

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG VON HMGA2 ALS PROGNOTISCHER FAKTOR BEI
PLATTENEPIHELKARZINOMEN DER MUNDSCHLEIMHAUT INSBESONDERE IM
VERGLEICH ZU ANDEREN PROGNOTISCHEN MARKERN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANNE KATHARINA OHLMANN

aus **Kiel**

Kiel **2016**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Warnke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bodo Kurz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Mundhöhlenkarzinome	1
1.2 Humanes Papillomavirus (HPV)	2
1.3 Protein p16	4
1.4 High mobility group A2 (HMGA2)	5
1.5 TNM-Klassifikation und Tumordifferenzierung	8
1.6 Ziel der Arbeit	9
2 Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.2 Methoden	11
2.2.1 HPV-Detektion	11
2.2.2 p16-Färbung	14
2.2.3 HMGA2-Analyse	15
2.2.4 Statistische Methoden	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Rezidivfreies Überleben	23
3.2 Gesamtüberleben	27
4 Diskussion	31
5 Zusammenfassung	37
6 Literaturverzeichnis	38
7 Anhang	46
7.1 PCR-Primer	46
7.2 Gelbilder HPV-Nachweis	46
8 Danksagung	51

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDK	Cyclin-dependent Kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Ct	Cycle threshold (Schwellenwert-Zyklus)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
et al.	et alii (und Koautoren)
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
G	Grading
G1-Phase	Zwischenphase (Gap) des Zellzyklus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGA2	High Mobility Group A 2
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems revision 10
INK4A	Inhibitor of cyclin dependent Kinase 4A
kb	Kilobasenpaare
p16	Protein mit 16 Kilo Dalton Molekularmasse
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEC	Plattenepithelkarzinom
pRb	Retinoblastom-Protein
p-Wert	Probability (Signifikanzwert)
R0	Kein Residualtumor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RQ	Relative Quantification (relative Mengenbestimmung)
RT	Reverse Transcription
SPF	Short PCR-Fragment Primer
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TNM-Klassifikation	Stadieneinteilung von malignen Tumoren: T=Tumor(ausdehnung), N = Nodes = Lymphknoten, M = Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Mundhöhlenkarzinome

2012 erkrankten in Deutschland 12.940 Patienten (9.290 Männer vs. 3.650 Frauen) an bösartigen Tumoren im Mundhöhlen und Rachenbereich. Die Anzahl der Neuerkrankungen steigt in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich an (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.). Weltweit wird die Anzahl der Neuerkrankungen in der Mundhöhle auf mehr als 300.000 Fälle geschätzt. Man geht davon aus, dass diese Krebsart jährlich für ca. 145.000 Todesfälle verantwortlich ist (Torre et al. 2015). Ungefähr 90% dieser bösartigen Neubildungen sind Plattenepithelkarzinome (PEC). Risikofaktoren für diese Form von Neubildung sind insbesondere Tabak- und Alkoholkonsum (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.), sowie in Indien und benachbarten Ländern das Kauen von Betel Nüssen (Torre et al. 2015). Ein Teil der Karzinome wird auch mit der Infektion durch das Humane Papillomavirus (HPV) in Verbindung gebracht (Herrero et al. 2003), (Smith et al. 2004), (Upile et al. 2014), (Kruger et al. 2014). Rezidivraten werden in der Literatur mit 25-45% angegeben (Mücke et al. 2009). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Mittel bei 48% für Männer und 61% für Frauen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.).

In den letzten Jahren wurden diverse Marker für die Prognoseabschätzung bei Tumoren der Kopf- und Halsregion vorgeschlagen (D'Silva, Ward 2007), (Miyazawa et al. 2004). Trotzdem wird in der Klinik die Prognose immer noch hauptsächlich anhand der T(Tumor) N(Nodus) M(Metastase)-Klassifizierung abgeschätzt.

Diese Arbeit konzentriert sich darauf, die prognostische Aussagekraft der molekularen Marker HPV, Protein p16 und Polypeptid A2 der high mobility group (HMGA2) mit der der TNM-Klassifizierung zu vergleichen.

1.2 Humanes Papillomavirus (HPV)

Das humane Papilloma Virus ist ein unbehülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, das die Basalzellen des Epithels infiziert. Inzwischen sind mehr als 100 HPV-Typen identifiziert. Häufig bleibt die Infektion symptomlos oder sie induziert primär benigne Tumoren (Warzen, Papillome, Kondylome). Einige Virus-Typen können in den Zellen jahrelang persistieren und zu einer malignen Transformation dieser Tumore führen. Hierzu gehören insbesondere die HPV-Typen 16 und 18, die als high-risk Typen bezeichnet werden (Doerr 2010). Wenn Mundhöhlenkarzinome mit HPV infiziert sind, handelt es sich meistens um diese high-risk Typen (Termine et al. 2008).

HPV hat onkogenes Potential aufgrund seiner Fähigkeit bestimmte Gene (E6 und E7) in das Genom der Wirtszelle einzubauen (Duensing, Munger 2002). Bei Schäden der DNA wird in einer gesunden Zelle das Tumorsuppressorprotein p53 aktiv und stimuliert die Expression von bestimmten Genen (p21CIP1, GADD45), die einen Zellzyklusstopp induzieren und damit die Reparatur von der schadhafte DNA ermöglichen. Ist dieses nicht mehr möglich, leitet das ebenfalls von p53 stimulierte Gen Bak die Apoptose ein. Das Onkoprotein E6 ist in der Lage an p53 zu binden und es zu deaktivieren, sodass Reparatur- und Apoptosemechanismen nicht mehr funktionieren (Abbildung 1).

Als andere wichtige Schaltstelle im Zellzyklus wird pRb durch das Onkoprotein E7 beeinflusst. Durch Bindung des viralen Proteins E7 an pRb wird der Transkriptionsfaktor E2F vermehrt freigesetzt, der wiederum viele Gene für die DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus aktiviert. Neben der direkten Beeinflussung von pRb sorgt das E7-Protein auch dafür, dass pRb häufiger in seinen phosphorylierten Zustand, in dem es E2F nicht mehr binden kann, gebracht wird. Dieses geschieht durch die Inaktivierung der Proteine p21 und p27, die dann die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 2,4 und 6 nicht mehr hemmen, welche für die Phosphorylierung von pRb zuständig sind (Abbildung 1). Durch diese Mechanismen wird die S-Phase des Zellzyklus auch außerplanmäßig eingeleitet (Doerr 2010). So kann es zu einer Anhäufung von genomischen Veränderungen kommen.

Die prognostische Aussagekraft scheint allerdings von der Lokalisation des Tumors abhängig zu sein. HPV-positive Rachenkarzinome zeigen eine statistisch signifikant bessere Überlebensrate und eine geringere Rezidivrate als HPV-negative Karzinome (Ragin, Taioli 2007). Hingegen besteht bei Mundhöhlenkarzinomen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebensrate (Ragin, Taioli 2007), (Grobe et al. 2013), (Reuschenbach et al. 2013). Ob HPV in Mundhöhlenkarzinomen die Rezidivfreiheit beeinflusst ist noch nicht abschließend geklärt (Reimers et al. 2007), (Reuschenbach et al. 2013), (Zafereo et al. 2016).

1.3 Protein p16

Das Protein p16 ist ein Tumorsuppressor. Es kontrolliert den Zellzyklus indem es an die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 bindet und diese inaktiviert. Normalerweise phosphoryliert der CDK-Komplex das Protein pRb. Das führt dazu, dass pRb sich aus seinem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F löst und dieser wiederum jetzt dazu fähig ist, Proteine zu transkribieren, die für ein Fortschreiten im Zellzyklus von der G1- zur S-Phase nötig sind (Schafer 1998). E2F aktiviert auch die Transkription von p16 und bildet so eine negative Rückkopplung (Li et al. 1994) (Abbildung 1).

Verlust oder Mutation des p16INK4A-Gens, welches auf Chromosom 9p21 liegt, wird in vielen Tumorzelllinien beschrieben (Rocco, Sidransky 2001). Vergleicht man molekulare Nachweismethoden mit immunhistochemischen Färbemethoden, so zeigt sich, dass alle Proben mit Verlust des p16INK4A-Gens negativ in der Immunhistochemie für p16 ausfallen, während Proben mit intaktem Gen sowohl positiv als auch negativ bei immunhistochemischer Färbung sein können (Licitra et al. 2008). Während nicht erkrankte Mundschleimhaut gar keine oder nur sehr leichte Anfärbbarkeit von p16 aufweist (Pande et al. 1998), (Montebugnoli et al. 2010), kann man p16 in 13-100% der Fälle von Mundhöhlenkrebs anfärben (Pérez-Sayáns et al. 2011). Es wird angenommen, dass die gute Anfärbbarkeit in PEC Ausdruck einer Überexpression von p16 ist, die auch durch HPV-Infektion hervorgerufen sein könnte, da HPV zu einer vermehrten Freisetzung von E2F führt, welches auch die Transkription von p16 aktiviert (Bradley et al. 2006). Dennoch kann kein direkter Zusammenhang zwischen p16-

Anfärbbarkeit und HPV-Infektion gefunden werden (Pérez-Sayáns et al. 2011), (Reuschenbach et al. 2013).

Verschiedene Studien zeigen, dass Patienten mit p16-positivem Mundhöhlenkarzinom eine geringere Rezidivrate und eine bessere Gesamtüberlebensrate haben (Grobe et al. 2013), (Jayasurya et al. 2005), (Shah et al. 2009), (Smith et al. 2008). Bei p16-positiven Karzinomen erleiden ca. 16% der Patienten einen Rückfall, während es bei p16-negativen Patienten ca. 50% sind. Für das Gesamtüberleben werden ähnliche Zahlen angegeben. So sind nach 5 Jahren in der p16-positiven Gruppe noch ca. 73% der Patienten am Leben, in der p16-negativen Gruppe hingegen nur noch ca. 50% (Reimers et al. 2007).

1.4 High mobility group A2 (HMGA2)

HMGA2 (bis 2001 als HMGI-C bezeichnet Bustin 2001) ist ein chromosomales Polypeptid bestehend aus 108 Aminosäuren, das nicht zur Gruppe der Histone gehört (Goodwin et al. 1973). Lokalisiert ist das Gen für HMGA2 auf Chromosom 12q13-15. Es umfasst 142 Kilobasenpaare (kb) und umspannt fünf Exons (Cleynen, Van De Ven 2008). Das 320 Aminosäuren lange HMGA2-Protein hat drei stark positiv geladene Bereiche (sogenannte Adenin-Thymin(AT)-Haken) mit denen es AT-reiche DNA in der kleinen Furche von in B-Form vorliegender DNA binden kann, (Sgarra et al. 2004) und eine saure Cytosin(C)-reiche terminale Region, mit der eine Interaktion zu anderen Proteinen möglich ist (Reeves, Beckerbauer 2001). Das Polypeptid ist per se kein Transkriptionsfaktor, sondern verändert die Chromatinstruktur und hilft die einzelnen Transkriptionsfaktoren zu hoch organisierten Nukleoproteinkomplexen zusammenzufügen (Wolffe 1994) (Abbildung 2).

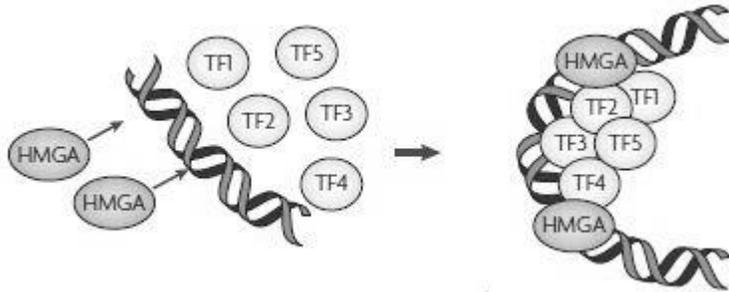


Abbildung 2: Bindung von high mobility group Polypeptid A (HMGA) an die kleine Furche der DNA und anschließende Veränderung der Chromatinstruktur und Organisation von Transkriptionsfaktoren (TF1-5). Aus Fusco A., Fedele M., Roles of HMGA proteins in cancer, 2007

Die beeinflussten Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die Proliferation und Differenzierung von Zellen während der Embryogenese (Zhou et al. 1995), (Zhou et al. 1996), (Fusco, Fedele 2007). Daher ist HMGA2 während der Embryogenese in großen Mengen nachweisbar, in adultem Gewebe ist es hingegen nur noch in sehr geringen Mengen nachzuweisen (Zhou et al. 1996), (Rogalla et al. 1996), (Meyer 2010). Studien an Mäusen haben gezeigt, dass HMGA2-Knockout Mäuse zwar überlebensfähig sind, allerdings eine um 60% geringere Körpergröße erreichen. Besonders mesenchymale Gewebe sind bei Mäusen von der Wachstumsreduktion betroffen, während das Gehirn eine normale Entwicklung durchläuft (Zhou et al. 1995). Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus der Studie von Hirning-Folz et al., die eine hohe Expression von HMGA2 in der Fetalentwicklung beim Menschen besonders in mesenchymalen Geweben nachweisen konnten, während HMGA2 bei der Entwicklung parenchymaler Gewebe wie Gehirn und Leber keine Rolle spielt (Hirning-Folz et al. 1998). Welchen Einfluss eine vermehrte Expression von HMGA2 auf den menschlichen Organismus hat, wird in dem Bericht über einen 8-jährigen Jungen mit perizentrischer Inversion auf Chromosom 12 (Bruchpunkte: p11.22 und q14.3), bei der auch das HMGA2-Gen betroffen ist, deutlich. Die Untersucher fanden nur eine leichte Erhöhung des HMGA2-Spiegels in den Gewebeproben des Jungen, dennoch sind die Auswirkungen auf das Wachstum des Jungen immens. Neben dem Riesenwuchs bewirkt diese chromosomale Veränderung auch die Bildung multipler subkutaner Lipome (Ligon et al. 2005).

