen demnach einen bereits vermuteten negativen Effekt des Rauchens auf Patienten unabhängig von deren HPV-Status.

Die vorliegende Arbeit zeigt insgesamt, dass CUP-Metastasen anteilig HPV-infiziert sind und eine auf dieser Infektion basierte Genese der CUP-Syndrome in diesen Fällen wahrscheinlich ist. HPV-positive CUP-Metastasen entstammen aller Wahrscheinlichkeit nach aus der anatomischen Region des Oropharynx (spezifisch den Tonsillen) und HPV-negative aus der Region außerhalb des Oropharynx. Sollte sich dieser Zusammenhang bestätigen, wäre die Desintensivierung der Strahlentherapie, wie sie für HPV-positive Tonsillenkarzinome diskutiert wird, auch für HPV-positive CUP-Syndrome denkbar.

7. Literaturverzeichnis

- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân 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.* 2010 Jul 1; 363(1):24-35.
- Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, Eisen EA, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT (2007): Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Dec 5; 99(23):1801-10.
- Barwad A, Sood S, Gupta N, Rajwanshi A, Panda N, Srinivasan R (2011): Human papilloma virus associated head and neck cancer: A PCR based study. *Diagn Cytopathol.* 2011 Apr 6. doi: 10.1002/dc.21667.
- Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH (2003): Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec 15;9(17):6469-75.
- Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH (2005): Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15; 11(16):5694-9.
- Begum S, Gillison ML, Nicol TL, Westra WH (2007): Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15; 13(4):1186-91.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010): Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010 May 25;401(1):70-9.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988 Jun 1; 48 (11): 3282-7.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D (1995): Association between cigarette smoking and mutation of the

p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Engl J Med.* 1995 Mar 16; 332(11): 712-7.

- Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF (2007): INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life.* 2007 Jul; 59(7):419-26.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU (1995): Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 1995 May; 69(5):3074-83.
- Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K (1991): Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med.* 1991 Aug; 20(7): 305-17.
- 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.* 2008 Feb 1; 26(4):612-9.
- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH (1982): The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature.* 1982 Oct 7; 299(5883):529-34.
- Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Burk RD (2006): Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology.* 2007 Apr 10; 360(2):447-53.
- Chow LT, Broker TR, Steinberg BM (2010): The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS.* 2010 Jun; 118(6-7):422-49. Review.
- Chung CH, Raben D (2010): p16 Expression as a predictive biomarker of hypoxic all-sensitizing agents in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 20; 28(27):4103-4.
- Cianchetti M, Mancuso AA, Amdur RJ, Werning JW, Kirwan J, Morris CG, Mendenhall WM (2009): Diagnostic evaluation of squamous cell carcinoma metastatic to cervical lymph nodes from an unknown head and neck primary site. *Laryngoscope.* 2009 Dec; 119(12):2348-54.
- Ciuffo G (1907): Innesto positive con filtrato di verruca volgare. *Giornale Ital. Mal. Ven. Pelle* 48: 12–17.

- Colletier PJ, Garden AS, Morrison WH, Goepfert H, Geara F, Ang KK (1998): Postoperative radiation for squamous cell carcinoma metastatic to cervical lymph nodes from an unknown primary site: outcomes and patterns of failure. *Head Neck*. 1998 Dec;20(8):674-81.
- Compton AM, Moore-Medlin T, Herman-Ferdinandez L, Clark C, Caldito GC, Wang XI, Thomas J, Abreo FW, Nathan CA (2011): Human papillomavirus in metastatic lymph nodes from unknown primary head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Jul;145(1):51-7.
- Conway MJ, Meyers C (2009): Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009 Apr;88(4):307-17. Review.
- Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A (1998): The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res*. 1998 May 25;241(1):76-83.
- Cunningham LL Jr, Pagano GM, Li M, Tandon R, Holm SW, White DK, Lele SM (2006): Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):77-81.
- Danos O, Katinka M, Yaniv M (1982): Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papoviridae. *EMBO J*. 1982;1(2):231-6.
- Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK (1992): Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol*. 1992 Sep;73 (Pt9): 2327-36.
- Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS (2010): Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010 Jun 29; 2:15.
- Desai PC, Jaglal MV, Gopal P, Ghim SJ, Miller DM, Farghaly H, Jenson AB (2009): Human papillomavirus in metastatic squamous cell carcinoma from unknown primaries in the head and neck: a retrospective 7 year study. *Exp Mol Pathol*. 2009 Oct;87(2):94-8.
- de Villiers EM (1989): Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol*. 1989 Nov;63(11):4898-903. Review.

