

Technische Universität München

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

**Molekularbiologischer und infektiologischer Vergleich von HNSCC
und SNSCC hinsichtlich ihrer Metastasierungsrate**

Johannes Christian Döscher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. C. Pickhard
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 05.09.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.03.2015 angenommen.

Gewidmet
Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs und der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen	1
	Begriffserklärung	1
	Epidemiologie	1
	Klassifikation	2
	Ätiologie	3
	Pathologie	4
	Molekularpathologie	5
	Therapie	6
	Prognose	8
1.2	Molekulare Grundlagen	8
1.2.1	Viral vermittelte Tumorentstehung	8
	Humanes Papillomavirus	8
	Epstein-Barr-Virus	9
1.2.2	Tyrosinkinase und nachfolgende Signaltransduktion	9
	Epidermal Growth Factor Receptor	9
	Kirsten Rat Sarcoma Protein	11
	Rat Fibrosarcoma Protein	11
	Phosphatidylinositol 3-Kinase	12
1.2.3	Tumorprotein 53 und Zellzyklusregulation	12
	Tumorprotein 53	12
	p16 ^{INK4A}	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
	Patientenkollektiv	14
	Kits	14
	Reagenzien	15
	Gemischte Reagenzien und Puffer	15
	Antikörper und Hybridisierungssonden	16
	Geräte	17
	Verbrauchsmaterialien	18
	Computerprogramme	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Experimentelle Methoden	19
	DNA-Isolierung aus FFPE-Material	19
	RNA-Isolierung aus FFPE-Material	19
	cDNA Synthese	20
	Polymerase Chain Reaction	21
	Agarose-Gelelektrophorese	22
	Real-Time semiquantitative PCR	22
	High-Resolution Melting Analysis	24
	Immunhistochemie	26
	In-situ-Hybridisierung	27
2.2.1	Statistische Methoden	28
	Kreuz-Tabellen	28
	Kaplan-Meier Methode und Log-Rank Test	28

3.	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung der Kollektive	30
3.2	Auswertung der Sequenzanalysen	32
	KRAS	32
	BRAF	32
	EGFR	33
	PIK3CA	33
	TP53	33
3.3	Auswertung der semiquantitativen Real-Time PCR	35
3.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und ISH	37
	In-situ-Hybridisierung für EBV und HPV	37
	Immunhistochemie für p16 ^{INK4A}	38
	Immunhistochemie für p53	38
	Immunhistochemie für den EGFR	39
3.5	Statistische Auswertung	39
3.5.1	Kreuz-Tabellen	39
	EBV vs. Metastasenstatus bei SNSCC	40
	EBV vs. Rezidiv bei HNSCC	41
	HPV vs. T-Stadium bei HNSCC	41
	T-Stadium vs. Expression von EGFR und p53 bei SNSCC	42
3.5.2	Überlebenskurven	42
	Gesamtüberleben	42
	Rezidivfreies Überleben	45
	Metastasenfreies Überleben	46
4.	Diskussion	48
4.1	Kritische Beurteilung der Methoden	49
	Mutationsanalysen mittels High Resolution Melting Analysis	49
	Real-Time Polymerase Chain Reaction	49
	In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie	50
4.2	Mutationsanalysen und Überleben	51
	TP53	51
	EGFR	51
	KRAS	52
	BRAF	53
	PIK3CA	54
4.3	Expressionsmuster und T-Stadium	54
	p53 Expression	54
	EGFR Expression	55
4.4	Expressionsmuster und T-Stadium	56
	HPV	56
	EBV	57
5.	Zusammenfassung	57
6.	Anhang	59
6.1	Abbildungsverzeichnis	59
6.2	Tabellenverzeichnis	60
6.3	Literaturverzeichnis	61
6.4	Ergebnisübersicht	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT/PKB	Proteinkinase B
bp	Basenpaar
BRAF	Rat Fibrosarcoma Protein B
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cq	Pearson's Chi-Quadrat Test
dest.	destillata
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotid triphosphates
EBER	Epstein-Barr virus-encoded small RNAs
EBNA	EBV nuclear antigenes
EBV	Epstein-Barr Virus
ef	exakter Test nach Fisher
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
erbB/HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
FHIT	Fragile Histidin Triad Gene
Fwd	forward
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HNSCC	Head and neck squamous cell cancer
HPV	Humanes Papillomavirus
HRMA	High Resolution Melting Master
ISH	In-situ-Hybridisierung
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Protein

Kum.	kumuliert
LMP2A	Latent membrane protein 2A
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen/extracellular signal-regulated kinase
ml	Milliliter
mV	Millivolt
N	Anzahl
ND	Neck dissection
ng	Nanogramm
NHH	Nasenhaupthöhle
NK	Natural Killer
NNH	Nasennebenhöhle
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Inositol 1,4,5 Trisphosphat
pmol	Pikomol
RASSF1A	Ras Association Domain Family 1 A
Rb	Retinoblastomprotein
RCTx	Radiochemotherapie
Rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	Rates per minute
s.	siehe
Sek.	Sekunde
SNSCC	Sinonasal squamous cell cancer
Tab.	Tabelle
TP53	Tumorprotein 53
UICC	Union internationale contre le cancer
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs und der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen

Begriffserklärung

In der vorliegenden Arbeit werden Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Lokalisation im Kopf-Hals-Bereich gegenüber gestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden zwei Gruppen gebildet, die verschiedene Lokalisationen zusammenfassen. Unter dem Begriff Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell cancer, HNSCC) im eigentlichen Sinne werden Karzinome der Mundhöhle, des Larynx, des Hypo- und des Oropharynx zusammengefasst. Plattenepithelkarzinome der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen (sinonasal squamous cell cancer, SNSCC) umfassen Karzinome der Nasenhaupthöhle, der Kiefer-, Keilbein- und Stirnhöhlen, sowie der Siebbeinzellen.

Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ist weltweit der sechsthäufigste maligne Tumor und steht an achter Stelle im Hinblick auf tumorabhängige Todesursachen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren (Hunter et al. 2005, Ragin et al. 2007).

Malignome im Bereich der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen sind mit einer Inzidenz von unter 1/100000 Einwohnern deutlich seltener, wobei Plattenepithelkarzinome mit einem Anteil von 40-50% den vorwiegenden Typ dieser Lokalisation darstellen (Gotte and Hormann 2004).

Am häufigsten tritt HNSCC im Bereich der Mundhöhle auf, gefolgt von Larynx und Pharynx. Es bestehen geschlechtsspezifische (Männer sind fünf Mal häufiger betroffen) sowie regional deutliche Unterschiede in der Verteilung (Mast 2009). Im Bereich der Nase treten Karzinome am häufigsten in der Kieferhöhle mit 50-70% auf. Am zweithäufigsten finden sie sich im Bereich der Nasenhaupthöhle und des Siebbeins. Auch hier liegt die Inzidenz mit einem Geschlechterverhältnis von 2:1 für Männer etwas höher als die für Frauen, wobei dies sich mit zunehmendem Erkrankungsalter angleicht (Gotte and Hormann 2004).

Klassifikation

Die TNM-Klassifikation maligner Tumoren dient der Einteilung hinsichtlich der Ausdehnung des Primarius als T, des Befalls regionaler Lymphknoten als N und des Vorhandenseins von Fernmetastasen als M. Zusätzlich kann das histopathologische Grading, also die Malignität, durch G differenziert und das Ausmaß eines Residualtumors nach Therapie durch R vermerkt werden.