Im Vergleich zu ausdifferenziertem adulten Gewebe ist für die meisten gutartigen sowie bösartigen Tumore inzwischen eine Überexpression von HMGA2 nachgewiesen worden. Zu diesen zählen zum Beispiel Schilddrüsenadenome und -karzinome (Belge et al. 2008), Leiomyome des Uterus (Klemke et al. 2009), nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Meyer et al. 2007), Mammakarzinome (Rogalla et al. 1997), Ovarialkarzinome (Califano et al. 2014), Melanome (Raskin et al. 2013), Magenkarzinome (Motoyama et al. 2008) Pankreaskarzinome (Abe et al. 2003), Gallengangkarzinome (Lee et al. 2014) kolorektale Karzinome (Wang et al. 2011), Prostatakarzinome (Müller et al. 2013), Zungenkarzinome (Zhao et al. 2016) und Mundhöhlenkarzinome (Sterenczak et al. 2014), (Miyazawa et al. 2004). Bei diesen Studien wird gezeigt, dass HMGA2 Expression mit hoch malignen Phänotypen der Tumoren assoziiert ist. Dies zeigt sich unter anderem daran, dass Überexpression von HMGA2 meist mit dem Vorhandensein von Metastasen und schlechteren Überlebensraten korreliert. Es wird angenommen, dass HMGA2 besonders in der invasiven Front von Karzinomen gebildet wird und dort einen entscheidenden Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition hat, die es dem Karzinom ermöglicht unabhängig vom epithelialen Zellverband zu wachsen und Metastasen zu bilden (Thiery 2002), (Miyazawa et al. 2004), (Morishita et al. 2013), (Shi et al. 2016).

Vielversprechende Resultate für die prognostische Einsetzbarkeit von HMGA2 bei Mundhöhlenkarzinomen zeigen Miyazawa et al. in einer Studie mit 42 Patienten. Bei 23 dieser Patienten wird als Todesursache ein Rezidiv festgestellt und bei allen diesen 23 Patienten kann eine Überexpression von HMGA2 festgestellt werden. Andererseits bleiben auch alle elf Patienten, bei denen kein HMGA2 nachweisbar ist, rezidivfrei. Miyazawa et al. können außerdem einen Zusammenhang zwischen HMGA2-Überexpression und Lymphknotenmetastasen herstellen ($p = 0,0097$) (Miyazawa et al. 2004).

In einer Studie von Summer et al. wird gezeigt, dass erhöhte HMGA2-Expression in Krebszellen eine protektive Wirkung vor gewissen DNA-schädigenden chemotherapeutischen Mitteln bietet. Es wird vorgeschlagen vor Therapiebeginn eine Bestimmung des HMGA2-Levels durchzuführen, um die Chemotherapeutika auf den Krebs abstimmen zu können (Summer et al. 2009).

1.5 TNM-Klassifikation und Tumordifferenzierung

Tumoren werden nach der anatomischen Ausdehnung in ein von der Union internationale contre le cancer (UICC) festgelegtes Bewertungssystem eingeordnet (Staging). Ausschlaggebende Kriterien für die Einteilung sind die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Tabelle 1) (Sobin et al. 2009).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Mundhöhlenkarzinome der UICC (7. Auflage, 2009)

Ausdehnung des Primärtumors (T)	
T0	Keine Evidenz für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorausdehnung ≤ 2 cm
T2	Tumorausdehnung 2-4 cm
T3	Tumorausdehnung > 4 cm
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen
Regionale Lymphknotenmetastasen (N)	
N0	Keine Evidenz für Lymphknotenmetastasen
N1	Lymphknotenmetastase(n) in einem Lymphknoten < 3 cm
N2	Metastase(n) in einem ipsilateralen Lymphknoten oder multiple ipsi- oder bilaterale Lymphknoten 3-6 cm
N3	Lymphknotenmetastase(n) > 6 cm
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar

Diese Kriterien finden sowohl bei der präoperativen klinischen Diagnostik Anwendung als auch bei der postoperativen pathologischen Bewertung des Tumorsektates. Die postoperative Bewertung ist hierbei naturgemäß genauer als die präoperative.

Die Überlebensraten sind insbesondere bei Lymphknotenmetastasierung und infiltrativem Wachstum in angrenzende Strukturen wie Knochen und Nervenbahnen stark herabgesetzt (Institut für Krebs epidemiologie e.V. 2014), (Kademani et al. 2005), (Kovács et al. 2007), (Pulte, Brenner 2010), (Vázquez-Mahía et al. 2012). Wenn der Krebs in einem frühen Stadium, in dem er noch nicht metastasiert hat und eine Ausdehnung von 4 cm nicht überschritten hat (Stadium I und II UICC), diagnostiziert wird, liegen die 5-Jahresüberlebensraten bei 68-84%. Sie sinken aber ab, sobald ein einzelner Lymphknoten (UICC Stadium III) involviert ist (61% Überlebensrate). Besonders schlecht sind die Überlebensraten, wenn mehrere Lymphknotenmetastasen, Infiltration von Nachbarorganen oder sogar Fernmetastasen (UICC Stadium IV) entdeckt werden (31-40% Überlebensrate). Leider wird mehr als die Hälfte der Fälle erst in diesem späten, prognostisch ungünstigen Stadium diagnostiziert (Institut für Krebs epidemiologie e.V. 2014).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Resultate der Studie von Miyazawa et al. an Hand einer größeren Studie mittels anderer Nachweismethoden zu überprüfen. Des Weiteren soll die Vorhersagekraft von HMGA2, p16, HPV und TNM für Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In die Studie sind 91 Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle eingeschlossen, die nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10) in die Kategorien C02 - C06 eingeordnet werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Lokalisation der Mundhöhlenkarzinome nach ICD-10

	Häufigkeit	Prozent
C02: Zunge (außer Zungengrund)	14	15,4
C03: Zahnfleisch	6	6,6
C04: Mundboden	47	51,6
C05: Gaumen	7	7,7
C06: sonstige	17	18,7

Bei allen Patienten ist zwischen 2000 und 2004 die komplette Resektion (R0) der malignen Neubildung in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel erfolgt. Die Gewebeproben sind in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Wenn präoperative Radio- und Chemotherapie durchgeführt worden sind, wird vorhandenes Biopsiematerial für die Untersuchungen herangezogen, ansonsten werden die Gewebeblöcke mit dem größten Inhalt an Karzinom aus den Operationspräparaten ausgewählt. Histologische Daten zum Staging der Karzinome werden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel übernommen. Die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel stimmt dem vorgelegten Studienprotokoll zu (D 418/08).

Alle Patienten werden nach der Operation in regelmäßigen Abständen in der Tumorsprechstunde der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie weiterbetreut. Der Nachbeobachtungszeitraum geht bis einschließlich November 2011. Im Durchschnitt beträgt die Nachbeobachtungszeit 59 Monate mit einer Varianz zwischen 1 und 131 Monaten.

Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 59 Jahre. Der jüngste Patient ist zum Diagnosezeitpunkt 36 und der älteste 81 Jahre alt. Es sind 59 männliche und 32 weibliche Patienten in die Studie eingeschlossen.

2.2 Methoden

2.2.1 HPV-Detektion

Für den HPV-Nachweis wird aus allen Paraffin-eingebetteten Proben die DNA isoliert. Dieses erfolgt unter Verwendung des Roche MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II nach den Herstellerangaben.

Je Gewebeprobe werden drei 5 µm starke Schnitte (bei Biopsiematerial zehn x 5 µm) mit Xylol entparaffiniert und mit Ethanol gewaschen. Das Gewebe wird anschließend bei 55°C für 10 Minuten getrocknet, bevor 80 µl Gewebe Lyse Puffer und 20 µl Proteinase K aus dem Isolations Kit hinzugefügt werden, um das Gewebe aufzulösen und die Proteine in den Proben abzubauen. Es folgt eine Inkubation über Nacht bei 55°C.

100 µl der Lösung werden in den Roche MagNA Pure LC überführt, in dem die DNA-Isolierung vollautomatisch abläuft.

Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Bindung der DNA an die Oberfläche von magnetischen Glasperlen. Alle nicht gebundenen Substanzen werden durch eine Reihe von Wasch-Puffern entfernt. Die Glasperlen mit der gebundenen DNA werden magnetisch aus der Wasch-Puffer-Lösung entnommen. Am Ende wird die DNA wieder von den magnetischen Glasperlen gelöst und diese werden aus der Endlösung entfernt. Nach dieser Prozedur stehen 200 µl Lösung mit reiner DNA zur Verfügung.

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgt mit dem NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific) beim Extinktionsmaximum für Nukleinsäuren auf 260 nm Wellenlänge. Bei diesem Schritt werden die Proben auch auf Verunreinigung durch Proteine, Phenole etc. durch Verhältnisbildung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge geprüft. Für reine DNA wird ein Verhältnis von ungefähr 1,8 akzeptiert.

Zur Bestätigung der Integrität der DNA wird das „Housekeeping“ Gen β -Aktin durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Pro Reaktion werden 200 ng der Proben-DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen in den Reagenzröhrchen beträgt 50 µl. Hiervon entfallen 13,4 µl auf den Mastermix (Tabelle 3), die übrigen 36,6 µl auf das

jeweils 200 ng entsprechende Volumen der DNA-Lösung und die ergänzte Menge destilliertes Wasser.

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für β -Aktin und HPV-Nachweis mit einem Gesamtvolumen von 13,4 μ l

Komponenten	Hersteller	Menge in μl
Forward Primer (für β -Aktin bzw. HPV)	DNA Technology A/S	2 μ l
Backward Primer (für β -Aktin bzw. HPV)	DNA Technology A/S	2 μ l
PCR-reaction buffer without MgCl ₂	Roche	5 μ l
MgCl ₂	Roche	2 μ l
PCR Nucleotide Mix Plus (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	Roche	1 μ l
Uracil-DNA glycosylase, heat labile	Roche	1 μ l
FastStart Taq DNA polymerase	Roche	0,4 μ l

Mastermix, DNA-Lösung und destilliertes Wasser werden auf Eis zusammenpipettiert, dann erfolgt die Amplifikation in einem Veriti®-Thermocycler von Applied Biosystems (Tabelle 4). Die vervielfältigte DNA kann mehrere Stunden auf 4°C aufbewahrt werden oder für längere Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden.

Tabelle 4: PCR-Protokoll für β -Aktin-Amplifikation

Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur	Ziel
1	2 min	20°C	Verunreinigungen durch vorherige PCR-Produkte werden durch Uracil-DNA Glycosylase beseitigt
1	4 min	95°C	Deaktivierung der Uracil-DNA Glycosylase; Denaturierung der Doppelstrang-DNA; Aktivierung der Taq DNA Polymerase
30	45 s	95°C	Denaturierung der Doppelstrang-DNA
	1 min	57°C	Anlagerung der Primer
	2 min	72°C	DNA-Synthese mit Hilfe der Taq DNA Polymerase
1	5 min	72°C	Finale DNA-Synthese
1	∞	4°C	Kühlen/Aufbewahrung

Um das Syntheseprodukt sichtbar zu machen, werden alle Proben nach der Färbung mit Ethidium-Bromid durch Elektrophorese durch ein 1,5%iges Agarose-Gel bewegt und unter UV-Licht ausgewertet. Eine positive und eine negative Kontrolle werden pro Durchgang mitgeführt. Das erwartete amplifizierte β -Aktin-Fragment ist 309 Basenpaare (bp) groß und wird mit Hilfe des DNA Molekulargewicht-Markers Φ X174 DNA/Hinf1 der Firma Fermentas (seit 2010 Teil von Thermo Fisher Scientific) in 85 Proben identifiziert. Diese Proben eignen sich damit für die weitere Untersuchung auf HPV DNA.

HPV-DNA wird in den Proben durch PCR mit Short PCR Fragment (SPF)-Primern vervielfältigt (Tabelle 3, Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR-Protokoll für HPV-Amplifikation

Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur	Ziel
1	2 min	20°C	Verunreinigungen durch vorherige PCR-Produkte werden durch Uracil-DNA Glycosylase beseitigt
1	4 min	95°C	Deaktivierung der Uracil-DNA Glycosylase; Denaturierung der Doppelstrang-DNA; Aktivierung der Taq DNA Polymerase
30	45 s 1 min 2 min	95°C 47°C 72°C	Denaturierung der Doppelstrang-DNA Anlagerung der Primer DNA-Synthese mit Hilfe der Taq DNA Polymerase
1	5 min	72°C	Finale DNA-Synthese
1	∞	4°C	Kühlen/Aufbewahrung

Mit SPF-Primern kann ein 65 bp langes Fragment amplifiziert werden. Das System bietet eine sehr hohe Sensitivität und ermöglicht es mindestens 43 verschiedene HPV-Genotypen nachzuweisen (Kleter et al. 1998). Positive Proben werden auf einem 2%igen Agarose Gel mit Ethidium Bromid Färbung mit Hilfe des DNA Molekulargewicht-Markers Φ X174 DNA/Hinf1 im UV-Licht identifiziert. Bei jedem Elektrophoresevorgang werden eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt.

2.2.2 p16-Färbung

P16 wird durch immunhistochemische Färbung an 4 μ m dicken Schnitten nachgewiesen. Hierzu wird das CINtec® Histology Kit (Ventana) zusammen mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ventana) in einem Ventana Benchmark XT Färbeautomaten verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Nach der Entparaffinierung im Instrument, findet eine Antigendemaskierung mit der Cell Conditioning 1-Lösung (Ventana) statt. Hierauf folgt eine Inkubation der Schnitte mit dem monoklonalen Maus Antikörper aus dem CINtec® Kit, der gegen das humane p16INK4A-Protein gerichtet ist. Die erfolgten Reaktionen mit dem p16INK4A-Protein

werden mit Hilfe des enzymgekoppelten Antikörper-Chromogen-Systems, *ultraView* Universal DAB Detection Kit, dargestellt. Hierbei bindet der enzymgekoppelte Sekundärantikörper an den Anti-p16-Mausantikörper. Ein Wasserstoffperoxidsubstrat kann durch dieses Enzym mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) bei Anwesenheit von Kupfer zu einem braunen Präzipitat reagieren. An Stellen, an denen das p16INK4A-Protein vorkommt, entsteht so ein braunes Reaktionsprodukt (Abbildung 3). Im Anschluss erfolgt eine Haematoxylin-Gegenfärbung der Zellkerne.