- de Villiers EM (1997): Papillomavirus and HPV Typing. *Clinics in Dermatology* 1997;15:199-206.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004): Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- Doorbar J (2005): The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15. Review.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007): Case-Control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1944-56.
- El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM (2008): Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary tumor. *Head Neck Pathol*. 2008 Sep;2(3):163-8.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 20; 100(4): 201-9.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, López-Albaitero A, Gollin SM, Johnson JT, Khan S (2005): Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): a natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2005 Mar; 45(5):807-15.
- Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D, La Vecchia C (1990): Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res*. 1990 Oct. 15; 50(20): 6502-7.
- Franceschi S, Muñoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM (1996): Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Jul;5(7):567-75. Review.

- Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP (2003): p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem.* 2003 Oct;51(10):1291-7.
- Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, Posner MR, Clark JR, Eisen EA, Kelsey KT (2007): Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2386-92.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ (2006): Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006 Nov;13(11):1915-26.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000): Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):709-20.
- Gillison ML (2004): Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical and molecular entity. *Semin Oncol.* 2004 Dec; 31(6):744-54. Review.
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008): Distinct risk factors profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Mar 19; 100(6): 407-20.
- Gillison ML (2008): Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *J Adolesc Health.* 2008 Oct; 43(4Suppl): S 52-60.
- Grau C, Johansen LV, Jakobsen J, Geertsen P, Andersen E, Jensen BB (2000): Cervical lymph node metastases from unknown primary tumours. Results from a national survey by the Danish Society of Head and Neck Oncology. *Radiother Oncol.* 2000 May;55(2):121-9.
- Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996): Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell cycle immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996 Mar;16(3):859-67.

- Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM (1995): p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4420-4.
- Helt AM, Galloway DA (2003): Mechanism by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis.* 2003 Feb;24(2):159-69.
- Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group (2003): Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Dec 3; 95(23): 1772-83.
- Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ (2006): Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* 2006 Aug; 31(4):259-66. Review.
- Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E (2003): Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral Oncology* 40: 520-524.
- Hoffmann M, Görögh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T (2005a): Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett.* 2005 Feb 10;218(2):199-206.
- Hoffmann M, Gottschlich S, Görögh T, Lohrey C, Schwarz E, Ambrosch P, Kahn T (2005b): Human papillomaviruses in lymph node neck metastases of head and neck cancers. *Acta Otolaryngol.* 2005 Apr;125(4):415-21.
- Hoffmann M, Scheunemann D, Fazel A, Görögh T, Kahn T, Gottschlich S (2009): Human papillomavirus and p53 polymorphism in codon 72 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009 Mar;21(3):809-14.
- Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010): p16(INK4A) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2010 Oct 1;127(7):1595-602.
- Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Görögh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Röcken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M (2012): HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck

cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett.* 2012 Oct 1;323(1):88-96. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.033.

- Horvath CAJ, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP (2010): Mechanismus of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology*. 2010 Jan 20;7:11. Review.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991): A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 1991 Dec;10(13):4129-35.
- IARC Monographs (2007): Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 90. Lyon: IARC, 2007.
- Issing WJ, Taleban B, Tauber S (2003): [Diagnosis and management of squamous cell carcinoma of the head and neck region with unknown primary. A survey of 167 patients]. [Article in German]. *Laryngorhinootologie*. 2003 Sep;82(9):659-65.
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006): Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006 May 10; 24(14): 2137-50.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994 Apr 15; 264(5157): 436-40.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001): Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer:* 92, 276-284 (2001).
- Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, Klussmann JP, Speel EJ (2010): p16INK4A overexpression is frequently detected in tumor-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology.* 2010 Jun; 56(7): 957-67.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in Tonsillar Carcinomas. *Cancer.* 2001 Dec 1; 92(11): 2875-84.
- Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003a): Expression of p16 protein identifies a distinct entity of

tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* 2003 Mar; 162(3): 747-53.

- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003b): Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity. *Med Microbiol Immunol.* 2003 Aug; 192(3):129-32.
- Klussmann JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weissenborn S, Wieland U, Dienes HP, Hoffmann T, Smith E, Turek L, Speel EJ, Pfister HJ (2004): (HPV-associated tonsillar cancer- An update) (Article in German). *HNO* 2004 Mar; 52(3): 208-18.
- Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Straetmans JM, Manni JJ, Hopman AH, Speel EJ, laessen SM, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF (2009): Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 1; 15(5): 1779-86.
- Koch WM, Bhatti N, Williams MF, Esile DW (2001): Oncologic rationale for bilateral tonsillectomy in head and neck squamous cell carcinoma of unknown primary source. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Mar; 124(3):331-3.
- Kovanda A, Kocjan BJ, Luzar B, Bravo IG, Poljak M (2011): Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS One.* 2011; 6(7):e22529.
- Krämer A, Hübner G, Schneeweiss A, Folprecht G, Neben K (2008): Carcinoma of Unknown Primary-an Orphan Disease? *Breast Care (Basel).* 2008;3(3):164-170.
- Kreimer AK, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Feb;14(2):467-75.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004): INK4A/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004 Nov; 114(9): 1299-307.
- Lapeyre M, Malissard L, Pfeiffert D (1997): Cervical lymph node metastasis from an unknown primary: is tonsillectomy necessary. *In J Radiat Oncol Biol Phys.* 39, 291-6.
- 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.* 2010 Aug; 34(8):1088-96.

- Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994): Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* 1994 Dec 1; 54(23): 6078-82.
- Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, Näsman A, Dahlstrand H, Lindholm J, Onelöv L, Ramqvist T, Ye W, Munck-Wikland E, Dalianis T (2007): Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol.* 2007 Dec;1(3):350-5.
- Mahnke CG, Werner JA, Fröhlich O, Lippert BM, Hoffmann M, Rudert HH (1998): klinische und molekularbiologische Untersuchungen zur respiratorischen Papillomatose. *Laryngorhinootologie.* 1998 Mar;77(3):157-64. German.
- Majewski S, Jablonska S (1995): Epidermodysplasia verruciformis as model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 131: 1312-1318.
- Majewski S, Jablonska S (1997): Skin Autorafts in Epidermodysplasia Verruciformis: Human Papillomavirus-associated Cutaneous Changes Need Over 20 Years for Malignant Conversion. *Cancer Res* 1997; 57:4214-4216.
- 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.* 2009 Jun;29(3):119-26.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):781-9.
- Marcuzzi GP, Hufbauer M, Kasper HU, Weissenborn SJ, Smola S, Pfister H (2009): Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol.* 90: 2855-64.
- Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Teknos TN, Chepeha DB, McHugh JB, Urba SG, Stoerker J, Walline HM, Kurnit DM, Cordell KG, Davis SJ, Ward PD, Bradford CR, Carey TE (2010): Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res.* 2010 Feb 15; 16(4): 1226-35.
- May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H (1994): The E6/E7 promotor of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular

repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* 1994 Mar 15;13(6):1460-6.

- McLaughlin-Drubin ME, Münger K (2009): The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Virology.* 2009 February 20; 384(2): 335–344.
- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E (2000): Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer.* 2000 May 20;89(3):300-4.
- Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U (2010): *Molekulare Virologie 3. Auflage.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H(1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T (2009): Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced-carcinoma? *Int J Cancer.* 2009 Jul 15; 125(2):362-6.
- Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF (2005): Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol.* 2005 Oct;79(20):13150-65.
- Naresh KN (2002): Do metastatic tumours from an unknown primary reflect angiogenic incompetence of the tumour at the primary site?-a hypothesis. *Med Hypotheses.* 2002 Sep;59(3):357-60.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T (2007): Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis:Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1505-11.
- Neben K, Hübner G, Folprecht G, Jäger D, Krämer A (2008): Metastases in the Absence of a Primary Tumor: Advances in the Diagnosis and Treatment of CUP Syndrome. *Dtsch Arztebl Int.* 2008 Oct;105(43):733-40.