Das Suffix „c“ steht für die klinische, das Suffix „p“ für die histologisch gesicherte Beurteilung. Bei Kopf-Hals-Tumoren unterscheidet sich das T-Stadium je nach Lokalisation. Das N-Stadium ist für alle Tumorlokalisationen außer dem Nasopharynxkarzinom gleich und bezieht sich auf Metastasierung in die regionären Halslymphknoten. M-Stadium, R- und G-Faktor beziehen sich auf alle Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereichs. In Tab. 1 ist die aktuell gültige TNM-Klassifikation aufgeführt (Sobin et al. 2011).

pT-Stadium	
pTX	Keine histologische Beurteilung des Primärtumors möglich
pT0	Kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors

pN-Stadium	
pNX	Keine histologische Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, ≤ 3 cm
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, > 3 cm < 6 cm
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
pN3	Metastasen > 6 cm

pM-Stadium	
pMX	Keine histologische Beurteilung der Fernmetastasen möglich
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase(n)

R-Stadium	
RX	Keine Beurteilung des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch nachweisbarer Residualtumor

Grading	
GX	Kein Grading der Differenzierung möglich
G1	Hoch differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Niedrig differenziert
G4	Entdifferenziert

Tab. 1: TNM-Klassifikation (Sobin et al. 2011)

Die Stadieneinteilung der UICC für Kopf-Hals-Malignome ist für alle Lokalisationen außer dem Nasopharynx und der Schilddrüse gleichermaßen anzuwenden. Sie wird in Tab. 2 dargestellt.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2, T3	N1	M0
	T3	N0	M0
IV a	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
	T4a	N0, N1	M0
IV b	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IV c	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 2: Stadieneinteilung der HNSCC (Sobin et al. 2011)

Ätiologie

Für HNSCC gibt es seit längerem bekannte Risikofaktoren, zu denen Alkohol- und Tabakabusus gehören, aber auch die Infektion mit viralen Onkogenen.

Für starke Raucher ist das Risiko, ein Plattenepithelkarzinom zu entwickeln, 20-fach erhöht gegenüber der Normalbevölkerung, für Trinker 5-fach. Bei einer Kombination

aus starkem Rauchen und hohem Alkoholkonsum erhöht sich das Risiko sogar auf den Faktor 50 (Hunter et al. 2005).

Das humane Papillomavirus (HPV) kann durch seine Onkoproteine E6 und E7 zur Tumorentstehung beizutragen. Der Nachweis von HPV konnte vor allem in oralen und oropharyngealen Tumoren erbracht werden (Lajer and von Buchwald 2010).

Das Epstein-Barr Virus (EBV) hat ebenfalls onkogenes Potential. In Nasopharynxkarzinomen lässt sich häufig aktiviertes Virusgenom nachweisen (Strutz and Mann 2009).

Die Risikofaktoren im Bereich der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen unterscheiden sich leicht von denen des HNSCC. Beim Plattenepithelkarzinom spielen vor allem berufliche Noxen in der Textil- und Lebensmittelindustrie sowie auf Obstplantagen eine große Rolle. Die genauen Toxine sind allerdings bisher noch schlecht untersucht. Rauchen ist, wie auch bei HNSCC, ein gesicherter Risikofaktor und wird mit einer 2- bis 3-fachen Risikoerhöhung angegeben (Gotte and Hormann 2004). Beim besser untersuchten Adenokarzinom konnte in den 80er Jahren eine deutliche Risikoerhöhung durch Holzstaub ermittelt werden, wobei für die Entwicklung eines SNSCC die Arbeit in der Holzindustrie kein erhöhtes Risiko darstellte (Gordon et al. 1998). Seit 1989 stellt das Adenokarzinom der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen eine anerkannte Berufskrankheit mit der Nummer 4203 dar (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin).

Für die oben genannten Viren ist die Datenlage vergleichsweise schlecht und es konnte bisher lediglich für einen sehr geringen Teil der SNSCC eine Assoziation zu Viren gezeigt werden. EBV war hierbei meist mit undifferenzierten Karzinomen assoziiert und fand sich vor allem in Studien bei asiatischen Patienten (Gotte and Hormann 2004).

Pathologie

Das Plattenepithelkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor, der eine plattenepitheliale Differenzierung aufweist und mit oder ohne Verhornung auftreten kann. Die makroskopisch erkennbare Wuchsform ist meist endophytisch, knotig und oberflächlich ulzerierend. Selten kann ein Plattenepithelkarzinom auch exophytisch-papillär wachsen (Böcker and Heitz 2008).

Mikroskopisch kann man ein invasives Wachstum mit Durchbrechung der Basalmembran, Bildung von Tumorinseln und Strängen beobachten. Die epitheliale Differenzierung äußert sich in der Ausbildung von Interzellularbrücken und Hornperlen. Zellmorphologische Veränderungen sind umso ausgeprägter, je weniger differenziert der Tumor ist. Hier finden sich Zellkernpleomorphien und verstärkte mitotische Aktivität mit atypischen Mitosen (Cardesa and Slootweg 2006).

Molekularpathologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs können zunächst grob in HPV-positiv und HPV-negativ eingeteilt werden, da sich durch die Infektion mit dem Virus die molekulare Pathogenese unterscheidet (Leemans et al. 2011).

Bei der klassischen Form, dem HPV-negativen HNSCC, wird angenommen, dass durch Deletion, Punktmutation, Promotermethylierung und Genamplifikation Tumorsuppressorgene inaktiviert und Protoonkogene aktiviert werden. Am häufigsten hiervon betroffen sind p16^{INK4A} und p14^{ARF}, das Tumorprotein 53 (TP 53), Cyclin D1, das Fragile Histidine Triad Gene (FHIT), Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), und der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (Campo-Trapero et al. 2008).

Einer großen Metaanalyse zufolge sind 25,9% der HNSCC HPV-positiv, wobei Karzinome im Oropharynx mit 35,6% die höchste HPV-Prävalenz aufwiesen. HPV 16 lag hier in der Mehrzahl der Fälle vor (Kreimer et al. 2005).

In HPV-positiven Karzinomen wurde die Beobachtung gemacht, dass TP53 meist als Wildtyp vorliegt. Jedoch wird auch hier die Aktivität von p53 vermindert, da das virale Protein E6 p53 inaktiviert (Leemans et al. 2011).

Der EGFR ist mit einer Häufigkeit von 80-100% in HNSCC überexprimiert, allerdings gibt es regionale Unterschiede. So ist die Expression in Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx deutlich höher, als in Larynxkarzinomen (Stadler et al. 2008). Mutationen des EGFR fanden sich bei einer Studie an einem HNSCC Kollektiv in 42% der Fälle. Hierbei handelte es sich um die EGFR vIII Variante, eine Splicevariante des Rezeptors, die ausschließlich in Tumorgewebe vorkommt (Sok et al. 2006, Stadler et al. 2008). Andere Mutationen wie zum Beispiel in der Kinasedomäne des EGFR sind äußerst selten (Lee et al. 2005, Sok et al. 2006).

Weitere Proteine des EGFR-Signalwegs sind weniger häufig von Mutationen betroffen. Eine Studie konnte in 11% eine Mutation in der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) feststellen, eine weitere in 3% eine Rat Fibrosarcoma Protein B (BRAF) Genmutation und in 6% eine Kirsten Rat Sarcoma Protein (KRAS) Genmutation (Weber et al. 2003, Qiu et al. 2006).

Die Datenlage zur Karzinogenese des SNSCC ist vergleichsweise schlecht und es bedarf noch intensiver Forschung (Gotte and Hormann 2004). Es gibt jedoch einzelne Studien mit Hinweisen auf eine unter anderem durch HPV vermittelte Tumorentstehung und eine weitere Studie, bei der eine TP53 Mutation in Ratten festgestellt wurde, bei denen zuvor mit Formaldehyd ein Plattenepithelkarzinom ausgelöst wurde. Auch wurde in einer größeren Studie eine TP53 Mutationsrate von 73% in menschlichen SNSCC ermittelt (Recio et al. 1992, Hoffmann et al. 2006, Holmila et al. 2010).