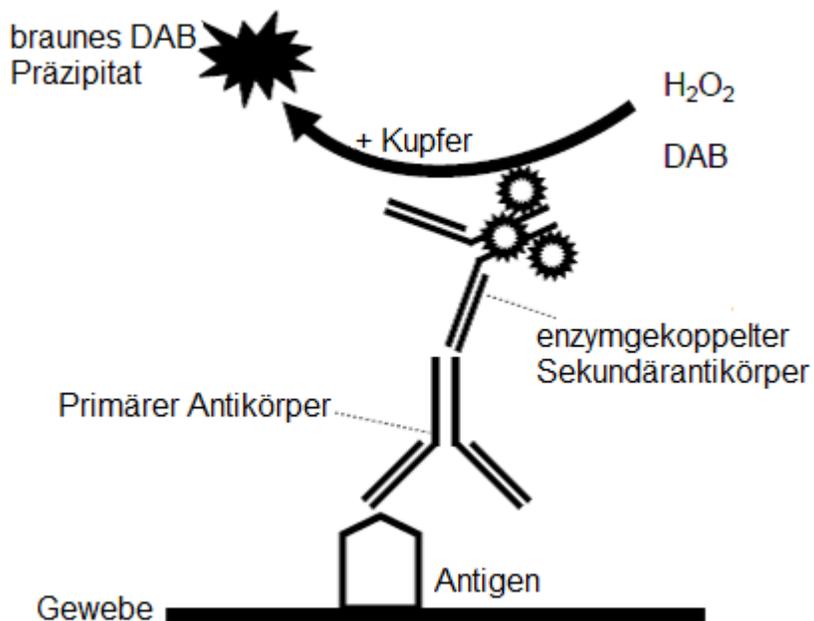


Abbildung 3: schematische Darstellung der Nachweisreaktion von p16 mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ventana). Aus der Gebrauchsanleitung für *ultraView* universal DAB Detection Kit, 2011, Ventana Medical Systems, Inc.

Die Ergebnisse werden unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Färbung des Zellkerns und/oder des Zytoplasmas wird als positive Reaktion gewertet.

2.2.3 HMGA2-Analyse

Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte werden auf ihren Anteil von normalem zu neoplastischem Gewebe bewertet. Wenn die Proben zusätzlich zum Tumorgewebe

noch gesundes Schleimhautgewebe enthalten, werden die Karzinomzellen mittels Lasermikrodissektion mit einer Olympus LMS Workstation aus HE gefärbten Schnitten isoliert. Pro Probe werden drei 5 µm dicke Schnitte der FFPE-Blöcke für die Analyse angefertigt.

Die Isolation der RNA erfolgt nach Protokoll des Roche MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III. Das nicht mikrodissektierte Tumorgewebe wird durch Entparaffinierung mit Xylol und Auswaschung mit Ethanol für die RNA-Isolation vorbereitet. Nach Trocknung des Gewebes für 10 min bei 55°C werden 100 µl Paraffin Homogenisierungs-Puffer, 16 µl Natriumdodecylsulfat und 40 µl Paraffin Homogenisierungs-Enzym aus dem RNA Isolations Kit hinzugefügt.

Die Lösung wird für sechs Stunden bei 55°C inkubiert. Nachdem Gewebereste durch zentrifugieren am Reaktionsgefäßboden gesammelt wurden, werden 130 µl des Lysates in den Roche MagNA Pure LC überführt und mit 220 µl Gewebelyse-Puffer versetzt. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation laufen vollautomatisch im Roche MagNA Pure LC ab.

Im Isolationsautomaten werden magnetische Glasperlen hinzugefügt, an die die RNA binden kann. DNA wird durch Zugabe von DNase zersetzt. Die Glasperlen mit der gebundenen RNA werden mit einer Reihe verschiedener Puffer von Verunreinigungen wie z.B. Proteinen, Zellmembranen etc. rein gewaschen. Schließlich wird die RNA wieder von den magnetischen Glasperlen gelöst. Nach dieser Isolation stehen 100 µl RNA-Lösung für die weiteren Schritte bereit.

Mit dem NanoDrop (Thermo Scientific) wird die Konzentration der isolierten RNA durch Spektralphotometrie bestimmt. Bei reiner RNA soll das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bei ungefähr 2,0 liegen.

Bei der Integritätskontrolle der RNA des „Housekeeping“ Gens 18S mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) wird eine starke Schädigung der RNA in den Proben im Vergleich zu Kontroll-FFPE-Material festgestellt.

Die RNA wird mit dem Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben. Hierzu werden auf Eis jeweils 11 µl der RNA-Lösung mit 2 µl des Random Hexamer Primers des Kits vermischt. Um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren, wird das RNA-Primer-Gemisch bei 65°C für 10 Minuten erwärmt und dann

sofort auf Eis heruntergekühlt. Danach wird der Mastermix (Tabelle 6) für die reverse Transkription hinzugefügt und die Reaktionsröhrchen mit 20 µl Inhalt im Thermocycler 10 Minuten bei 25°C gefolgt von 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 85°C deaktiviert. Die umgeschriebene cDNA kann dann mehrere Stunden bei 4°C aufbewahrt werden oder für längere Zeit bei -20°C tiefgefroren werden.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes für die Reverse Transkription der RNA; alle Komponenten sind Bestandteil des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits (Roche)

Komponenten	Menge in µl
Reaktions-Puffer	4,0 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Desoxynucleotid Mix	2,0 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl

Die Real-Time quantitative PCR (RT-PCR) wird mit dem Applied Biosystems 7900HT FAST Real-Time PCR System durchgeführt. Der Gehalt an HMGA2 wird in Relation zur 18S-RNA als endogene Kontrolle bestimmt. Die richtlinienkonforme Verwendbarkeit (Applied Biosystems 2008) von 18S-RNA als endogene Kontrolle für den Gehalt an HMGA2-RNA wurde bereits an anderer Stelle bestätigt (Meyer 2010). Pro Probe werden jeweils 3 Reaktionsansätze für HMGA2 und 18S im RT-PCR-Cycler analysiert. Der RNA-Gehalt der Proben beträgt 25 ng bei HMGA2 und 2,5 ng bei 18S. Spezielle TaqMan®-Primer für HMGA2 und 18S werden von Applied Biosystems bestellt (HMGA2: Nr. Hs00171569_m1; 18S: Nr. Hs03003631_g1). Das Reaktionsgemisch besteht pro Ansatz aus 10 µl FastStart TaqMan® Probe Master (Roche), 1 µl des TaqMan® Primers für HMGA2 bzw. 18 S und 9 µl cDNA-Lösung mit entsprechendem DNA-Gehalt. Die Bedingungen für die RT-PCR werden auf folgende Parameter festgelegt: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen à 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute.

Die relative Mengenbestimmung von HMGA2 (RQ-HMGA2) in Bezug auf 18S wird mit dem Applied Biosystems RQ-Manager 1.2 mit der komparativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet: Der Zyklus, ab dem im Real-Time-Cycler eine sich verstärkende Fluoreszenz aufgezeichnet wird (Ct), wird sowohl für das untersuchte Gen HMGA2 als auch für das endogene Kontrolle 18S bestimmt. Je mehr RNA des gesuchten Gens in der Probe enthalten ist, desto früher ist eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenz nachweisbar. Zur Vergleichbarkeit der Proben untereinander wird die Menge der nachzuweisenden HMGA2-RNA als normierte Größe zu der Menge der 18S-Kontroll-RNA angegeben (ΔCt). Diese normierte Mengenangabe wird anschließend kalibriert, indem sie mit der normierten Menge von HMGA2 in unveränderter Mundschleimhaut verglichen wird.

2.2.4 Statistische Methoden

Die durch die Untersuchungen erlangten Daten werden auf ihre Auswirkung auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben untersucht. Das rezidivfreie Intervall wird definiert als der Zeitraum zwischen R0-Resektion des Tumors und letztem Nachuntersuchungsdatum, wenn der Patient rezidiv-frei ist, oder dem Datum der Diagnose des ersten Rezidivs. Dabei wird nicht zwischen lokalen Rezidiven, Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen unterschieden. Die Gesamtüberlebenszeit wird festgelegt als Zeit zwischen Operation und letztem Nachuntersuchungsdatum bzw. dem Todesdatum.

Die Ausgangsvariablen sind Geschlecht, Alter, Raucher/Nichtraucher, Alkoholkonsum, T-Status (T1-T4), N-Status (N0-N2) HPV (positiv/negativ), p16 (positiv/negativ) und RQ-HMGA2 (auf logarithmischer Skala). Zuerst wird eine univariate Analyse mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode und des Log-Rang-Tests durchgeführt. Um ein statistisches Model zu erhalten, dass auch die fehlenden Daten besser berücksichtigt, wird danach bei der Cox Regressionsanalyse das Verfahren der multiplen Imputation (Rubin 1987) angewendet. Die insignifikanten Variablen werden nacheinander aus der Analyse entfernt, bis alle verbleibenden signifikant oder grenzwertig signifikant sind. Als

signifikant wird ein p -Wert kleiner gleich 0,05 gewertet. Alle statistischen Auswertungen werden mit der Software R Version 3.2.5 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Auch in unserer Studienpopulation zeichnet sich entsprechend dem bundesweiten Trend ab, dass deutlich mehr Männer (64,8%) als Frauen (35,2%) an Mundhöhlenkrebs erkrankt sind.

Des Weiteren geben auch in dieser Studiengruppe die meisten Patienten an, den Hauptrisikogruppen der Raucher (84,3%) und regelmäßigen Alkoholkonsumenten (52,8%) anzugehören. Bei dem Großteil (74,8%) der Patienten wird der Tumor mit einer geringen Ausdehnung (T1 und T2) und bei gut der Hälfte ohne Lymphknotenmetastasen (54,9%) entdeckt. Keiner der Patienten hat zum Diagnosezeitpunkt feststellbare Fernmetastasen (Tabelle 7). Die häufigste Lokalisation für orale Karzinome ist der Mundboden (51,6%) (Tabelle 2).

Tabelle 7: klinische und pathologische Parameter der Studienpopulation

	Häufigkeit	%
<i>Pathologisches T-Stadium</i>		
1	41	45,1
2	27	29,7
3	7	7,7
4	16	17,6
<i>Pathologischer Nodalstatus</i>		
N0	50	54,9
N1	18	19,8
N2	23	25,3
<i>Fernmetastasen</i>		
M0	88	96,7
M1	0	0
Mx	3	3,3
<i>Raucher (keine Angabe, n = 2)</i>		
nein	14	15,7
ja	75	84,3
<i>Alkohol (keine Angabe, n = 2)</i>		
nein	42	47,2
ja	47	52,8

HPV-DNA wird in 7 (8,2%) von 85 Plattenepithelkarzinomen gefunden (Tabelle 8 und im Anhang Abbildung 5 - Abbildung 13). 6 Proben beinhalten keine adäquate DNA für den HPV-Test, da die Integrität der DNA nicht mittels β -Aktin PCR nachgewiesen werden kann.

Die immunhistochemische Färbung für p16 zeigt eine positive Reaktion in 14 (15,4%) von 91 Proben (Tabelle 8). Mesenchymale und nicht-dysplastische Zellen weisen keine Immunreaktion auf (Abbildung 4).

Tabelle 8: Vorkommen von HPV und p16 in Mundhöhlenkarzinomen

	Häufigkeit	%
<i>HPV^a</i>		
positiv	7	8,2
negativ	78	91,8
<i>p16</i>		
positiv	14	15,4
negativ	77	84,6

^a Die Daten für 6 Proben sind nicht verfügbar, da keine ausreichende Integrität der DNA gegeben war.

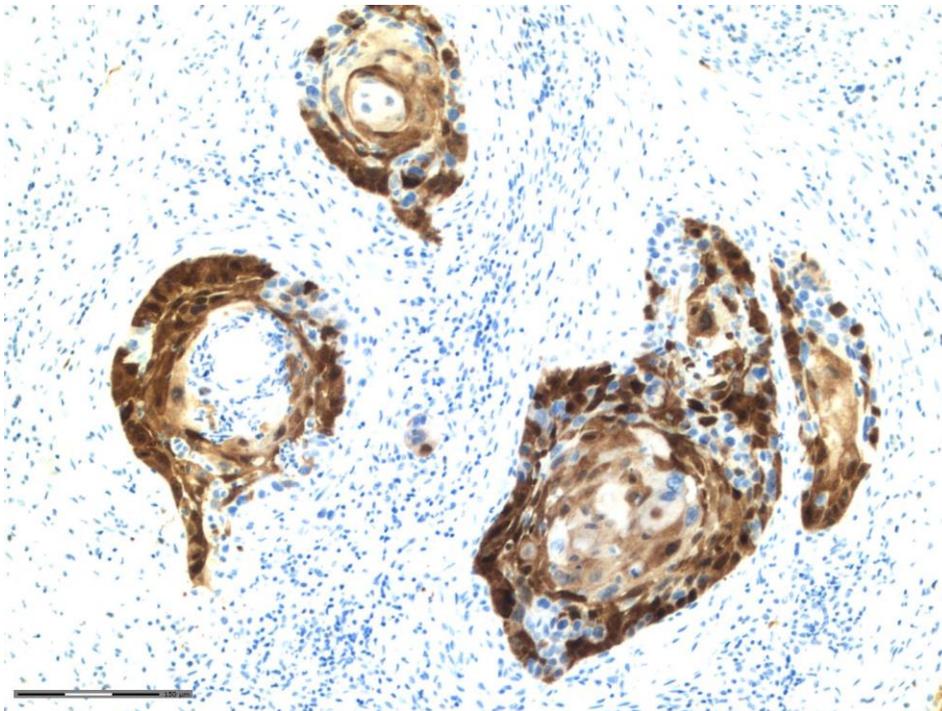


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von p16 bei einem Mundhöhlenkarzinom.

Der zweiseitige exakte Fisher Test wird durchgeführt um eine Abhängigkeit von HPV und p16 zu untersuchen. Es ergibt sich ein p -Wert von 1,0 (Signifikanzniveau 0,05) und damit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Markern.

Die Messung für HMGA2 kann nur bei 40 Gewebeproben durchgeführt werden. In den anderen 51 Proben ist die RNA zu stark geschädigt, sodass selbst 18S RNA nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden kann.

In unveränderter Mundschleimhaut ist nur eine geringe Menge HMGA2 nachweisbar. In den Tumorproben wird eine erhöhte Expression von HMGA2 im Vergleich zur normalen Mundschleimhaut festgestellt. Die Mengen variieren zwischen dem 32-fachen und 31.700-fachen Gehalt an HMGA2 relativ zu gesunder Mundschleimhaut (Diagramm 1).