- Nieder C, Gregoire V, Ang KK (2001): Cervical lymph node metastases from occult squamous cell carcinoma: cut down a tree to get an apple? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Jul 1; 50(3):727-33. Review.
- Pai SI, Westra WH (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4:49-70. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158. Review.
- Pavlidis N, Fizazi K (2005): Cancer of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Jun;54(3):243-50.
- Payne J (1891): On the contagious rise of common warts. *Br. J. Dermatol.* 3, 185–189.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S (2002): Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):886-91.
- Pfister H (2008): HPV and skin neoplasia. *Hautarzt.* 2008 Jan;59(1):26-30.
- Pfister H (2011): Biology of epidermodysplasia verruciformis- associated HPV. *Hautarzt.* 2011 Jan;62(1):17-21.
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP (2007): Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007 Apr 15; 120(8): 1731-8.
- Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, Solomon B, Choi J, O'Sullivan B, Kenny LM, McArthur GA (2010): Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 20; 28(27): 4142-8.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):495-505.
- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G (1987): Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol.* 1987 Oct;61(10):3295-8.
- Sendler A, Strumberg D, Tannapfel A (2008): (Carcinoma of unknown primary (CUP syndrome) (Article in German). *Chirurg.* 2008 Jul;79(7):689-95; quiz 696.

- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
- Shirasawa H, Tomita Y, Kubota K, Kasai T, Sekiya S, Takamizawa H, Simizu B (1986): Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol*. 1986 Sep;67 (Pt 9):2011-5.
- Shope RE (1932): A filtrable virus causing a tumor-like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatousum. *J Exp Med*. 1932 Nov 30; 56(6):803-22.
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007): A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int.J.Cancer*:121, 2465-2472.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004): Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004 Feb 20; 108(5): 766-72.
- Smith EM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP (2010): Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2010 Jul 1; 127(1):111-7.
- Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO (1989): Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1441-7.
- Steben M, Duarte-Franco E (2007): Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2-5. Review.
- Strauss, Shaw EW, et al. (1949): Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 72, 46-50.
- Syrjänen S (2010): The role of human Papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol*. 2010 Oct; 21 Suppl 7:vii243-5. doi: 10.1093/annonc/mdq454. Review.
- Terai M, DeSalle R, Burk RD (2002): Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus* timneh papillomavirus. *J Virol*. 2002 Oct;76(19):10020-3.

- Thomas M, Banks L (1999): Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol.* 1999 Jun;80 (Pt 6):1513-7.
- 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.* 2011 May 28; 304(2):71-9.
- Vaamonde P, Martín Martín C, del Río Valeiras M, Labella Caballero T (2002): [A study of cervical metastases from unknown primary tumor].[Article in Spanish]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002 Oct;53(8):601-6.
- van de Wouw AJ, Jansen RL, Speel EJ, Hillen HF (2003): The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review. *Ann Oncol.* 2003 Feb;14(2):191-6.
- Vousden K (1993): Interactions of human papillomavirus transforming proteins with products of tumor suppressor genes. *FASEB J.* 1993 Jul;7(10):872-9. Review.
- Weber A, Schmoz S, Bootz F (2001): CUP (carcinoma of unknown primary) syndrome in head and neck: clinic, diagnostic, and therapy. *Onkologie.* 2001 Feb;24(1):38-43.
- Weiss D, Koopmann M, Rudack C (2011): Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011 Jun; 33(6):856-62. doi: 10.1002/hed.21548.
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature.* 1988 Jul 14; 334(6178): 124-9.
- Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB (1998): Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1998 Jan; 152(1):145-56.
- Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP (2005): Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol.* 2005;62:72-80.
- Xiong Y, Zhang H, Beach D (1993): Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev.* 1993 Aug;7(8):1572-83.

- Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA, Nohaile M, Botchan M (1993): The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATD-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun 1;90(11):5086-90.
- Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T (2007): Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2007 May;27(10):3732-42.
- Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P (1995): Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995 Oct;69(10):6389-99.
- Zhao KN, Sun XY, Frazer IH, Zhou J (1998): DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology.* 1998 Apr 10;243(2):482-91.
- Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH (1994): Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol.* 1994 Feb; 68(2):619-25.
- zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974): Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: nucleic acid hybridisation with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13: 650-656.
- zur Hausen H (1976): Condylomata accuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* Feb; 36 (2 pt 2): 794.
- zur Hausen H (1989): Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* 1989 Sep 1;49(17):4677-81.
- zur Hausen H, de Villiers EM (1994): Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:427-47. Review.
- zur Hausen H (1996): Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9; 1288(2):F55-78. Review.
- zur Hausen H (2000): Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3; 92(9):690-8. Review.
- zur Hausen H (2009): Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology* 384 (2009)260-265.