Therapie

Als Therapieoptionen stehen die chirurgische Resektion, eine Strahlentherapie, Chemotherapie und Target-Therapeutika zur Verfügung.

Nach Möglichkeit sollte der Tumor chirurgisch entfernt werden. Die wichtigste Aufgabe bei der chirurgischen Tumorentfernung ist die R0-Resektion, die über einen intraoperativen histologischen Schnellschnitt gesichert wird. Allerdings ist im Kopf-Hals-Bereich gleichzeitig die Erhaltung einer gewissen Funktionalität und der Versuch einer angemessenen ästhetischen Rekonstruktion von großer Wichtigkeit für die Lebensqualität des Patienten und muss daher genauso beachtet werden (Mast 2009). Die chirurgische Therapie bei Karzinomen der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen ist wegen der engen anatomischen Beziehungen zu Nachbarstrukturen schwieriger und bietet bei ausgedehnten Tumoren Probleme. Bei kleineren Tumoren wird meist endoskopisch operiert, bei ausgedehnten kann jedoch eine totale Ablatio nasi und bei Einbruch des Tumors in die Augenhöhle sogar eine Exenteratio orbitae notwendig sein. 62% der Rezidive treten im ersten Jahr auf und könnten bei bereits erfolgter Rekonstruktion übersehen werden. Daher wird eine definitive ästhetische Versorgung des Defekts frühestens 12 Monate nach der Tumorentfernung angeschlossen und die Patienten in der Zwischenzeit mit einer Epithese versorgt (Pickhard et al. 2012).

Eine Neck Dissection (ND), ob prophylaktisch oder therapeutisch, wird bei den meisten HNSCC durchgeführt. SNSCC weisen in nur 12% Lymphknotenmetastasen bei Erstvorstellung auf, die zudem nicht ausschließlich in den zervikalen, sondern auch in den prävertebralen und retropharyngealen Lymphknoten auftreten können, weshalb von einer ND eher abgesehen wird (Gotte and Hormann 2004, Porceddu et al. 2004, Khademi et al. 2009, Mast 2009).

Die Strahlentherapie kann als primäre, adjuvante oder neoadjuvante (nur im Rahmen von Studien) Therapie durchgeführt werden und ist abhängig von der Lokalisation und dem Stadium des Primarius. Eine alleinige primäre Radiotherapie wird zum einen als palliative Therapie bei zu weit fortgeschrittenen Tumoren oder als kurativer Versuch bei Tumoren alter Menschen und glottischen Karzinomen des Stadiums T1 angewendet. Ansonsten erfolgt eine primäre Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie. Eine adjuvante Strahlentherapie wird bei lokal fortgeschrittenen Tumoren und/oder dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen empfohlen. Eine adjuvante Radiochemotherapie sollte bei einem R1 Status oder extrakapsulärem Wachstum der Lymphknotenmetastasen (ECE positiv) an eine chirurgische Therapie angeschlossen werden (Mast 2009). In Anlehnung an das HNSCC gelten diese Empfehlungen auch für das SNSCC (Pickhard et al. 2012).

Die dritte Therapiemodalität ist die Chemotherapie. Diese spielt als alleinige Therapie nur in der Palliation eine Rolle, wobei die Ansprechraten relativ schlecht sind (Bernier et al. 2004, Mast 2009). Eine ähnlich untergeordnete Rolle spielt die Chemotherapie als alleiniges Therapieregime auch beim SNSCC (Pickhard et al. 2012).

Seit ein paar Jahren ist der monoklonale Antikörper Cetuximab als Therapeutikum bei der palliativen Therapie von HNSCC zugelassen. Eine Wirksamkeit wurde hierbei in Studien wie beispielsweise der EXTREME Studie aufgezeigt, in der bei fortgeschrittenen Stadien eine kombinierte Gabe von platinhaltigen Chemotherapieregimen und Cetuximab getestet wurde und ein Überlebensvorteil festgestellt werden konnte (Licitra et al. 2013). Cetuximab richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR und blockiert dadurch dessen Ligandenbindung. Dies führt zu einer Internalisierung und Degradierung des Rezeptors, was eine Herunterregulierung der Expression des EGFR zur Folge hat (Zhang et al. 2009).

Allerdings waren die Ergebnisse in Folgestudien und in der klinischen Anwendung eher ernüchternd und so hat sich gezeigt, dass viele Patienten nicht auf die Gabe

des Antikörpers ansprechen. Zwar wurde in einer Reihe von Studien gezeigt, dass der EGFR in HNSCC überexprimiert ist, was Voraussetzung für ein Ansprechen auf Cetuximab ist (Stadler et al. 2008), jedoch scheinen ebenfalls molekulare Veränderungen des EGFR und seiner downstream Signalkaskade bei einer größeren Gruppe von Patienten vorzukommen, was eine Erklärung für das schlechte Ansprechen sein kann (Cooper and Cohen 2009). Bis jetzt existieren keine molekularen Marker, die ein Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie voraussagen können. Es zeigte sich lediglich, dass ein möglicher Marker für das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie eine stärker ausgeprägte Hautreaktion sein könnte (Cunningham et al. 2004).

Prognose

Die Prognose der Kopf-Hals-Karzinome richtet sich vor allem nach dem TNM-Stadium, wobei der wichtigste prognostische Faktor das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ist. Weitere Faktoren sind die Lokalisation, Ausbreitung, Angioinvasion, das Grading, der Resektionsstatus und eine eventuelle Tumorphoxie (Mast 2009).

Bei SNSCC ist vor allem die Lokalisation von prognostischer Relevanz. So haben Patienten mit einem Primarius in der Nasenhaupthöhle eine bessere Prognose als solche mit Karzinomen in Kieferhöhle und Siebbeinzellen (Gotte and Hormann 2004). Bei HNSCC haben Karzinome der Lippe und des Larynx die beste Prognose, die des Hypopharynx die schlechteste (Mast 2009).

1.2 Molekulare Grundlagen

1.2.1 Viral vermittelte Tumorentstehung

Humanes Papillomavirus

Das humane Papillomavirus (HPV) ist ein DNA-Virus mit über 60 bisher entdeckten Typen. Es verursacht Hautwarzen (*Verrucae vulgares*) und ist stark mit Tumoren der Cervix uteri assoziiert (in mehr als 95% der Fälle nachweisbar). Hier spielen vor allem die sogenannten high risk Typen HPV 16, 18, 31 und 33 eine Rolle. Für diese konnte gezeigt werden, dass die viralen Onkoproteine E6 und E7 in der Lage sind epitheliale Zellen zu transformieren. E6 führt zu einer Inaktivierung von p53, E7 durch eine Überexpression von p16^{INK4A} zu einer Inaktivierung des Retinoblastomproteins

(Rb). Dadurch wird zum einen die DNA-Reparatur und die Möglichkeit des Zellzyklusarrests ausgeschaltet und zum anderen die mitotische Aktivität gefördert (Kreimer et al. 2005, Böcker and Heitz 2008).

Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ebenfalls ein DNA-Virus. Es wird als B-lymphotrop bezeichnet, da es meistens B-Lymphozyten durch Bindung an deren CD21-Rezeptor infiziert. Es sind allerdings auch Infektionen von Epithelzellen beschrieben worden, wobei der Mechanismus hierbei noch weitestgehend unverstanden ist.

Die Primärinfektion verläuft meistens asymptomatisch, und das Virus persistiert ein Leben lang in den B-Zellen (90% Durchseuchung). Bei einer späten Primärinfektion im Jugendalter kann es zur infektiösen Mononukleose kommen (Young and Rickinson 2004, Böcker and Heitz 2008).