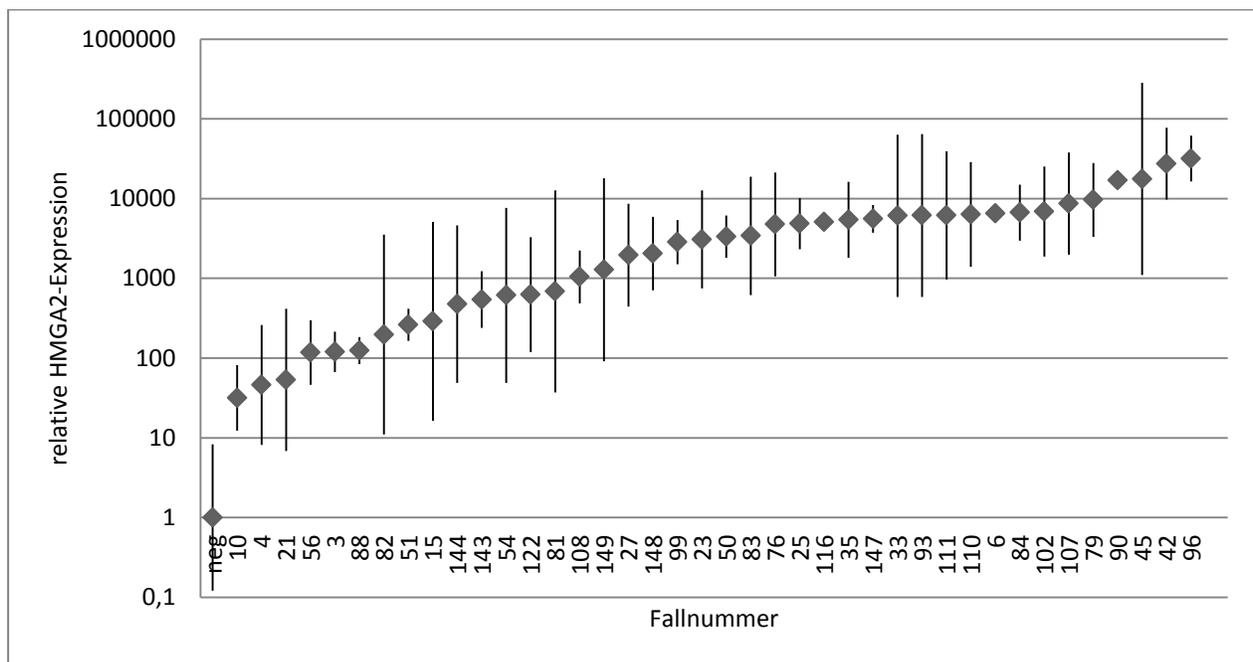


Diagramm 1: Expression des high mobility group Gens A2 (HMGA2) in Karzinomen der Mundhöhle. Karzinomfreie Mundschleimhaut (neg) wurde als Kalibrator festgelegt. Mittelwert aus 3 Proben (Raute) und Spanne von minimal bis maximal Vorkommen von HMGA2 (Linie).

Da die Expression von HMGA2 in unseren Proben sehr weit aufgefächert ist, wird für die weitere Analyse der Daten mit einer logarithmischen Skala gearbeitet.

3.1 Rezidivfreies Überleben

Drei Patienten werden von den Berechnungen für das rezidivfreie Überleben ausgeschlossen, weil ein Nachbeobachtungszeitraum von weniger als einem halben Jahr ($n = 2$) oder frühzeitiger Tod ($n = 1$) vorliegen.

Bei 32 der 88 Patienten (36,4%) wird in der Nachbeobachtungszeit ein Rezidiv in Form eines lokal wiederkehrenden Karzinoms oder einer Lymphknoten- bzw. Fernmetastase festgestellt.

Alter, Geschlecht, Rauchen/Alkoholkonsum, HPV und T-Status zeigen übereinstimmend mit den Kaplan-Meier Kurven (Diagramm 2) keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Risikorateen in der univariaten Analyse (Tabelle 9).

Wahrscheinlichkeit rezidivfreies Überleben

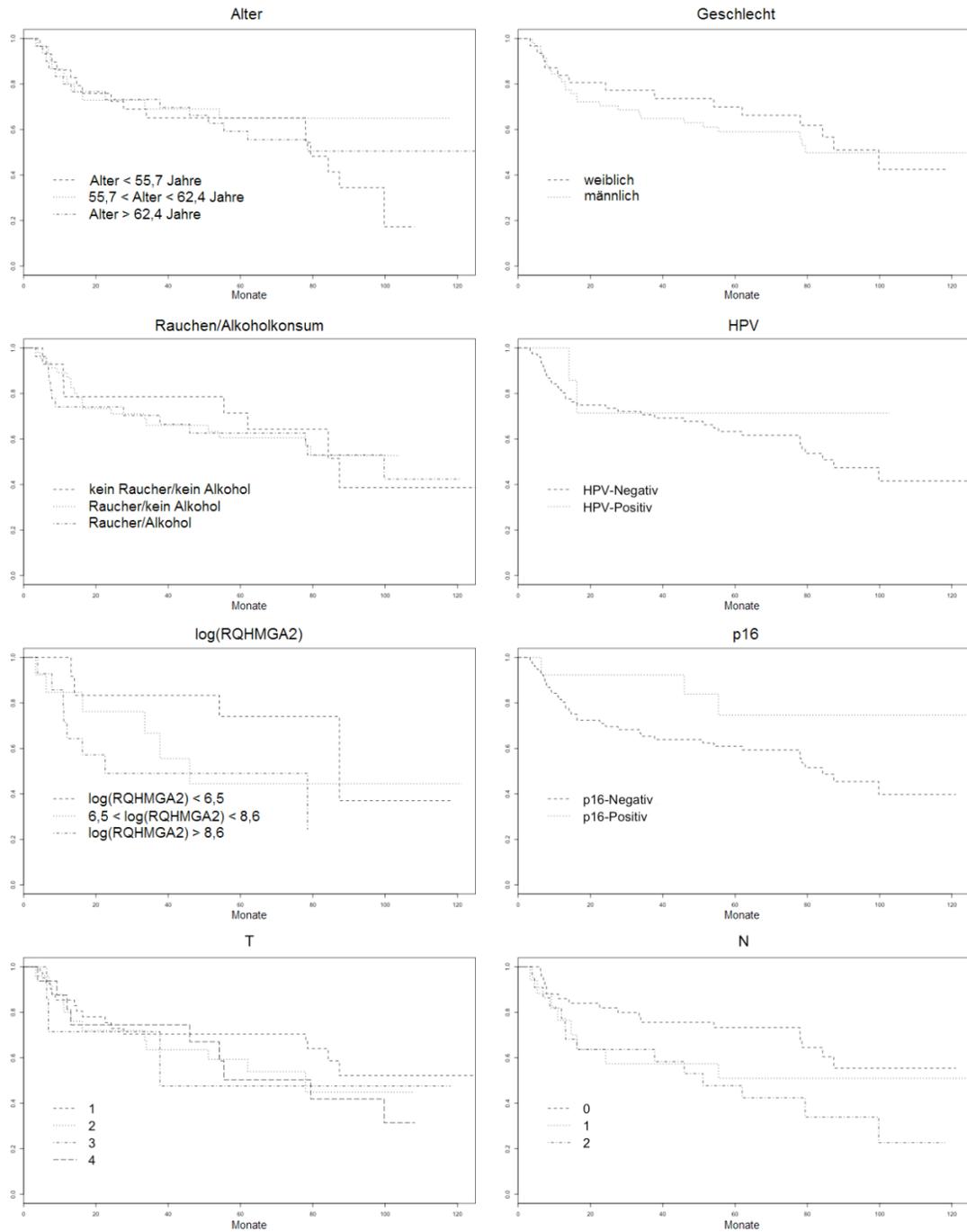


Diagramm 2: Einfluss der verschiedenen Parameter auf das rezidivfreie Überleben. Kurven basieren auf der Kaplan-Meier Methode.

Tabelle 9: Risikorate der potentiellen prognostischen Faktoren für das rezidivfreie Überleben. Berechnet mit Log-Rang-Test.

Parameter	Risikorate	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter			
55.7<Alter<62.4	0,59	0,27 – 1,31	0,194
Alter>62.4	0,85	0,42 – 1,75	0,661
Geschlecht			
männlich	1,16	0,60 – 2,24	0,65
Rauchen/Alkoholkonsum			
Raucher/kein Alkohol	0,96	0,40 – 2,29	0,924
Raucher/Alkohol	1,04	0,41 – 2,60	0,937
T-Status			
T2	1,45	0,68 – 3,09	0,332
T3	1,55	0,45 – 5,34	0,492
T4	1,53	0,67 – 3,47	0,314
N-Status			
N1	1,68	0,73 – 3,87	0,225
N2	2,23	1,11 – 4,50	0,025
HPV			
positiv	0,58	0,14 – 2,42	0,457
p16			
positiv	0,42	0,13 – 1,38	0,154
log(RQHMG2)			
6.5 < log(RQHMG2) <	1,82	0,51 – 6,49	0,357
log(RQHMG2)> 8.6	2,7	0,80 – 9,13	0,110

Nachdem in der Cox Regressions Analyse alle insignifikanten Variablen entfernt wurden, bleiben als signifikante oder grenzwertig signifikante Parameter noch der N-Status, RQ-HMGA2 und p16 übrig. Der Chi-Quadrat-Test wird durchgeführt, um eine Abhängigkeit der Faktoren untereinander auszuschließen. Es zeigt sich, dass der N-Status mit dem p16-Status korreliert ($p < 0,0001$). Daher wird der p16-Status, der nur grenzwertige Signifikanz beim Gesamtüberleben ($p = 0,081$) und keine Signifikanz beim rezidivfreien Überleben ($p = 0,112$) zeigt, auch aus der endgültigen Analyse entfernt. Patienten mit nur einer kleinen bis zu 3 cm großen Lymphknotenmetastase (N1) haben ein 1,8-faches Risiko an einem Rezidiv zu erkranken verglichen mit Patienten ohne

feststellbare Lymphknotenmetastasen (N0). Ein statistisch signifikanter Unterschied für die Rezidivrate zwischen N0 und N1 eingestuft Patienten lässt sich nicht zeigen ($p = 0,198$).

Bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zwischen 3 und 6 cm Durchmesser (N2) erhöht sich das Risiko an einem Rezidiv zu erkranken deutlich (Risikoquotient 2,469 verglichen mit N0). Der Effekt auf die rezidivfreie Überlebenszeit ist signifikant ($p = 0,020$) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Beeinflussung des rezidivfreien Überlebens nach Mundhöhlenkarzinom durch Lymphknotenstatus und Expression von HMGA2 (RQHMGA2)

	Risikoquotient	p-Wert	95% Konfidenzintervall
N-Status			
N1	1,814	0,198	-0,310 – 1,501
N2	2,469	0,020	0,139 – 1,668
logRQHMGA2	1,302	0,057	-0,008 – 0,536

Der Effekt von HMGA2 auf das rezidivfreie Überleben zeigt sich als grenzwertig signifikant ($p = 0,057$) (Tabelle 10). Mit zunehmender Expression von HMGA2 ist eine Abnahme im Anteil der rezidivfreien Patienten feststellbar. Bei Tumoren mit sehr geringer HMGA2-Expression liegt der Anteil an rezidivfreien Patienten nach 5 Jahren bei 74%. Schaut man sich hingegen die Patientengruppe mit der höchsten HMGA2-Expression in den Karzinomen an, liegt der Anteil rezidivfreier Patienten nach 5 Jahren nur bei 48% (Diagramm 2).

Niedrige HMGA2-Expression bietet in jedem N-Stadium eine relativ gute Wahrscheinlichkeit für Rezidivfreiheit (N0: 82%, N1: 74%, N2: 65%), bei hohen HMGA2-Expressionen ist mit geringen Wahrscheinlichkeiten für Rezidivfreiheit zu rechnen (N0: 52%, N1: 38%, N2: 25%) (Diagramm 3).

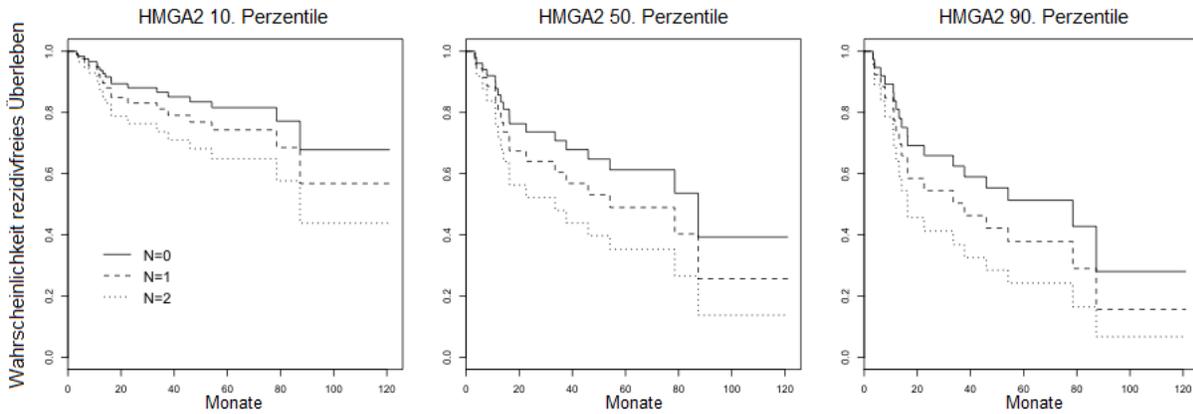


Diagramm 3: Einfluss der Expression von high mobility group Gen A2 (HMGA2) kombiniert mit dem Einfluss des Nodalstatus (N0 – N2) auf das rezidivfreie Überleben.

3.2 Gesamtüberleben

Die 5-Jahres-Überlebensrate der Studienpopulation liegt bei 75%.

Die univariate Datenanalyse zeigt auch hier bei Alter, Geschlecht, Rauchen/Alkoholkonsum, HPV und T-Status übereinstimmend mit den Kaplan-Meier Kurven (Diagramm 4) keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Risikoraten (Tabelle 11).