8. Anhang

Tabelle 1.

Nummer	TNM	Alter	Geschlecht
1	TX N2a M0	57	M
2	TX N3 M1	60	M
3	N2c	51	M
4	TX N1 M0	65	W
5	TX N1M0	49	M
6	TX N2b M0	52	M
7	TX N2a	71	W
8	TX N3 M1	53	M
9	TX N2b M0	64	W
10	TX N2b M0	58	W
11	TX N2b M0	64	W
12	TX N3 M0	71	M
13	TX N3 M0	45	M
14	TX N2aM0	64	M
15	TX N2aM0	48	W
16	TX N2b M0	57	M
17	TX N2b M0	59	M
18	TX N2b M0	56	M
19	TX N3 M0	56	M
20	TX N3 M0	50	W
21	TX N2b M0	57	M
22	TX N3 M0	67	M
23	TX N2a M0	48	M
24	TX N3 M0	64	M
25	TX N2a M0	43	M
26	TX N3 M0	58	M
27	TX N2b M0	51	M
28	TX N3 M0	49	M
29	TX N3 M0	53	M
30	TX N2b M0	56	W
31	TX N3 M0	59	M
32	TX N2a M0	65	M
33	TX N2b M0	66	M
34	TX N3 M0	56	M
35	TX N2b M0	72	M
		57,5	8 Frauen 27 Männer

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Petra Ambrosch, der Direktorin der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie Kiel für meinen Arbeitsplatz und die guten Arbeitsbedingungen bedanken.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Herrn Privatdozent Dr. Markus Hoffmann, leitender Oberarzt dieser Klinik, richten. Seine viel entgegen gebrachte Geduld, die wertvollen Ratschläge und kritischen Anregungen haben einen großen Anteil zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Dr. Hannes Henry bedanken, der mir bei der Vorbereitung der experimentellen Arbeit sowie bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte geholfen hat.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Herrn Privatdozent Dr. Tibor Görögh, der mich nicht nur bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat, sondern mir stets mit einem wissenschaftlichen Rat zur Seite stand.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Annemarie Roen, die mir eine große Hilfe bei der experimentellen Arbeit gewesen ist. Durch ihre angenehme und offene Art konnte ich viele schöne Stunden im Labor verbringen.

Ich habe auch Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken, Direktor des Instituts für Pathologie am UKSH Kiel, für die Bereitstellung der Gewebeproben und Herrn Dr. Jochen Haag, Naturwissenschaftler an dem Institut für Pathologie, für die Ermöglichung der Durchführung des LCD-Arrays zu danken.

Ein besonderer Dank geht weiterhin an meine langjährige gute Freundin Frau Johanna Thiede für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Auch geht mein Dank an meinen guten Studienfreund Herrn Jan Simon Steffen, der mir das Dissertationsthema vermittelt hat.

Danken möchte ich auch meinem Freund Herrn Sebastian Naschke, der mir besonders bei den letzten Korrekturen eine große Hilfe und Unterstützung war.

Gewidmet ist die Arbeit in großer Dankbarkeit meinen Eltern Frau Karen und Herrn Dr. Ralf Bastrop.

Lebenslauf**Persönliche Angaben:**

Name: Sophie Bastrop
Geburtsdatum: 15. Februar 1988
Geburtsort: Rostock

Schulbildung:

2007 Abitur am Friedrich-Franz-Gymnasium Parchim

Studium:

2007-2009 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2009-2012 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2012 Beginn Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums
1. Tertial: Allgemeinmedizin

2015 voraussichtlich 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion:

2009-2013 Anfertigung der Dissertation an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Thema: Humane Papillomvirus-Infektionen beim CUP-Syndrom des Kopf-Hals-Bereichs

Publikation:

HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking and outcome. Oral Oncol. 2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den.....

.....

(Sophie Bastrop)