In infizierten B-Zellen werden einige virale Proteine konstitutiv exprimiert, wie z.B. EBV nuclear antigens (EBNA), die sowohl die zelluläre als auch die virale Transkription beeinflussen.

Die latente EBV-Infektion kann bei Verlust der Immunkontrolle durch Veränderungen auf epigenetischer Ebene zu einer Reihe von malignen Transformationen führen. Bisher konnte eine solche Assoziation bei einigen Lymphomen, dem Nasopharynxkarzinom, Leiomyosarkomen und dem Adenokarzinom des Magens gezeigt werden (Young and Rickinson 2004, Kaneda et al. 2012).

1.2.2 Tyrosinkinasen und nachfolgende Signaltransduktion

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Der EGFR gehört zur Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne. Das Gen liegt auf dem Chromosomenort 7p12 und das Protein hat eine molekulare Masse von 134 kDa. Die Familie der EGF-Rezeptoren besteht aus vier verschiedenen Proteinen: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER 3) und ErbB4 (HER4). Bei Bindung eines Liganden an die Ektodomänen zweier EGFR-Proteine homo- oder heterodimerisieren diese, was zu einer Transphosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste führt. Dadurch werden katalytisch aktive Zentren der Rezeptoren freigelegt und können so eine Reihe von downstream Signalwegen aktivieren.

Von diesen zahlreichen Signalwegen wird in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf den PI3K-Protein Kinase B (AKT)-Signalweg und auf die RAS-RAF-Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)-Kaskade gelegt (Abb. 1).

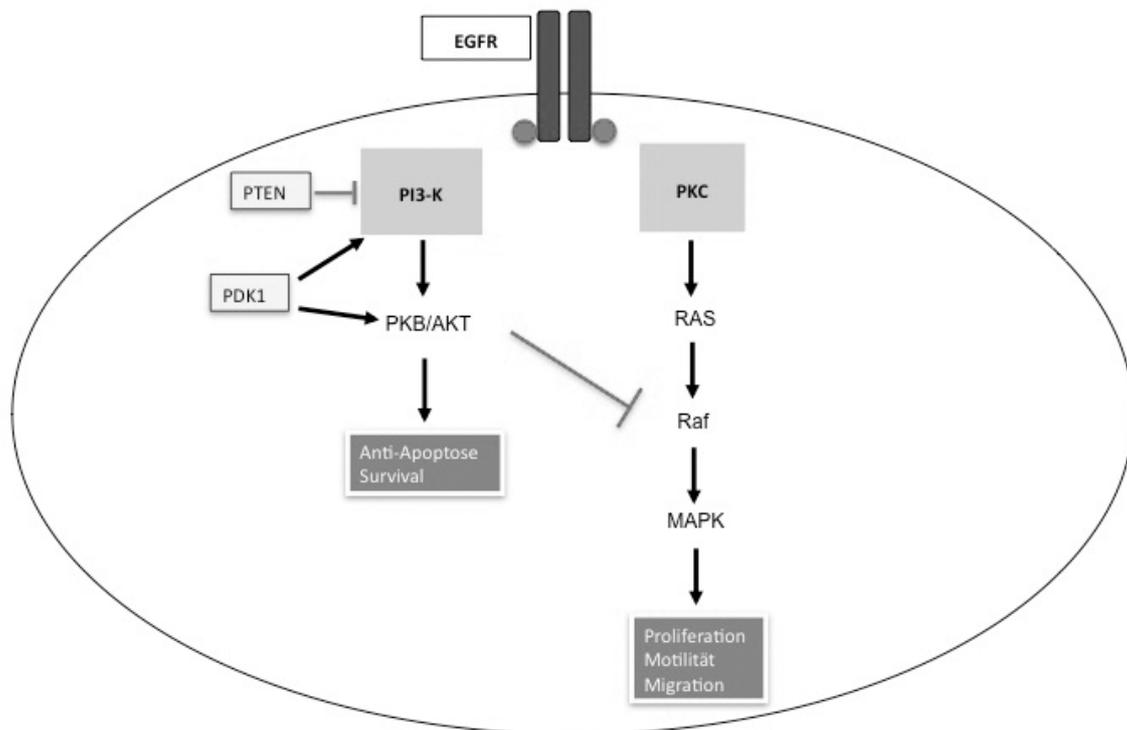


Abb. 1: Schematische Darstellung des EGFR Signalwegs

Die Signalwege führen zu einer Änderung der Transkription im Zellkern und beeinflussen so zentrale biologische Vorgänge wie Migration, Überleben, Wachstum, Zellgröße und Differenzierung (Yarden and Sliwkowski 2001, Weinberg 2007, Safran et al. 2010).

Die Regulierung durch Liganden kann durch Deletionsmutationen der extrazellulären Domäne außer Kraft gesetzt werden. Die häufigste dabei entstehende Variante des EGFR ist die EGFR vIII Variante, bei der die Exons 2-7 nicht transkribiert werden. Dies erfolgt meistens durch ein genetisches Rearrangement, seltener durch eine alternative Splicevariante der mRNA. Durch das Fehlen der Ektodomäne ist die Tyrosinkinasedomäne konstitutiv aktiviert, was zu einer ligandenunabhängigen Proliferationsteigerung führt (Voldborg et al. 1997).

Weitere Mutationen konnten in einigen Studien im Exon 19 bei HNSCC gefunden werden (Lee et al. 2005, Smilek et al. 2012).

Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) Protein

RAS ist ein G Protein, das eine zentrale Rolle im downstream Signalweg des EGFR spielt. Die menschliche DNA kodiert für drei verschiedenen RAS-Proteine: NRAS, KRAS und HRAS, wobei ihre Struktur und Funktion fast identisch ist. Das Gen für KRAS liegt auf 12p12.1 und das Protein ist 21 kDa schwer.

Wie alle G Proteine wird RAS durch den Austausch eines GDP in ein GTP aktiviert und durch GTP Hydrolyse wieder inaktiviert. In seinem aktiven Zustand sendet es über noch unbekannte Signalmoleküle stimulierende Impulse unter anderem an die PI3K und das Protein RAF (Lowy and Willumsen 1993, Weinberg 2007, Safran et al. 2010).

Mutationen, die zur konstitutiven Aktivierung von RAS führen, finden sich vor allem bei KRAS in den Codons 12, 13 (Exon 2) und 61 (Exon 3). Dadurch wird dem Protein die Möglichkeit zur Bindung GTPase-aktivierender Proteine genommen und RAS wird bei einmaliger Bindung von GTP konstitutiv aktiviert (Ellis and Clark 2000, Weinberg 2007).

Rat Fibrosarcoma (RAF) Protein

RAF ist eine Proteinkinase, die in drei Isoformen vorkommt: ARAF, BRAF und CRAF. BRAF liegt auf dem Chromosomenort 7q34 und ist eine 94 kDa große Kinase. Das Protein befindet sich in inaktiviertem Zustand im Zytosol und wird aktiviert, indem es an RAS gebunden wird. Alle drei Formen phosphorylieren in aktiver Konstitution die Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase (MEK), eine weitere Kinase der sogenannten MAPK Signalkaskade (Weber et al. 2003, Weinberg 2007, Safran et al. 2010).

In menschlichen Tumoren kommt in ca. 8% eine Mutation in BRAF vor. Hier wird meist im Codon 599 (Exon 15) Valin gegen Glutamat ausgetauscht, was unabhängig von einer Bindung an RAS zu einer deutlichen Kinaseaktivitätssteigerung und damit zu einer Aktivierung der MAPK Kaskade führt (Davies et al. 2002, Weber et al. 2003).