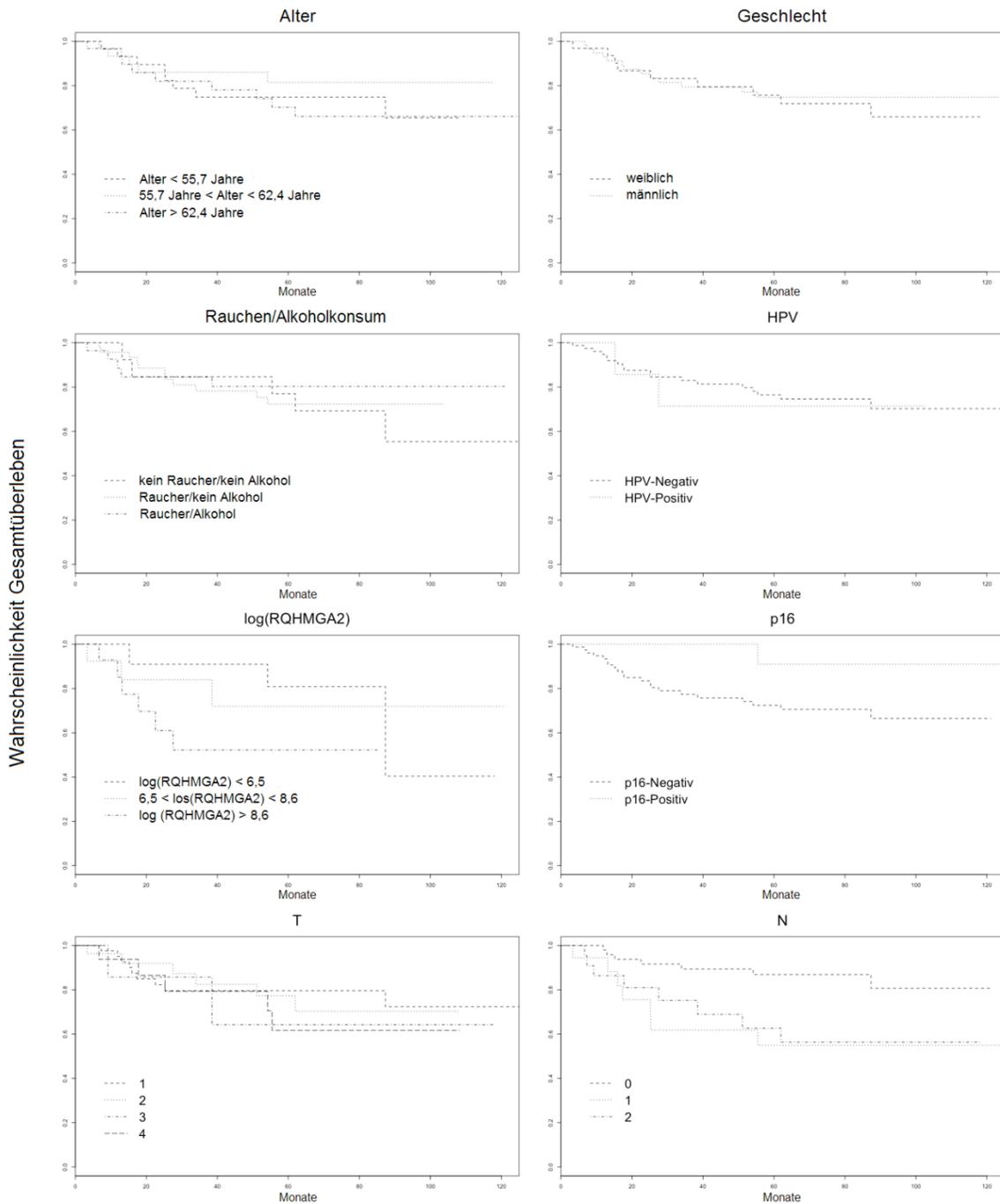


Diagramm 4: Einfluss der verschiedenen Parameter auf das Gesamtüberleben. Kurven basieren auf der Kaplan-Meier Methode.

Tabelle 11: Risikorate der potentiellen prognostischen Faktoren für das Gesamtüberleben. Berechnet mit Log-Rang-Test.

Parameter	Risikorate	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter			
55.7<Alter<62.4	0,64	0,21 – 1,94	0,427
Alter>62.4	1,17	0,45 – 3,03	0,753
Geschlecht			
männlich	0,85	0,36 – 2,01	0,717
Raucher/Alkoholkonsum			
Raucher/kein Alkohol	0,77	0,27 – 2,22	0,626
Raucher/Alkohol	0,57	0,16 – 1,97	0,373
T-Status			
T2	1,18	0,42 – 3,33	0,753
T3	1,52	0,33 – 7,08	0,591
T4	1,53	0,51 – 4,57	0,446
N-Status			
N1	3,72	1,30 – 10,65	0,014
N2	3,3	1,20 – 9,12	0,021
HPV			
positiv	1,22	0,28 – 5,28	0,789
p16			
positiv	0,23	0,03 – 1,73	0,154
log(RQHMG2)			
6.5 < log(RQHMG2) <	1,13	0,23 – 5,64	0,878
log(RQHMG2)> 8.6	2,72	0,65 – 11,36	0,17

Die Cox Regressionsanalyse ergibt einen signifikanten Einfluss von Lymphknotenmetastasen auf das Gesamtüberleben der Patienten ($p = 0,019$ bei N1 und $p = 0,020$ bei N2). Patienten bei denen das Mundhöhlenkarzinom bereits in die Lymphknoten metastasiert hat, haben im Beobachtungszeitraum eine 3,5 – 4-fach erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit gegenüber Patienten, bei denen keine Metastasen nachgewiesen sind (Tabelle 12).

Auch HMGA2 zeigt signifikante Auswirkungen auf die Überlebensrate des Studienkollektivs ($p = 0,049$) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Beeinflussung des Gesamtüberlebens nach Mundhöhlenkarzinom durch Lymphknotenstatus und Expression von HMGA2 (RQHMGA2)

	Risikoquotient	p-Wert	95% Konfidenzintervall
N-Status			
N1	3,923	0,019	0,230 – 2,504
N2	3,536	0,020	0,195 – 2,331
logRQHMGA2	1,401	0,049	0,001 – 0,673

Patienten mit einer geringen Expression von HMGA2 im Karzinom haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 81%, während die Patienten mit der höchsten Expression von HMGA2 im Tumor nur eine 5-Jahres-Überlebensrate von 51% haben (Diagramm 4).

Kombiniert man den Einfluss von HMGA2 und dem Nodalstadium auf die Gesamtüberlebensrate, fällt auf, dass bei niedriger Expression von HMGA2 und N0-Status die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 87% liegt. Auch bei N2-Status und niedriger HMGA2-Expression liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit im 5-Jahres-Zeitraum immerhin noch bei 77%. Bei stark erhöhter Expression von HMGA2 im Karzinom und N0-Status liegt die Überlebensrate nur noch bei 63% im Nachbeobachtungszeitraum von 5 Jahren. Eine deutlich geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (42%) zeigen Mundhöhlenkarzinome, wenn zusätzlich zur starken HMGA2-Expression auch der Lymphknotenstatus N2 erfüllt ist (Diagramm 5).

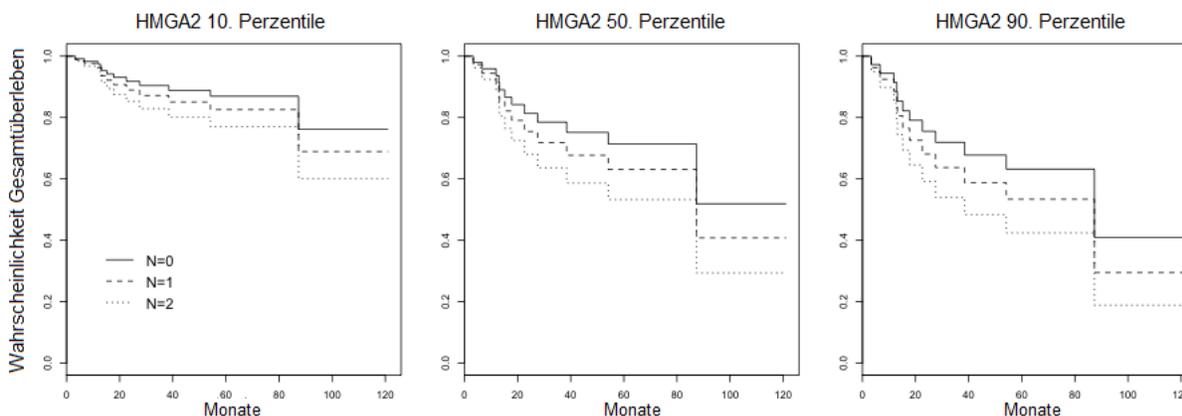


Diagramm 5: Einfluss der Expression von high mobility group Gen A2 (HMGA2) kombiniert mit dem Einfluss des Nodalstatus (N0 – N2) auf das Gesamtüberleben.

4 Diskussion

Patienten bei denen Mundhöhlenkrebs diagnostiziert wird, haben immer noch eine niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50% (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013) und eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit einen Rückfall zu erleiden (Mücke et al. 2009). Bisher wird in der Routinediagnostik hauptsächlich die TNM-Klassifikation eingesetzt. Leider ist mit dieser Klassifikation erst nach der Operation ein exaktes Staging des Karzinoms möglich. Wenn es gelingt geeignete molekulare Marker zu finden, die es ermöglichen schon bei Biopsieentnahme das Karzinom genauer zu klassifizieren, würde es zu einer Verbesserung in der Krebstherapie kommen. Bei PEC niedriger Aggressivität, könnten die Resektionsgebiete bei der Neck-Dissection zu Gunsten einer besseren Lebensqualität nach Möglichkeit kleiner gehalten werden. Bei sehr aggressiv wachsenden PEC könnten zusätzliche adjuvante Therapien und engmaschigere Nachsorgen durchgeführt werden.

Diese Arbeit analysiert das Vorhersagepotential von HPV, p16, HMGA2 und der TNM-Klassifikation für Rezidivraten und Gesamtüberlebensraten bei Patienten denen ein Mundhöhlenkarzinom operativ vollständig entfernt werden konnte.

Die 5-Jahres-Überlebensrate der Studienpopulation ist mit 75% höher als die in der Literatur angegebene mit ca. 50% (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013). Da von vorneherein nur Patienten mit vollständig resektierten Karzinomen in die Studie aufgenommen wurden, ist es wahrscheinlich, dass der bessere Wert durch die Selektion des Patientenpools zustande kommt. Fast 75% in dieser Studie haben einen Tumor kleiner Ausdehnung (T1 oder T2) und nur etwa die Hälfte (54%) haben Lymphknotenmetastasen. Patienten mit schlechter 5-Jahres-Prognose (UICC Stadium III und IV) sind daher nur zu einem geringen Anteil vertreten. Außerdem ist anzunehmen, dass die engmaschige Nachsorge, an der die Patienten dieser Studie teilnehmen, dazu führt, dass Rezidive frühzeitig erkannt und operativ entfernt werden. Eine erneute fortschreitende Tumorausbreitung, die zu einem krankheitsbedingten Tod führt, wird so wahrscheinlich häufig vermieden.

Die Rezidivrate liegt mit 36,4% innerhalb der zu erwartenden Werte von 25-45% (Mücke et al. 2009).

HPV-Positivität wird bei Pharynxkarzinomen mit einer verbesserten Überlebensrate und einer geringeren Rezidivrate in Verbindung gebracht, bei PEC der Mundhöhle hingegen zeigt sich kein Einfluss auf die Überlebensraten. Ob HPV-Positivität zu einer geringeren Rezidivrate führt, ist noch nicht abschließend geklärt (Ragin, Taioli 2007), (Reimers et al. 2007), (Reuschenbach et al. 2013), (Zafereo et al. 2016).

HPV-DNA wird in dieser Studie in 7 der 85 Karzinomproben nachgewiesen. Die durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse zeigt, dass HPV die Rezidiv- und Überlebensrate nicht beeinflusst.

Verlust von p16 bei Mundhöhlenkrebs wird mit einer schlechteren Prognose für die rezidivfreie Zeit und die Zeit des Gesamtüberlebens in Verbindung gebracht (Jayasurya et al. 2005), (Shah et al. 2009), (Smith et al. 2008).

In dieser Studie lässt sich p16 in 14 von 91 Fällen immunhistochemisch darstellen. Patienten mit p16-positiven Karzinomen bleiben häufiger frei von Rezidiven (79%) als Patienten mit p16-negativen Karzinomen (58%). In der Datenanalyse zeigt sich keine

Signifikanz bei der Rezidivrate ($p = 0,112$) und ein grenzwertig signifikanter Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate ($p = 0,081$). Der Chi-Quadrat-Test indiziert jedoch eine Abhängigkeit zwischen p16 und dem Nodalstatus.

Eine Abhängigkeit zwischen p16-Anfärbbarkeit und einer Infektion der Zellen mit HPV kann wie erwartet (Pérez-Sayáns et al. 2011) nicht nachgewiesen werden ($p = 1,0$).

HMGA2 ist bei diversen Krebsarten ein vielversprechender Marker, um aggressive Ausbreitungstendenzen der Tumorzellen abschätzen zu können (Fusco, Fedele 2007). Miyazawa et. al gelingt es in einer Studie mit 42 Patienten einen Zusammenhang zwischen HMGA2 und Karzinomrezidiven herzustellen (Miyazawa et al. 2004).

Bei dem quantitativen Nachweis von HMGA2 tauchen Probleme mit der Nukleinsäurequalität der vom Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gestellten Tumorproben auf. Es ist durchaus auch bei FFPE-Proben möglich gute Resultate bei der quantitativen RT-PCR zu erhalten (Belge et al. 2008), allerdings wurde in den Jahren, aus denen die Studienproben stammen, ungepuffertes Formalin verwendet, welches die RNA geschädigt hat. Nach Überprüfung der RNA-Integrität mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer, zeigt sich ein starker Zerfall der RNA der Proben im Gegensatz zum FFPE-Kontrollgewebe, welches in gepuffertem Formalin fixiert wurde. Deshalb ist es uns nur bei 40 der 91 Proben gelungen, ausreichend RNA für die HMGA2-Analyse zu isolieren. Die Resultate zeigen eine große Streuung des HMGA2-Gehaltes der Karzinomzellen.

Der in dieser Studie benutzte Nachweis von HMGA2 mittels RT-PCR ist sehr viel sensitiver als der immunhistochemische Nachweis den Miyazawa et al. in ihren Tests benutzen. Daher ist es nicht wie in Miyazawa's Studie (Miyazawa et al. 2004) möglich, eine HMGA2-positive und eine HMGA2-negative Gruppe zu bilden. Stattdessen wird die quantitative Menge HMGA2 auf einer logarithmischen Skala bewertet.

Bei den Karzinomen, die in dieser Studie zu der Gruppe mit geringer HMGA2-Expression zählen, rezidivieren in fünf Jahren Nachbeobachtungszeit nur 26%. In der Gruppe mit sehr hoher HMGA2-Expression rezidivieren hingegen 52%. Bei der Analyse mittels Cox Regression findet sich eine grenzwertig signifikante Beeinflussung der

Rezidivrate durch die quantitative Menge von HMGA2 ($p = 0,057$). Damit kann der Einfluss von HMGA2 auf die Rezidivneigung, den Miyazawa et al. in ihrer Studie finden (Miyazawa et al. 2004), durch diese Studie unterstützt werden.

Einen signifikanten Effekt hat die HMGA2-Expression auf die Gesamtüberlebensrate ($p = 0,049$). Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit nur geringer HMGA2 Expression ($\log(\text{RQHMGA2}) < 6,5$) liegt bei 81%, während die Rate bei denen mit hoher HMGA2-Expression ($\log(\text{RQHMGA2}) > 8,6$) nur bei 51% liegt.

Die TNM-Klassifizierung der UICC erlaubt nach Vorliegen des Tumorresektates eine sehr gute Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors und des Ausbreitungsgrades in den ableitenden Lymphbahnen. Bei großer Ausdehnung und insbesondere infiltrativem Wachstum in die benachbarten Strukturen, sowie bei Metastasen in den Lymphbahnen, ist von einer geringeren Überlebensrate auszugehen (Pulte, Brenner 2010), (Kovács et al. 2007). Auch die Rezidivrate scheint hierdurch negativ beeinflusst zu werden (Vázquez-Mahía et al. 2012).

In der vorgegebenen Studienpopulation zeigen sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung von Überlebens- und Rezidivrate durch die Größe des Primärtumors. Da nur Patienten mit komplett reseziertem Karzinom (R0) in die Studienpopulation aufgenommen wurden, ist der Anteil an groß ausgedehnten Karzinomen und solchen, die bereits Nachbarstrukturen infiltrieren, deutlich geringer, als in den Populationen anderer Studien. Einen Anhalt für diese Annahme gibt das Institut für Krebs Epidemiologie e.V., das für die Diagnosejahre 2009-2010 einen Anteil von 65% für fortgeschrittene Karzinome mit Metastasen oder infiltrativem Wachstum in Nachbarstrukturen angibt (Institut für Krebs Epidemiologie e.V. 2014). In dieser Studie machten diese Karzinome nur 33% aus. Naturgemäß ist die vollständige Resektion eines schon Knochen oder Nervenbahnen infiltrierenden Karzinoms schwierig, wenn nicht gar unmöglich, wenn dadurch die Funktionalität oder Lebensqualität zu stark eingeschränkt wird. Gerade die vollständige Entfernung des Karzinoms ist allerdings wichtig, um eine gute Überlebensprognose zu gewährleisten. Würde man die Patienten mit nicht vollständig entfernbaren Karzinomen mit in die Studienpopulation integrieren,

könnte sich die in der Literatur erwähnte Beeinflussung von Überlebens- und Rezidivrate darstellen lassen.

Nachweisbare Lymphknotenmetastasen beeinflussen in dieser Studie sowohl Überlebens- als auch Rezidivraten. Eine statistisch signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben zeigt sich bei Lymphknotenstatus N1 ($p = 0,019$) und N2 ($p = 0,02$). Bei Betrachtung des rezidivfreien Überlebens zeigt sich nur bei Lymphknotenstatus N2 eine statistische Signifikanz ($p = 0,02$). Wenn nur eine bis zu 3 cm große Lymphknotenmetastase gefunden wird, war der Vergleich zum N0-Status in der rezidivfreien Überlebenszeit nicht signifikant. Je weiter ein Karzinom bereits gestreut hat, desto schwieriger wird es für den Operateur es mit sämtlichen Metastasen zu entfernen. Daher steigt die Wahrscheinlichkeit trotz genauester histologischer Kontrollen erkranktes Gewebe zurückzulassen, das dementsprechend mit der Zeit zu einem makroskopisch feststellbaren Rezidiv heranwächst. Es ist daher absehbar gewesen, dass die Rezidivrate der N2-Gruppe stärker von der N0-Gruppe abweicht, als die der N1-Gruppe. Interessant ist, dass die Auswahlkriterien der Studienpopulation hier im Gegensatz zum T-Stadium keine Auswirkungen auf die Resultate haben, obwohl auch hier durch die Auswahl ein Großteil der bereits stark metastasierten und damit nicht mehr vollständig entfernbaren Karzinome weggefallen sein müsste. Der Einfluss des Nodalstatus scheint demnach weniger durch Populationsauswahlkriterien verfälschbar zu sein.

Sehr interessant sind die Ergebnisse der Kombination von N-Status und HMGA2-Expression. Während Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und mit sehr geringer HMGA2-Expression im Karzinom zu 87% im 5-Jahres-Zeitraum überlebten, sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich ab auf 42% bei nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen und stark erhöhter HMGA2-Expression. Bei dem rezidivfreien Überleben zeigt sich, dass bei niedrigem HMGA2-Vorkommen selbst bei Status N2 65% nach 5 Jahren rezidivfrei blieben, während bei hohem HMGA2-Gehalt bei gleichem Lymphknotenstatus nur 25% rezidivfrei blieben. Da HMGA2 in Karzinomen besonders in der invasiven Randarealen exprimiert wird (Miyazawa et al. 2004), (Morishita et al. 2013) und hier den Karzinomzellen ermöglicht außerhalb des Epithelverbandes in gesundes Gewebe hineinzuwachsen, kann angenommen werden, dass eine extrem

erhöhte HMGA2-Expression schon Ausdruck von Mikrometastasierung oder Mikroausläufern des Primärtumors ist. Eine alleinige chirurgische Entfernung erreicht bei dieser Gruppe von Karzinomen vielleicht nicht alle entarteten Zellen und führt im Endeffekt zu einer erhöhten Sterblichkeit durch das Karzinom. Sollte dies in einer Studie bestätigt werden können, wäre bei dieser Patientengruppe zusätzlich zur radikalen operativen Entfernung auch über eine adjuvante Chemo- oder Radiotherapie und engmaschigeren Nachkontrollen zugunsten besserer Überlebensraten nachzudenken.

Während HPV-Diagnostik und p16-Status bei Mundhöhlenkarzinomen in dieser Studie nicht geeignet sind, um Rezidivraten oder Überlebenswahrscheinlichkeiten des Patienten abzuschätzen, ist die HMGA2-Expression durchaus ein interessanter molekularer Marker, um die Rezidivneigung von Mundhöhlenkarzinomen und die Überlebenswahrscheinlichkeit abschätzen zu können.

Der Nodalstatus ermöglicht eine gute Einschätzung zur Prognose der Überlebenschancen und Rezidivneigung eines Patienten. Nachteilig ist beim Nodalstatus zu vermerken, dass er erst endgültig festgestellt werden kann, wenn das komplette Tumorsektat dem Pathologen vorliegt.

Die HMGA2-Expression hat den entscheidenden Vorteil, dass sie bei einer Neubildung schon in einer Biopsie überprüft werden kann und so schon im Vorfeld der Operation wichtige Hinweise auf aggressives Wachstum des Karzinoms und damit auch zum Beispiel auf das Ausdehnungsgebiet der Neck Dissection geben könnte.

Nach der Bestimmung der HMGA2-Expression lässt sich auch eine Patientengruppe selektieren ($\log RQ_{HMGA2} > 8,6$), die von einer zusätzlichen adjuvanten Therapie profitieren könnte und für die definitiv ein sehr engmaschigeres Nachsorge-Intervall festgelegt werden muss.

HMGA2 scheint eine große Bedeutung bei der Ausbreitung und Metastasierung von Krebs zu haben. Wenn sich diese Beobachtungen mit einer größeren Studie bestätigen ließen, hätte die klinische Medizin einen potenten Marker zur Verfügung, der individuellere Therapieansätze von Mundhöhlenkrebs ermöglicht.

5 Zusammenfassung

In Deutschland werden jedes Jahr ca. 13.000 Menschen mit der Diagnose Mundhöhlenkrebs konfrontiert. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen zwischen 48-61% und sind stark abhängig vom Stadium der Erkrankung. Auch die Rezidivquote ist mit 25-45% relativ hoch. Die Prognoseabschätzung erfolgt in der Klinik immer noch anhand der TNM-Klassifikation. Eine exakte Bestimmung des Tumorstadiums ist allerdings erst nach erfolgter Resektion des Tumors möglich. In dieser Studie wird untersucht, welchen Einfluss die in der Literatur vorgeschlagenen Tumormarker Humanes Papilloma Virus, der Tumorsuppressor p16 und das für Proliferation und Differenzierung wichtige Protein HMGA2 sowie die Parameter der TNM-Klassifikation auf die Rezidiv- und Überlebensrate haben.

91 Patienten, davon 59 Männer und 32 Frauen, mit vollständig resektierten Mundhöhlenkarzinomen sind in die Studie eingeschlossen.

Daten zum Staging werden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel übernommen. Humane Papilloma Viren werden mittels PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen. P16 wird mittels immunhistochemischer Färbung in den Proben sichtbar gemacht. Die relative Menge an HMGA2 in den Tumorproben wird durch Real-Time-PCR mit speziellen TaqMan-Primern ermittelt.

Rezidiv- und Überlebenszeitanalyse werden nach dem Cox Regression Verfahren durchgeführt.

Infektionen mit dem Humanen Papilloma Virus, p16, Tumordurchmesser und Zelldifferenzierung haben bei Mundhöhlenkrebs keinen Einfluss auf Rezidive und Überlebensrate. Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss von Lymphknotenmetastasen auf die Rezidivrate sowie eine Tendenz zu geringeren Rezidivraten bei niedriger HMGA2-Expression. Sowohl Lymphknotenbeteiligung als auch stark erhöhte HMGA2-Expression zeigen signifikante Verschlechterungen in der Gesamtüberlebensrate.

Die Studie zeigt, dass der molekulare Marker HMGA2 bei der präoperativen Diagnostik des Mundhöhlenkrebses in Zukunft eine Rolle spielen könnte. Weitere Studien mit größeren Studienpopulationen sollten diese Studie bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

Abe, N., Watanabe, T., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Chiappetta, G., Fusco, A., Atomi, Y. (2003): An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer* 89, 2104–9

Applied Biosystems (2008): Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR

Belge, G., Meyer, A., Klemke, M., Burchardt, K., Stern, C., Wosniok, W., Loeschke, S., Bullerdiek, J. (2008): Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: A novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 56–63

Bradley, K. T., Budnick, S. D., Logani, S. (2006): Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod. Pathol.* 19, 1310–6

Bustin, M. (2001): Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 152–3

Califano, D., Pignata, S., Losito, N. S., Ottaiano, A., Greggi, S., Simone, V. de, Cecere, S., Aiello, C., Esposito, F., Fusco, A., Chiappetta, G. (2014): High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer. *J. Cell. Physiol.* 229, 53–9

Castellsague, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quiros, B., Tous, S., Clavero, O., Alos, L., Biegner, T., Szafarowski, T., Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Claros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., Benevolo, M., Kasamatsu, E., Mehanna, H., Ndiaye, C., Guimera, N., Lloveras, B., Leon, X., Ruiz-Cabezas, J. C., Alvarado-Cabrero, I., Kang, C.-S., Oh, J.-K., Garcia-Rojo, M., Iljazovic, E., Ajayi, O. F., Duarte, F., Nessa, A., Tinoco, L., Duran-Padilla, M. A., Pirog, E. C., Viarheichyk, H., Morales, H., Costes, V., Felix, A., Germar, M. JV., Mena, M., Ruacan, A., Jain, A., Mehrotra, R., Goodman, M. T., Lombardi, L. E., Ferrera, A., Malami, S., Albanesi, E. I., Dabed, P., Molina, C., Lopez-Revilla, R., Mandys, V., Gonzalez, M. E., Velasco, J., Bravo, I. G., Quint, W., Pawlita,

M., Munoz, N., Sanjose, S. de, Xavier Bosch, F. (2016): HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute* 108, djv403

Cleynen, I., Van De Ven, W. J. (2008): The HMGA proteins: A myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 32, 289–305

D'Silva, N. J., Ward, B. B. (2007): Tissue Biomarkers for Diagnosis & Management of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Alpha Omegan* 100, 182–9

Doerr, H. W. (2010): *Medizinische Virologie: Grundlage, Diagnostik und Therapie virologischer Erkrankungen*. 2nd ed. Thieme, Stuttgart

Duensing, S., Munger, K. (2002): The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 62, 7075–82

Feller, L., Wood, N. H., Khammissa, R. A., Lemmer, J. (2010): Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med* 6

Fusco, A., Fedele, M. (2007): Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 899–910

Goodwin, G. H., Sanders, C., Johns, E. W. (1973): A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38, 14–9

Grobe, A., Hanken, H., Kluwe, L., Schollchen, M., Tribius, S., Pohlenz, P., Clauditz, T., Grob, T., Simon, R., Sauter, G., Heiland, M., Blessmann, M. (2013): Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 42, 676–81

Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F., Reidel, U., Snijders, P., Meijer, C., Viscidi, R., Munoz, N., Franceschi, S. (2003): Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95, 1772–83

Hirning-Folz, U., Wilda, M., Rippe, V., Bullerdiek, J., Hameister, H. (1998): The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 23, 350–7

Institut für Krebs Epidemiologie e.V. (2014). Krebs in Schleswig-Holstein. Band 10 Inzidenz und Mortalität in den Jahren 2009 - 2011, Lübeck

Jayasurya, R., Sathyan, K. M., Lakshminarayanan, K., Abraham, T., Nalinakumari, K. R., Abraham, E. K., Nair, M. K., Kannan, S. (2005): Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol* 18, 1056–66

Kademani, D., Bell, R. B., Bagheri, S., Holmgren, E., Dierks, E., Potter, B., Homer, L. (2005): Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63, 1599–605

Klemke, M., Meyer, A., Nezhad, M. H., Bartnitzke, S., Drieschner, N., Frantzen, C., Schmidt, E. H., Belge, G., Bullerdiek, J. (2009): Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 171–8

Kleter, B., van Doorn, L. J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., van Krimpen, K., Burger, M., ter Harsel, B., Quint, W. (1998): Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* 153, 1731–9

Kovács, A. F., Megahed, W., Scholz, M., Sader, R. (2007): Überlebensverbesserung eines unizentrischen Gesamtkollektivs aus 20 Jahren: 1038 Patienten mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen 1983–2004. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 11, 267–83

Kruger, M., Pabst, A. M., Walter, C., Sagheb, K., Gunther, C., Blatt, S., Weise, K., Al-Nawas, B., Ziebart, T. (2014): The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *J Craniomaxillofac Surg* 42, 1506–14

Lee, C.-T., Wu, T.-T., Lohse, C. M., Zhang, L. (2014): High-mobility group AT-hook 2: an independent marker of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 45, 2334–40

Li, Y., Nichols, M. A., Shay, J. W., Xiong, Y. (1994): Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* 54, 6078–82

Licitra, L., Perrone, F., Bossi, P., Suardi, S., Mariani, L., Artusi, R., Oggionni, M., Rossini, C., Cantù, G., Squadrelli, M., Quattrone, P., Locati, L. D., Bergamini, C., Olmi, P., Pierotti, M. A., Pilotti, S. (2008): High-risk Human Papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 5630–6