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)

Die PI3K ist eine Lipidkinase, die aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht. Das Gen für die katalytische Untereinheit ist auf Chromosom 3q26.32 lokalisiert. Die Aktivierung erfolgt entweder direkt durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (siehe S. 10) oder über das RAS-Protein. Nach Aktivierung phosphoryliert die PI3K das Phospholipid Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) zum second messenger Inositol 1,4,5 Trisphosphat (PIP₃). Dieses Molekül kann wiederum AKT aktivieren, was antiapoptotisch wirkt und Zellwachstum und Proliferation stimuliert (Vivanco and Sawyers 2002, Qiu et al. 2006, Weinberg 2007). Somatische Mutationen in Tumoren sind häufig und finden sich ausschließlich in der katalytischen Untereinheit p110 α (PIK3CA). Dort liegt die Mutation mit einer Häufigkeit von über 75% im Bereich der helikalen (Exon 9) oder der Kinasedomäne (Exon 20). Durch diese Änderungen verstärken sich die durch AKT vermittelten Effekte (Samuels et al. 2004, Qiu et al. 2006).

1.2.3 Tumorprotein 53 und Zellzyklusregulierung

Tumorprotein 53 (TP53)

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist auf dem Chromosomenort 17p13 lokalisiert und kodiert für den Transkriptionsfaktor p53, der eine Masse von 43 kDa besitzt. Er hat eine sehr kurze Lebensdauer von ungefähr 20 Minuten. Bei einem DNA-Schaden in der Zelle wird p53 hochreguliert und kann so einen G1-Arrest, Aktivierung von Reparaturmechanismen oder, wenn der Schaden zu groß ist, Induktion von Apoptose bewirken (Böcker and Heitz 2008, Safran et al. 2010).

In über 50% menschlicher Tumore findet sich eine Missense Mutation in einem Allel, was zu einem fehlerhaften Protein führt, welches in hohen Konzentrationen in den Tumorzellen exprimiert wird. Die häufigsten Mutationen beeinträchtigen hierbei die Fähigkeit von p53, an die DNA zu binden, wodurch die Tumorsuppressorfunktionen des Proteins nicht mehr ausgeführt werden können (Levine 1997). In HNSCC finden sich Mutationen von TP53 in 60-80% der Fälle (Leemans et al. 2011).

p16^{INK4A}

p16^{INK4A} gehört zur Gruppe der Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitoren und wird von CDKN2A auf Chromosom 9p21 kodiert. Das Protein hemmt die Aktivität von CDK 4 und CDK 6, die für die Regulation der G₁ Phase bis zum R-Punkt des Zellzyklus verantwortlich sind. Bei hohen Levels von p16^{INK4A} kommt es zum G₁ Arrest. Bei homozygoter Deletion, Promotermethylierung oder seltener Punktmutation des kodierenden Gens kommt es zu einer Enthemmung des Zellzyklus. Diese Inaktivierung von p16^{INK4A} findet sich in 80% der HNSCC (Levine 1997, Perez-Ordonez et al. 2006, Weinberg 2007).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Da es sich bei SNSCC bekanntlich um einen selteneren Tumor handelt, gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit dieser Entität beschäftigen. Die meisten Publikationen, die sich mit Malignomen der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen beschäftigen, differenzieren nicht nach histologischen Subtypen. Daher gibt es auch keine eindeutigen Therapieempfehlungen. Vor allem die Frage nach einer Neck Dissection bei SNSCC ist nicht abschließend geklärt und es gibt sehr unterschiedliche Ansichten über das Für und Wider. Im Gegensatz dazu sind die Richtlinien für eine Neck Dissection bei HNSCC eindeutiger, und so gibt es bestimmte Lokalisationen des Primarius, bei denen eine prophylaktische Neck Dissection standardmäßig durchgeführt wird.

Auch auf molekularer Ebene sind SNSCC bisher schlechter untersucht worden als HNSCC. So gibt es für HNSCC eindeutige Nachweise, dass bestimmte Mutationen zur Tumorprogression führen. Ebenso wurde der Einfluss von HPV und EBV auf die Karzinogenese von HNSCC in den letzten Jahren mit steigendem Interesse untersucht, während hier die Datenlage für SNSCC wiederum vergleichsweise schlecht ist.

Ziel der Arbeit war es daher, SNSCC mit HNSCC zu vergleichen. Ein Fokus wurde dabei auf das genetische Profil gelegt um herauszufinden, ob es sich bei den beiden Kollektiven um verschiedene Tumorentitäten handelt. Zudem wurde die Rolle von HPV und EBV vor allem hinsichtlich der Entstehung von Metastasen untersucht, um eine mögliche Empfehlung für eine Neck Dissection bei SNSCC ableiten zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Patientenkollektive untersucht und miteinander verglichen. Die Unterscheidungsmerkmale, die der Kollektivauswahl zugrunde liegen, sind in Tab. 3 aufgeschlüsselt.

Kollektiv	Tumorlokalisation	Therapie	Herkunft	Anzahl
HNSCC	Mundhöhle, Pharynx und Larynx	Primäre Operation	(Steuer-Vogt et al. 2001)	65
SNSCC	Nasenhaupt- und Nasen-nebenhöhlen	Primäre Operation/primäre RCTx	HNO-Klinik des Klinikums rechts der Isar	44

Tab. 3: Verwendete Patientenkollektive

Kits

In Tab. 4 sind die in der Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Kit	Hersteller
InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit	Stratec Molecular GmbH, Berlin
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TaqDNAPolymerase Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Bond Polymer Refine Detection Kit	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Tab. 4: Verwendete Kits

Reagenzien

Tab. 5 enthält alle verwendeten Reagenzien und Enzyme.

Reagenzien und Enzyme	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Proteinase K • Tissue Lysis Buffer • DNase • 10x Hexanucleotid Mix 	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<ul style="list-style-type: none"> • Tween 20 • Sodiumdodecylsulfat (SDS) • Ethanol • Xylol • Dimethylsulfoxid (DMSO) 	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<ul style="list-style-type: none"> • Maxima® reverse Transkriptase • 5x Reaction Buffer • φx 174 DNA / BsuRI (Haq III) 9 	Fermentas / Thermo Scientific, Waltham
10x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	life technologies AG, Carlsbad
FluoDNA Gel Stain	PromoCell GmbH, Heidelberg
DNA Polymerization Mix dNTP Set (20 mM each A,C,G,T)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
aqua ad iniectabilia	Diaco S.p.A., Triest
<ul style="list-style-type: none"> • Bond Wash Solution 10x • Bond Dewax Solution • Bond Epitope Retrieval Solution 1 • Bond Epitope Retrieval Solution 2 	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Tab. 5: Verwendete Reagenzien und Enzyme

Gemischte Reagenzien und Puffer

In Tab. 6 sind die in der Arbeit zum Einsatz gekommenen selbst hergestellten Reagenzien zu finden.

Reagenzien und Puffer	Rezept
1x TBE	100ml 10x TBE ad 900ml H ₂ O bidest.
10% SDS	10g Sodiumdodecylsulfat ad 100ml H ₂ O bidest.
10% Tween 20	100ml Tween ad 900ml H ₂ O bidest.

Tab. 6: Gemischte Reagenzien und Puffer

Antikörper und Hybridisierungssonden

In Tab. 7 sind die in der Immunhistochemie zum Einsatz gekommenen Antikörper und die für die In-situ-Hybridisierung verwendeten DNA/RNA-Sonden aufgelistet.