Ligon, A. H., Moore, S. D., Parisi, M. A., Mealiffe, M. E., Harris, D. J., Ferguson, H. L., Quade, B. J., Morton, C. C. (2005): Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 340–8

Meyer, A. (2010): Prognoseparameter bei soliden Tumoren und Systemerkrankungen. *Rer. Nat. Diss., Bremen*

Meyer, B., Loeschke, S., Schultze, A., Weigel, T., Sandkamp, M., Goldmann, T., Vollmer, E., Bullerdiek, J. (2007): HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 46, 503–11

Miyazawa, J., Mitoro, A., Kawashiri, S., Chada, K. K., Imai, K. (2004): Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 64, 2024–9

Montebugnoli, L., Cervellati, F., Cocchi, R., Farnedi, A., Pennesi, M. G., Flamminio, F., Foschini, M. P. (2010): Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow-up. *Histopathology* 57, 528–34

Morishita, A., Zaidi, M. R., Mitoro, A., Sankarasharma, D., Szabolcs, M., Okada, Y., D'Armiento, J., Chada, K. (2013): HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer Res.* 73, 4289–99

Motoyama, K., Inoue, H., Nakamura, Y., Uetake, H., Sugihara, K., Mori, M. (2008): Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res* 14, 2334–40

Mücke, T., Wagenpfeil, S., Kesting, M. R., Hölzle, F., Wolff, K.-D. (2009): Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer. *Oral Oncol.* 45, 687–91

Müller, M. H., Drieschner, N., Focken, T., Bartnitzke, S., Winter, N., Klemke, M., Bullerdiek, J. (2013): HMGA2 expression in the PC-3 prostate cancer cell line is autonomous of growth factor stimulation. *Anticancer Res.* 33, 3069–78

Pande, P., Mathur, M., Shukla, N. K., Ralhan, R. (1998): pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol.* 34, 396–403

Pannone, G., Santoro, A., Papagerakis, S., Lo Muzio, L., Rosa, G. de, Bufo, P. (2011): The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agents Cancer* 6, 4

Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Gayoso-Diz, P., Barros-Angueira, F., Gándara-Rey, J. M., García-García, A. (2011): p16INK4a/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? *Cancer Letters* 306, 134–41

Pulte, D., Brenner, H. (2010): Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 15, 994–1001

Ragin, C. C., Taioli, E. (2007): Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 121, 1813–20

Raskin, L., Fullen, D. R., Giordano, T. J., Thomas, D. G., Frohm, M. L., Cha, K. B., Ahn, J., Mukherjee, B., Johnson, T. M., Gruber, S. B (2013): Transcriptome profiling identifies HMGA2 as a biomarker of melanoma progression and prognosis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 2585–92

Reeves, R., Beckerbauer, L. (2001): HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure: Review. *Biochim Biophys Acta* 1519, 13–29

Reimers, N., Kasper, H. U., Weissenborn, S. J., Stützer, H., Preuss, S. F., Hoffmann, T. K., Speel, E. J. M., Dienes, H. P., Pfister, H. J., Guntinas-Lichius, O., Klussmann, J. P. (2007): Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120, 1731–8

Reuschenbach, M., Kansy, K., Garbe, K., Vinokurova, S., Flechtenmacher, C., Toth, C., Prigge, E.-S., Thiele, O. C., Reinert, S., Hoffmann, J., Knebel Doeberitz, M. von, Freier, K. (2013): Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany. *Oral Oncol* 49, 937–42

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012: 10. Ausgabe, Berlin

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010.: 9. Ausgabe., Berlin

Rocco, J. W, Sidransky, D. (2001): p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Exp Cell Res* 264, 42–55

Rogalla, P., Drechsler, K., Frey, G., Hennig, Y., Helmke, B., Bonk, U., Bullerdiek, J. (1996): HMGI-C Expression Patterns in Human Tissues: Implications for the Genesis of Frequent Mesenchymal Tumors. *Am J Pathol* 149, 775–9

Rogalla, P., Drechsler, K., Kazmierczak, B., Rippe, V., Bonk, U., Bullerdiek, J. (1997): Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: Relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 19, 153–6

Rubin, D. B (1987): Multiple imputation for nonresponse in surveys Wiley, New York

Schafer, K. A (1998): The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* 35, 461–78

Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M. A., Di Bernardo, J., Altamura, S., Fusco, A., Manfioletti, G., Giancotti, V. (2004): Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 574, 1–8

Shah, N. G., Trivedi, T. I., Tankshali, R. A., Goswami, J. V., Jetly, D. H., Shukla, S. N., Shah, P. M., Verma, R. J. (2009): Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. *Head Neck*, 1544–56

Shi, Z., Li, X., Wu, D., Tang, R., Chen, R., Xue, S., Sun, X. (2016): Silencing of HMGA2 suppresses cellular proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37, 7515–23

Smith, E. M., Ritchie, J. M., Summersgill, K. F., Klusmann, J. P., Lee, J. H., Wang, D., Haugen, T. H., Turek, L. P. (2004): Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 108, 766–72

Smith, E. M., Wang, D., Kim, Y., Rubenstein, L. M., Lee, J. H., Haugen, T. H., Turek, L. P. (2008): p16INK4a Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncology* 44, 133–42

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C. (2009): TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Wiley-Blackwell, Chichester

Sterenczak, K. A., Eckardt, A., Kampmann, A., Willenbrock, S., Eberle, N., Langer, F., Kleinschmidt, S., Hewicker-Trautwein, M., Kreipe, H., Nolte, I., Murua Escobar, H., Gellrich, N. C. (2014): HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin28 and let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 14, 694

Summer, H., Li, O., Bao, Q., Zhan, L., Peter, S., Sathiyathan, P., Henderson, D., Klonisch, T., Goodman, S. D., Droge, P. (2009): HMGA2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNA-damage-induced cytotoxicity during chemotherapy. *Nucleic Acids Res* 37, 4371–84

Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., Lo Muzio, L., Campisi, G. (2008): HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Annals of Oncology* 19, 1681–90

Thiery, J. P. (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–54

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015): Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 87–108

Upile, N. S., Shaw, R. J., Jones, T. M., Goodyear, P., Liloglou, T., Risk, J. M., Boyd, M. T., Sheard, J., Sloan, P., Robinson, M., Schache, A. G. (2014): Squamous cell carcinoma of the head and neck outside the oropharynx is rarely human papillomavirus related. *Laryngoscope* 124, 2739–44

Vázquez-Mahía, I., Seoane, J., Varela-Centelles, P., Tomás, I., Álvarez García, A., López Cedrún, J. L. (2012): Predictors for tumor recurrence after primary definitive surgery for oral cancer. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 70, 1724–32

Wang, X., Liu, X., Li, A.-J., Chen, L., Lai, L., Lin, H., Hu, S., Yao, L., Peng, J., Loera, S., Xue, L., Zhou, B., Zhou, L., Zheng, S., Chu, P., Zhang, S., Ann, D., Yen, Y. (2011): Overexpression of HMGA2 promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 17, 2570–80

Wolffe, A. P. (1994): Architectural transcription factors. *Science* 264, 1100–1

Zafereo, M. E, Xu, L., Dahlstrom, K. R., Viamonte, C. A., El-Naggar, A. K., Wei, Q., Li, G., Sturgis, E. M. (2016): Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus. *Oral oncology* 56, 47–53

Zhao, X.-P., Zhang, H., Jiao, J.-Y., Tang, D.-X., Wu, Y.-L., Pan, C.-B. (2016): Overexpression of HMGA2 promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *Journal of translational medicine* 14, 26

Zhou, X., Benson, K. F., Ashar, H. R., Chada, K. (1995): Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376, 771–4

Zhou, X., Benson, K. F., Przybysz, K., Liu, J., Hou, Y., Cherath, L., Chada, K. (1996): Genomic structure and expression of the murine Hmgi-c gene. *Nucleic Acids Res* 24, 4071–7

7 Anhang

7.1 PCR-Primer

<i>Gen</i>	<i>Größe in bp</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5' – 3')</i>
β-Aktin	309	Forward	AGC GGG AAA TCG TGC GTG
		Reverse	CAG GGT ACA TGG TGG TGC
HPV	65	SPF1A (Forward)	GCi CAG GGi CAC AAT AAT GG
		SPF1B (Forward)	GCi CAG GGi CAT AAC AAT GG
		SPF1C (Forward)	GCi CAG GGi CAT AAT AAT GG
		SPF1D (Forward)	GCi CAA GGi CAT AAT AAT GG
		SPF2B (Reverse)	GTi GTA TCi ACA GTA ACA AA
		SPF2D (Reverse)	GTi GTA TCi ACT GTA ACA AA

7.2 Gelbilder HPV-Nachweis

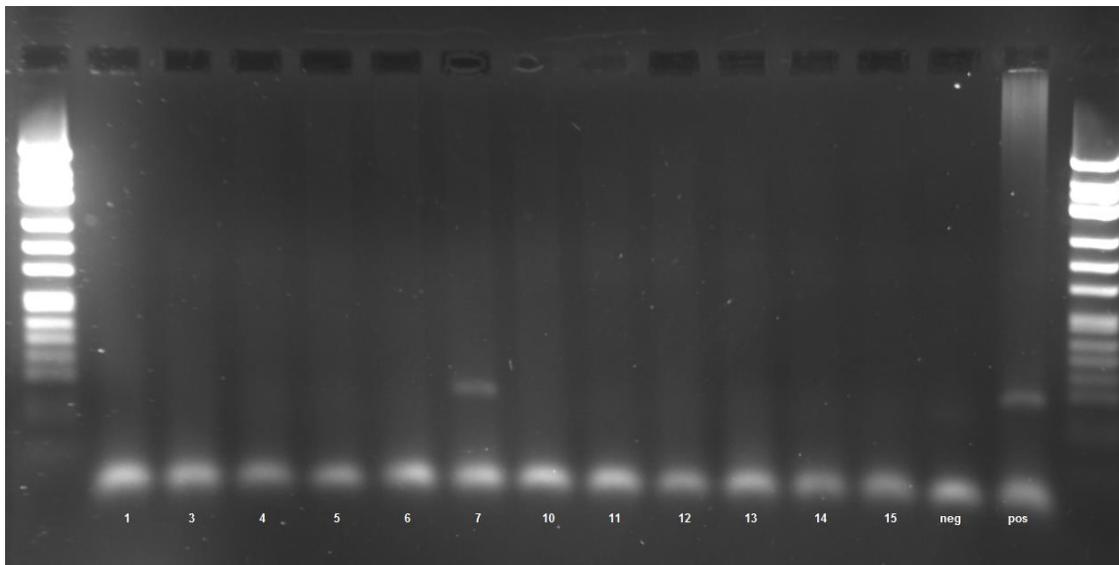


Abbildung 5: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 1-15 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 7. Probe 6 wurde nicht in die endgültige Studie inkludiert.

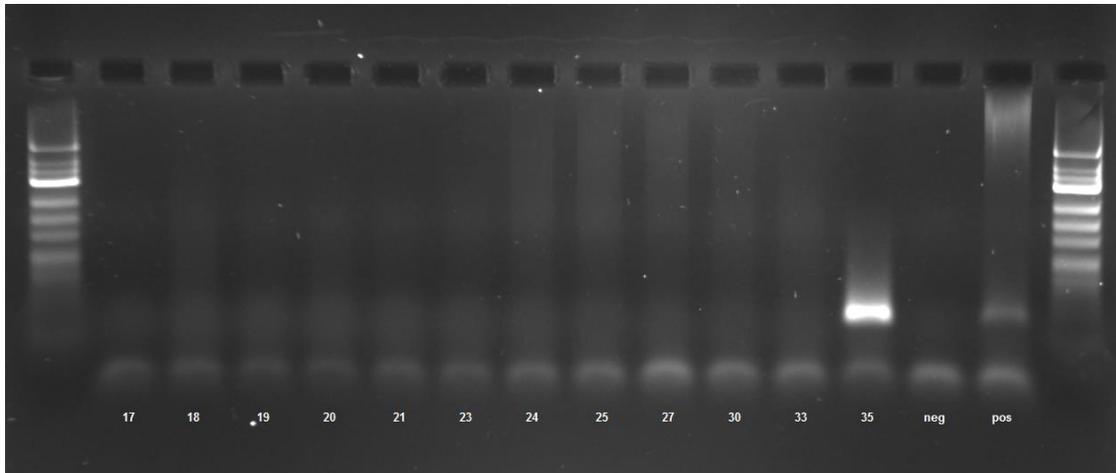


Abbildung 6: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 17-35 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 35. Probe 20 wurde nicht in die endgültige Studie inkludiert.

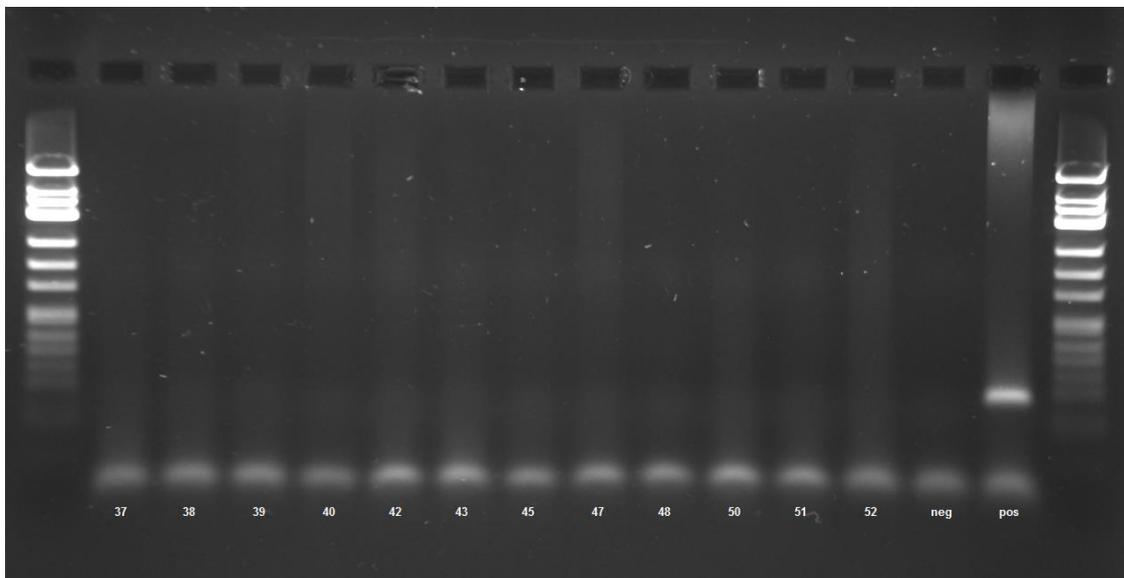


Abbildung 7: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 37-52 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Proben 43 und 47 wurden nicht in die endgültige Studie inkludiert.