Name	Klon	+ Kontrolle	Firma	Verdünnung
mAK Maus-Anti-p53	DO-7	Colon CA	Dako GmbH, Hamburg	1:200
pAK Kaninchen-Anti-EGFR	1005	Mamma CA	Santa Cruz Biotechnology	1:200
mAK Maus-Anti-CIN-p16 ^{INK4A}	INK4A	Zervix CA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	ready
<ul style="list-style-type: none"> • EBER Probe • HPV (Subtypes 16, 18, 31, 33, 51) Probe 			Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	

Tab. 7: Antikörper, Hybridisierungssonden mit Positivkontrolle

Geräte

In Tab. 8 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Geräte	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Thermomixer comfort • Centrifuge 5415 D • Research Pipetten 1000 μl, 200 μl, 100 μl, 20 μl, 10 μl 	Eppendorf AG, Hamburg
<ul style="list-style-type: none"> • MS2 Minishaker • Magnetrührer RCT basic 	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipetman® 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l	Gilson, Inc., Middleton
<ul style="list-style-type: none"> • Petteq® 1000 μl, 200 μl, 100 μl, 20 μl, 10 μl • Electrophoresis Power Supply EV265 • E-Box VX2 • NanoDrop 1000 	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Techne Dri-Block DB-2A	Bibby Scientific Ltd., Staffordshire
LightCycler® 480 II System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Basic Elektrowaage BA 1105	Sartorius AG, Göttingen
<ul style="list-style-type: none"> • Paraffin-Streckbad TFB35 • Kühlplatte 	Medite GmbH, Burgdorf
Mikrotom Microm HM355S	Thermo Scientific, Waltham
<ul style="list-style-type: none"> • Bond-Max Färbeautomat 	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<ul style="list-style-type: none"> • Cleanbanc: HeraSafe KS • Inkubator: HeraCell 150i 	Thermo Scientific, Waltham
Accujet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
DNA Engine	Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules

Tab. 8: Verwendete Geräte

Verbrauchsmaterialien

In nachfolgender Tabelle sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Produkt	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Pipetten-Spitzen ART® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl Objektträger Superfrost Plus Deckgläser 24x60 mm 	Thermo Scientific, Waltham
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<ul style="list-style-type: none"> Tubes 15 ml, 50 ml SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml, 0,5 ml Tissue Culture Dish 100x20 mm Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml 	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<ul style="list-style-type: none"> Pasteurpipetten 	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Computerprogramme

In Tab. 10 sind die verwendeten Computerprogramme zu finden.

Programm	Firma
<ul style="list-style-type: none"> Microsoft® Word 14.2.3 Microsoft® Excel 14.2.3 	Microsoft Corporation, Redmond
LightCycler® 480 Software, release 1.5.0 SP4	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SnapGene® Version 1.3.3	GSL Biotech LLC, Chicago
SPSS Statistics Version 22	IBM Corporation,

Tab. 10: Computerprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 Experimentelle Methoden

DNA-Isolierung aus FFPE-Material

Um Mutationsanalysen durchführen zu können, musste aus den Patientenproben DNA isoliert werden. Zunächst wurden je nach Menge des Materials 3-5 Schnitte à 10 μm von den Blöcken angefertigt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde 1 ml Xylol zugegeben und die Probe homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde 250 μl 70%iges Ethanol hinzugegeben, die Probe erneut homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Nun wurde das Pellet ca. 1 Stunde bei 55°C im Heizblock getrocknet und anschließend in 200-600 μl 1x PK-Puffer und 0,1% Tween-20 resuspendiert. Dabei wurde das Pellet mit einer Pipetten-Spitze mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von 50 μl Proteinase K wurde die Probe über Nacht bei 55°C und einer Schüttelfrequenz von 550 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Nachverdau unter Zugabe von 10 μl Proteinase K durchgeführt und das Enzym durch Kochen für 10 Minuten bei 95°C inaktiviert. Die Stammlösung wurde auf 20 ng/ μl verdünnt und bei 4°C gelagert.

RNA-Isolierung aus FFPE-Material

Zur semiquantitativen Bestimmung der Variante VIII des EGF-Rezeptor-Gens musste aus den Patientenproben RNA isoliert werden. Zunächst wurden je nach Menge des Materials 3-5 Schnitte à 10 μm von den Blöcken angefertigt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 800 μl Xylol und 400 μl Ethanol hinzu pipettiert und homogenisiert. Die Probe wurde für 4 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml Ethanol resuspendiert. Nach erneutem Homogenisieren und Zentrifugieren wurde das Pellet bei 55°C getrocknet. Dann wurde ein Verdau über Nacht mit 40 μl Proteinase K angesetzt, als Puffer wurden 100 μl Tissue Lysis Buffer und 16 μl 10% SDS verwendet. Am folgenden Tag wurde ein Nachverdau unter erneuter Zugabe von 10 μl Proteinase K durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde die Probe unter Zugabe von 600 μl Lysis Solution TR (vorher im Verhältnis 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt) aufgereinigt. Ein Pellet wurde bei 13000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert und 500 μl des RNA-enthaltenden Überstands in ein 2 ml Receiver Tube überführt. Dazu wurden 330 μl Ethanol gegeben. Nun wurde das Lysat komplett auf ein RTA Spin Filter Set pipettiert, für 1

Minute inkubiert und bei 10500 rpm für 1 Minute abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf die Säule wurden dann 500 μ l Wash Buffer R1 gegeben und für 30 Sekunden bei 10500 rpm abzentrifugiert. Das Receiver Tube wurde verworfen und der Filter auf ein neues gesetzt. Nach diesem ersten Waschschrift wurde die Probe von DNA gereinigt. Dazu wurden zunächst 600 μ l Wash Buffer R2 auf die Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 10500 rpm abzentrifugiert. Dann wurde ein Mastermix aus 1:10 DNase und DNase Incubation Buffer direkt auf den Filter gegeben und die Probe für 10 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurde die Säule zweimal mit 600 μ l Wash Buffer R2 gewaschen und der Spin Filter für 5 Minuten bei 12000 rpm getrocknet. Im letzten Schritt wurde der Filter auf ein RNase-freies Reaktionsgefäß gesetzt, mit 30-60 μ l (je nach Gewebegehalt) Elution Buffer R versetzt, für 2 Minuten inkubiert und für 1 Minute bei 10500 rpm abzentrifugiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

cDNA Synthese

Mit der reversen Transkriptase „Maxima“ von Fermentas wurde aus der vorher isolierten RNA cDNA synthetisiert. Zunächst wurde auf Eis folgender Mastermix erstellt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x Hexamere	1 μ l	0,5x
10 mM dNTPs	1 μ l	0,5 mM
5x Reaktionspuffer	4 μ l	0,25x
200 units/ μ l Maxima RT	1 μ l	200 units

Tab. 11: Reagenzien cDNA Synthese

Dazu wurden 250 ng RNA pipettiert und das Volumen mit aqua dest. auf insgesamt 20 μ l aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde dann im Thermomixer für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch 5-minütiges Kochen bei 85°C beendet und die cDNA bei -20°C gelagert.

Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine relativ einfache Methode, um einen bestimmten Abschnitt DNA außerhalb lebender Zellen zu amplifizieren und wurde 1985 erstmals beschrieben (Saiki et al. 1985).

Für eine PCR braucht man zunächst zwei Oligonucleotidprimer, eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq Polymerase) und eine geringe Menge Ausgangs-DNA.

Die Reaktion besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung bei 95°C
- Annealing bei ungefähr 55°C
- Elongation bei 72°C

Im Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge aufgetrennt, an die sich während des Annealings die Primer anlagern können. Im dritten Schritt werden dann, von den Primern ausgehend, komplementäre Basen aufgefüllt. Diese Schritte werden so oft wiederholt, bis man die gewünschte Menge Fragmente gewonnen hat.

In vorliegender Arbeit wurde die PCR genutzt, um von verdächtigen Fällen im Exon 9 der PIK3CA und im Exon 3 von KRAS sequenzierbare Produkte herzustellen.