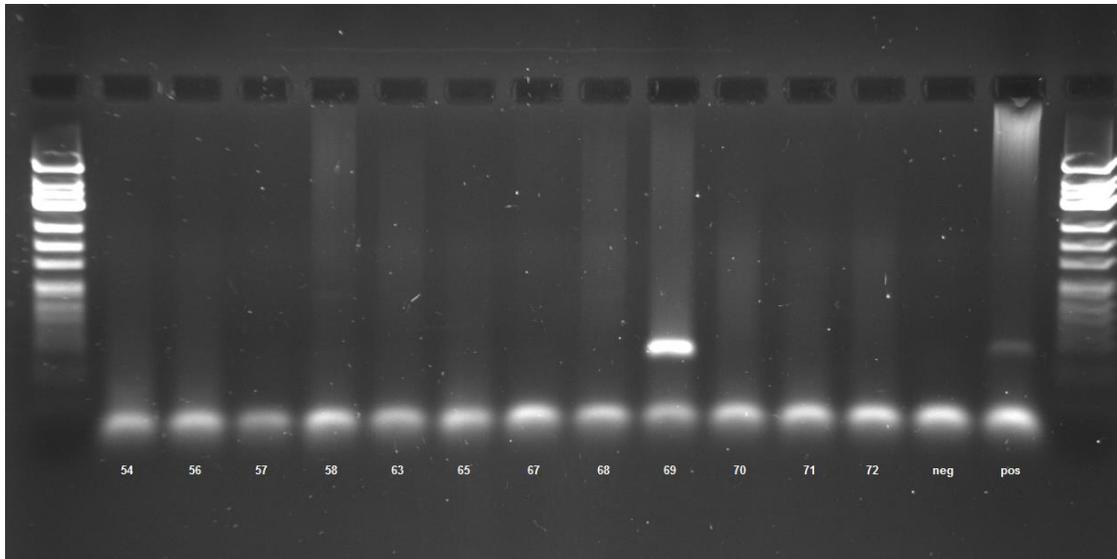


Abbildung 8: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 54-72 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 69. Proben 57 und 69 wurden nicht in die endgültige Studie inkludiert.

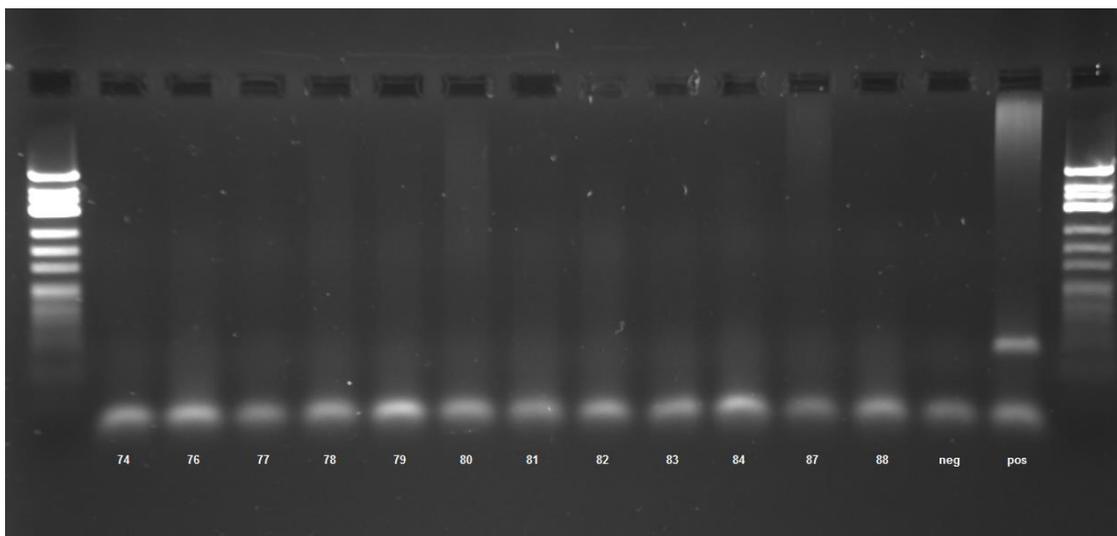


Abbildung 9: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 74-88 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle.

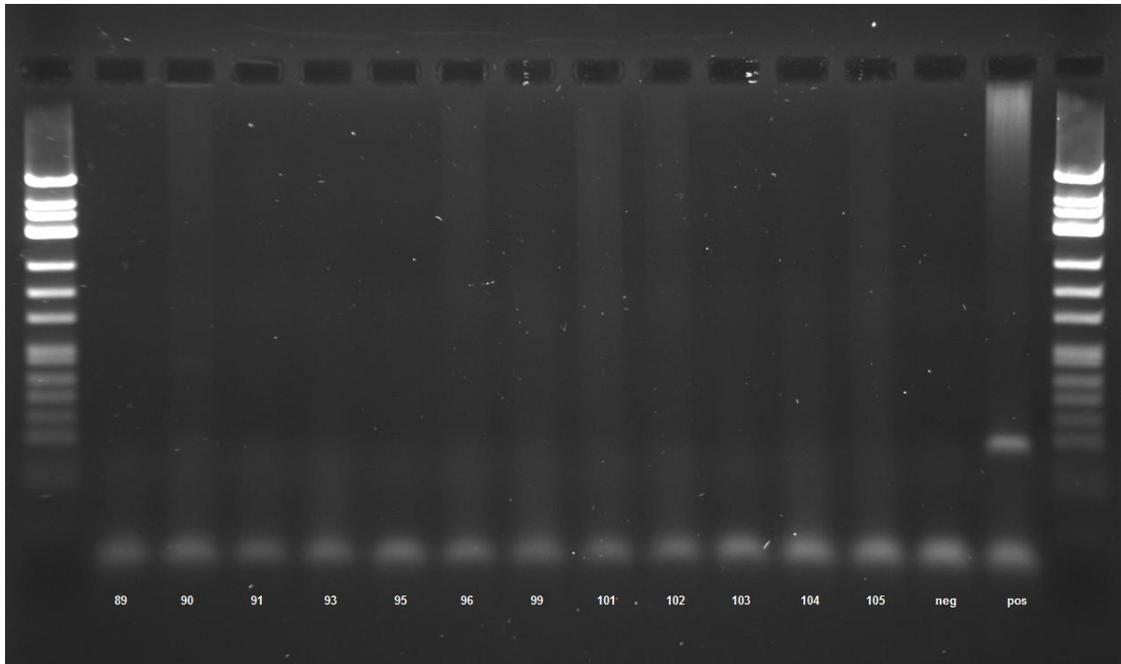


Abbildung 10: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 89-105 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Probe 95 wurde nicht in die endgültige Studie inkludiert.

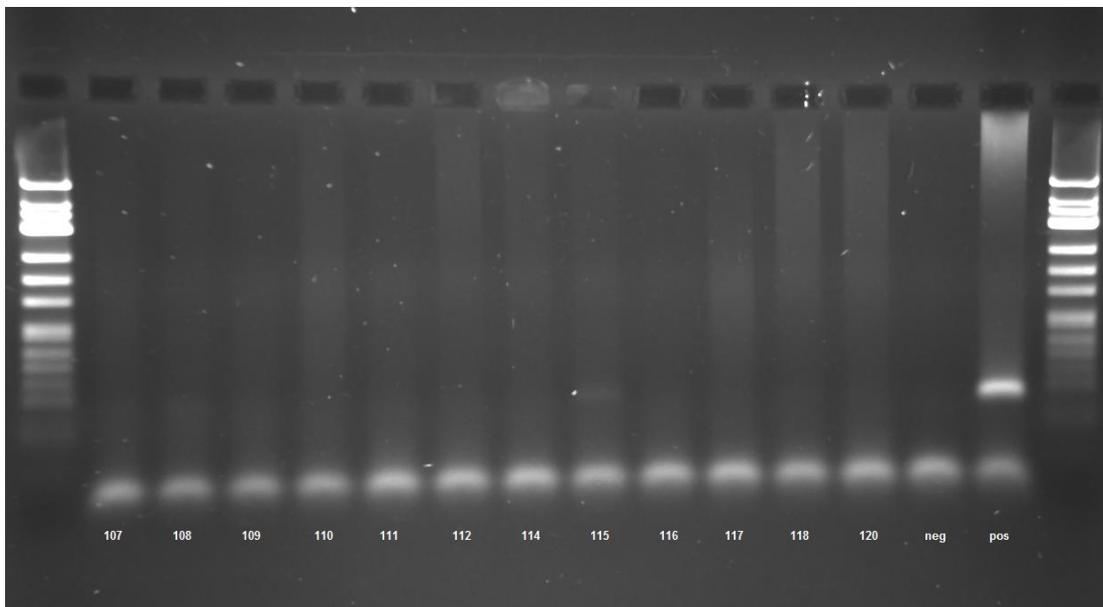


Abbildung 11: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 107-120 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 115. Probe 114 wurde nicht in die Studie inkludiert.

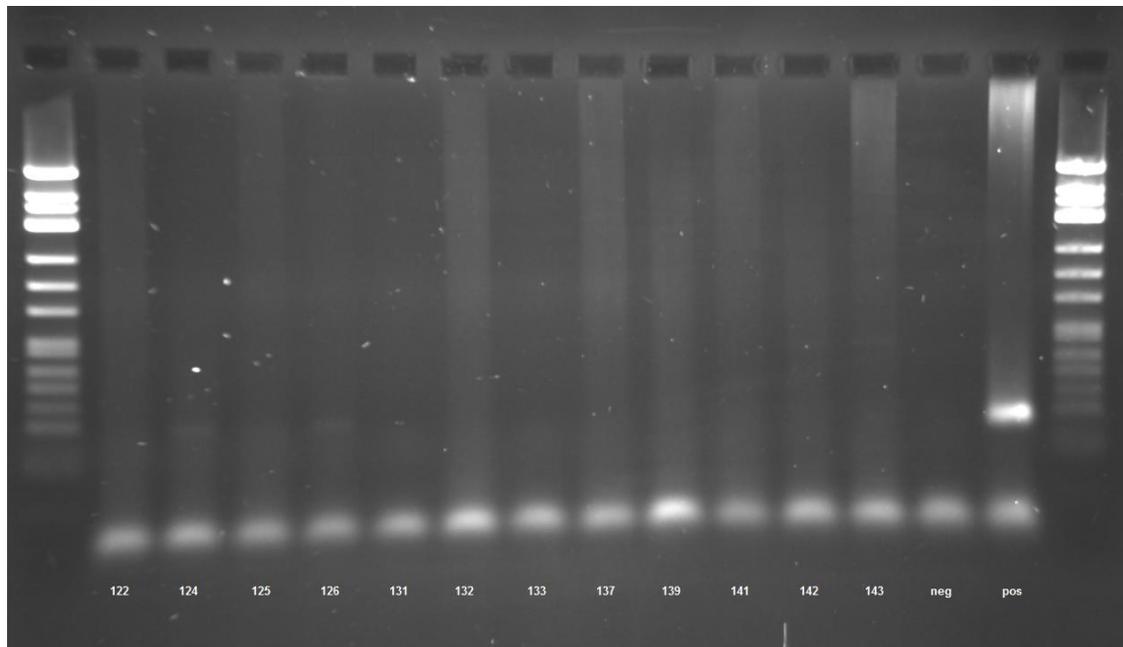


Abbildung 12: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 122-143 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 124,126. Proben 124,126,137 nicht in endgültige Studie inkludiert.

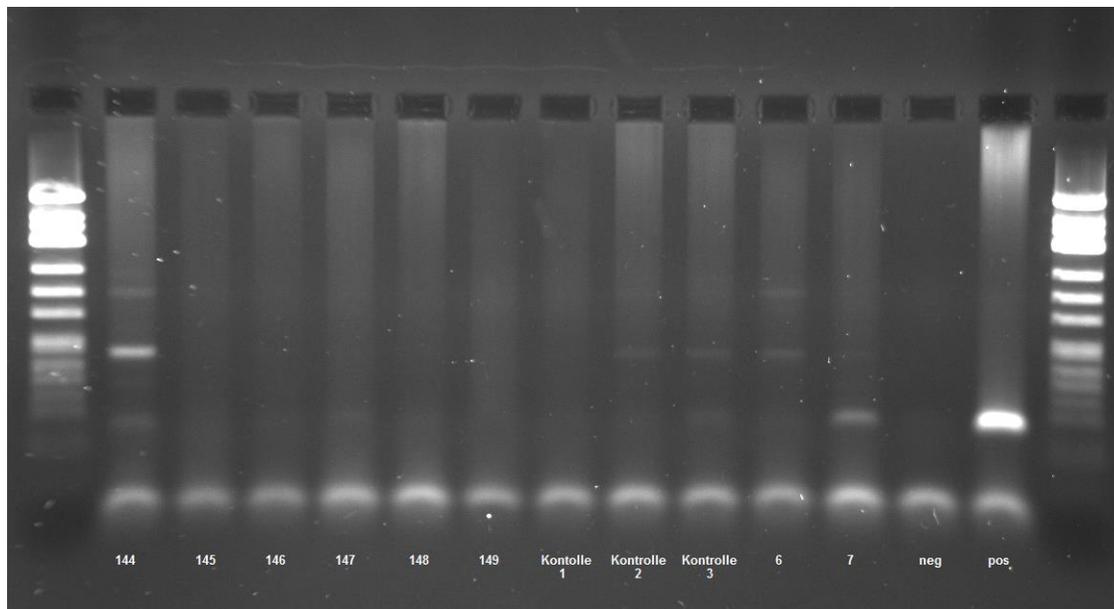


Abbildung 13: Nachweis eines 65 bp großen HPV-DNA-Fragmentes auf einem 2% Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid Färbung. Proben 144-149, gesunde Mundschleimhautproben (Kontrolle 1-3), sowie Proben 6,7 und negativ (neg)/positiv (pos) Kontrolle. Als positiv gewertet: 144,147,148,7. Probe 6 wurde nicht in die endgültige Studie inkludiert.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Patrick Warnke für die Möglichkeit bedanken, die Doktorarbeit an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Siegfried Loeschke für die Erarbeitung des Themas, die Unterstützung während der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Jan Hinrich Bräsen für die Möglichkeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zusammenzuarbeiten und bei René Holst von der Süddänischen Universität für die Hilfe bei der Erstellung der Statistiken bedanken.

Zuletzt möchte ich auch meinem Mann für seine unendliche Geduld, Unterstützung und Motivation danken.