Dazu wurde folgender Mastermix angesetzt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer S	5 μ l	1x
5x Enhancer P	10 μ l	1x
20 pmol Primer forward	1 μ l	0,4 pmol
20 pmol Primer reverse	1 μ l	0,4 pmol
10mM dNTPs	1 μ l	0,2 mM
5 units/ μ l Taq Polymerase	0,5 μ l	2,5 units
Aqua dest.	21,5 μ l	-

Tab. 12: Reagenzien PCR

Zum vorgelegten Mastermix wurden 10 μ l DNA-template pipettiert.

Das PCR-Programm wurde wie folgt eingestellt:

- | | |
|--------------------------------|-------------|
| 1. 95°C | 5 Minuten |
| 2. 95°C | 20 Sekunden |
| 3. 60°C (PIK3CA) / 62°C (KRAS) | 20 Sekunden |
| 4. 72°C | 1 Minute |
| 5. 72°C | 7 Minuten |
| 6. 8°C | 10 Minuten |

Die Schritte 2-4 wurden 40-mal wiederholt.

Das fertige Produkt wurde in einer Gelelektrophorese auf erfolgreiche Amplifikation überprüft und im Anschluss sequenziert.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese können Nukleinsäuren nach ihren unterschiedlichen Größen aufgetrennt werden. Das Prinzip ist hierbei, dass Agarose netzähnliche Strukturen in dem Gel ausbildet, an welchem die DNA-Fragmente entlang wandern, wenn eine Spannung an das Gel angelegt wird. Hierbei wandert die negativ geladene DNA zum positiv geladenen Pol, wobei sich die Fragmente umso schneller bewegen, je kleiner sie sind.

Die Elektrophorese wurde in 2%igem Agarosegel durchgeführt. Hierzu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst und erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nach Abkühlen der Agarose wurde das Gel gegossen.

Je 10 μ l der Proben wurden mit 2 μ l FluorDNA Gel Stain versetzt und in das Gel geladen. Bei einer angelegten Spannung von 90 mV liefen die Samples für 50 Minuten im Gel. Die Darstellung und Dokumentation erfolgte mittels E-Box.

Real-Time semiquantitative PCR

Eine Methode, um den Anstieg des PCR-Produkts während des Vorgangs zu kontrollieren und anschließend die synthetisierte Menge zu quantifizieren, wurde erstmals 1992 publiziert (Higuchi et al. 1992).

Der PCR-Ansatz wird bei der Real-Time PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, dessen Intensität mit der Amplifikation des PCR-Produkts steigt. Die dabei erzeugte Kurve steigt exponentiell an und erreicht am Schluss ein Plateau. Dieses ist bei einer

normalen Real-Time PCR für alle Proben gleich, so dass eine Endpunktmessung lediglich aussagt, ob die Reaktion positiv oder negativ war.

Um eine Aussage treffen zu können, wurde der CT-Wert eingeführt. Dieser Wert gibt die Menge an Amplifikationszyklen an, die eine Probe gebraucht hat, um einen festgelegten Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen. Wenn man die CT-Werte der gemessenen Proben dann ins Verhältnis setzt, kann man die unterschiedliche Expression des fraglichen Gens ermitteln. Allerdings wird man kaum exakt dieselbe Menge template in jeder Probe einsetzen können und muss deswegen die Proben normalisieren, was mit einem Referenzgen möglich ist. Dieses Gen muss in allen Zellen des Körpers gleichermaßen exprimiert sein (Kubista et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auf eine Quantifizierung verzichtet und die Methode lediglich für einen semiquantitativen Nachweis über das Vorliegen des Amplifikats verwendet. Zum einen wurden Primer gewählt, die spezifisch an die Sequenz der EGFR vIII cDNA binden, um Proben auf das Vorliegen dieser Mutation zu scannen. Zum anderen wurden Primer für die Exons 5, 6, 7 und 8 von TP53 verwendet und die Methode genutzt, um einen direkten Erfolgsnachweis für die PCR zu erhalten. In folgender Tabelle sind die einzelnen Primerpaare angeführt.

Gen, Exon	Primer
EGFR vIII	Fwd: GGCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAAT Rev: TCCTCCATCTCATAGCTGTCTG
TP53, 5	Fwd: ATCTGTTCACTTGTGCCCTG Rev: AACCCAGCCCTGTCGTCTCTC
TP53, 6	Fwd: AGGGTCCCCAGGCCTCTGAT Rev: CACCCTTAACCCCTCCTCCC
TP 53, 7	Fwd: CCAAGGCGCACTGGCCTCATC Rev: CAGAGGCTGGGGCACAGCAGG
TP 53, 8	Fwd: TTCCTTACTGCCTCTTGCTT Rev: TGCCTGCTTGCTTACCTCG

Tab. 13: Primersequenzen Real-Time PCR

Es wurde folgender Mastermix angesetzt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
2x KAPA SYBR FAST Universal	12,5 μ l	1x
20 pmol forward Primer	1 μ l	0,8 pmol
20 pmol reverse Primer	1 μ l	0,8 pmol
Aqua dest.	8,5 μ l	-

Tab. 14: Reagenzien Real-Time PCR

Als Reaktionsgefäß diente eine 96-well plate, wobei in jedes well 22,5 μ l Mastermix und 2 μ l cDNA-template, respektive DNA-template, pipettiert wurden.

Der Cycler wurde wie folgt programmiert:

1. 95°C 15 Minuten
2. 95°C 30 Sekunden
3. 60°C 30 Sekunden
4. 72°C 15 Sekunden
5. 75°C 5 Sekunden single aquisition
6. 55°C – 95°C 1 aquisition/0.5°C

Die Schritte 2-5 wurden 45-mal wiederholt. Die Darstellung und Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Bio-Rad Software.

High Resolution Melting Analysis (HRMA)

HRMA wurde entwickelt, um DNA Sequenzvarianten zu detektieren ohne die Probe sequenzieren zu müssen. Die Methode macht sich Fluoreszenzmarker zunutze, die in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA stark leuchten. Die Doppelstränge werden dann mit aufsteigenden Temperaturen erhitzt, wobei sie in Einzelstränge zerfallen und die Fluoreszenz abnimmt. Während dieses Aufschmelzens werden kontinuierlich Fluoreszenzdaten gesammelt. Die spezifische Schmelztemperatur eines Doppelstrangs ist abhängig von seinem GC-Gehalt, seiner Länge und Basenabfolge. Bei der Mutationsanalyse ist die Form der Schmelzkurve wesentlich wichtiger als die spezifische Schmelztemperatur, da so das Vorliegen von heterozygoter DNA leicht durch eine Abweichung der Kurve von der homozygoten hin zur heterozygoten Kontrolle festgestellt werden kann (Reed et al. 2007).

In unserer Arbeit wurden mit dieser Methode folgende Primer eingesetzt, um die jeweiligen Zielgene zu untersuchen:

Gen und Exon	Primer
KRAS Exon 2	Fwd: GTAAAACGACGGCCAGTGA AAATGACTGAATATAAACTTGTGG Rev: CTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG
KRAS Exon 3	Fwd: GACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGGATTC Rev: CCAGTCCTCATGTACTGGTCCCTCAT
PIK3CA Exon 9	Fwd: CAGCTCAAAGCAATTTCTACACGA Rev: GCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAA
PIK3CA Exon 20	Fwd: GCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCAT Rev: CCAATCCATTTTTGTTGTCCAG
EGFR Exon 19	Fwd: CTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTT Rev: CCACACAGCAAAGCAGAACTCAC
EGFR Exon 21	Fwd: GTAAAACGACGGCCAGAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAAC Rev: GCCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTC
BRAF Exon 15	Fwd: AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG Rev: CTCAATTCTTACCATCCACAAAA

Tab. 15: Primersequenzen HRMA

Es wurden 2 verschiedene Mastermixe (s. Tab. 16) angesetzt, die sich durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) für EGFR und PIK3CA unterschieden.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	3,6 μ l	-
DMSO 25%	0,4 μ l	0,5%
MgCl ₂ (2,5 mM)	2 μ l	0,25 mM
2x High Resolution Melting Master	10 μ l	1x
Primermix Fwd & Rev (4 μ M)	2 μ l	0,4 μ l
Template	2 μ l	-

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	4,6 μ l	-
MgCl ₂ (3,0 mM)	2,4 μ l	0,375 mM
High Resolution Melting Master	10 μ l	1x
Primermix Fwd & Rev (4 μ M)	1 μ l	0,2 μ l
Template	2 μ l	-

Tab. 16: Reagenzien HRMA

Bei jeder Analyse wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle sowie aqua dest. mitgeführt. Die Software wurde wie folgt programmiert:

Detection Format: SYBR Green I / HRM Dye

- | | | |
|---------|-------------|-------------------------------|
| 1. 95°C | 15 Minuten | |
| 2. 95°C | 15 Sekunden | |
| 3. 62°C | 20 Sekunden | |
| 4. 72°C | 20 Sekunden | single aquisition |
| 5. 96°C | 1 Minute | |
| 6. 36°C | 30 Sekunden | |
| 7. 65°C | 2 Sekunden | |
| 8. 95°C | 0,04°C/Sek. | continuous aquisition (15/°C) |
| 9. 40°C | 10 Sekunden | |

Die Schritte 2-5 wurden 42-mal wiederholt. Die Darstellung und Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Lightcycler 480 Software.

Immunhistochemie

Von dem auf Blöcken in Paraffin eingebetteten Patientenmaterial wurden mit einem Mikrotom 1,5 μm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 58°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie für 3 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend für 2 x 5 Minuten in Isopropanol und für jeweils 5 Minuten in 96 % Ethanol, in 70% Ethanol und in aqua dest. rehydriert. Nun wurde mit dem Leica Bond-Max Färbeautomaten Färbungen mit verschiedenen Primärantikörpern durchgeführt (s. Tab. 9: Antikörper). Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Bond Polymer Refine Detection System durchgeführt, welches die folgenden Schritte beinhaltet:

1. Inkubation mit Wasserstoffperoxid
2. Hinzufügen des spezifischen Primärantikörpers
3. Inkubation mit Kopplungsantikörper
4. Inkubation mit Polymerreagenz
5. Sichtbarmachung des Komplexes mit DAB-Chromogen
6. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Bei jeder Färbereihe wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher der HNO-Klinik, sowie durch einen Mitarbeiter

des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München. Hierbei wurde, in Anlehnung an den Immunreaktiven Score (IRS) von Schauer et al., ein Wert aus dem Prozentsatz an positiven Zellen und Intensität der Färbung ermittelt (Schauer et al. 1988).

Der IRS ergibt sich aus der Multiplikation des prozentualen Anteils gefärbter Zellen (PP = percentage points) mit der Färbeintensität (SI = staining intensity). In unserer Arbeit wurden diese beiden Werte addiert und bilden so einen Score zwischen 0 und 7 Punkten. Zur statistischen Auswertung wurde ein cut-off Wert bestimmt, durch welchen es möglich ist, die Proben in negativ und positiv einzuteilen.

SI		PP		Score	
negativ	0	negativ	0	negativ	0
schwach positiv	1	< 10%	1	schwach positiv	2-3
mäßig positiv	2	11-30%	2	mäßig positiv	4-5
stark positiv	3	31-60%	3	stark positiv	6-7
		> 60%	4		

Tab. 17: Score für IHC (SI + PP = Score)

In-situ-Hybridisierung (ISH)

Durch ISH können Nukleinsäuresequenzen in der DNA und RNA einzelner Zellen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. In unserer Arbeit wurde diese Methode zum Nachweis von HPV- und EBV-DNA und RNA-Fragmenten genutzt und mittels eines Protokolls von Leica Biosystems für den Bond-Max Färbeautomaten durchgeführt. Die Färbungen wurden ebenfalls mit dem Bond Polymer Refine Detection System durchgeführt, DNA wurde mit Hilfe eines Anti-Biotin-Linkers nachgewiesen. Das Protokoll enthält folgende Schritte:

1. Inkubation mit Wasserstoffperoxid
2. Hinzufügen des spezifischen Anti-Biotin Antikörpers
3. Inkubation mit Kopplungsantikörper
4. Inkubation mit Polymerreagenz
5. Sichtbarmachung des Komplexes mit DAB-Chromogen
6. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Bei jeder Färbereihe wurde eine Positivkontrolle und eine Färbung ohne Primärantikörper - zum Ausschluss unspezifischer Färbungen - mitgeführt. Die

Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher der Hals-Nasen-Ohrenklinik, sowie durch einen Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München. Hierbei wurden die Färbungen als positiv erachtet, wenn mehr als 10% der Tumorzellen gefärbt waren. Für HPV wurden nach Empfehlung von Lajer und von Buchwald nur diejenigen Fälle als positiv erachtet, die sowohl in der ISH positiv waren, als auch p16^{INK4A} überexprimierten (Lajer and von Buchwald 2010).

2.2.2 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die SPSS Version 22 (IBM, Ehningen) verwendet. Die Daten dafür wurden in Excel gesammelt und aufbereitet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

Kreuz-Tabellen

Mit Hilfe der Kreuz-Tabellen-Analyse wurden Zusammenhänge zwischen Marker-Expression und klinischen Daten der Kollektive untersucht. Die angewendeten Tests waren der Chi-Quadrat-Test, sowie der exakte Test nach Fisher für geringere Fallzahlen.

Kaplan-Meier Methode und Log-Rank-Test

Mit der Kaplan-Meier Methode lassen sich die Überlebenszeiten oder die Zeiten bis zum Auftreten eines Rezidivs innerhalb einer Beobachtungsgruppe hinsichtlich eines Merkmals oder zwischen zwei Beobachtungsgruppen, die sich in einem Merkmal unterscheiden, beschreiben. Dazu wird der Tod durch die zugrunde liegende Krankheit oder das Eintreten eines Rezidivs als Ereignis definiert. Wenn das Ereignis bei einem Fall im Beobachtungszeitraum nicht eintritt, oder ein Patient durch einen tumorunabhängigen Tod ausscheidet, wird dieser zensiert und geht somit ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in die statistische Berechnung ein (Ziegler et al. 2007). Der Log-Rank-Test überprüft, ob das Eintreten der Ereignisse in zufälliger Reihenfolge, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, geschieht (Nullhypothese) oder eine Gruppe der anderen überlegen ist. Die größte Power besitzt der Log-Rank-Test für Gruppen, in denen die Ereignisraten proportional zueinander sind. Ist dies nicht der Fall, was man zum Beispiel leicht an einer Überkreuzung der Kaplan-Meier-

Kurven feststellen kann, eignet sich eher der generalisierte Wilcoxon-Test zur Ermittlung eines Unterschieds zwischen den Gruppen (Ziegler et al. 2007).

Da im SNSCC Kollektiv nur 11% der Patienten ein Follow-up von fünf Jahren oder mehr hatten, wurde zur besseren Vergleichbarkeit nur die 3-Jahresüberlebensrate angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Kollektive

Im Folgenden sind die beiden Kollektive hinsichtlich ihrer klinisch-pathologischen Parameter charakterisiert. Die Erstdiagnose der SNSCCs wurde zwischen April 1994 und April 2013 gestellt, das mediane Follow-up war 7,26 Jahre und die 5-Jahresüberlebensrate betrug 69,2%. Eine alleinige chirurgische Therapie erhielten 30 von 44 Patienten (68,2%), 11 Patienten wurden nachbestrahlt (25%), bei 2 Patienten wurde an die Resektion eine Radiochemotherapie angeschlossen (4,5%) und ein Patient wurde primär radiochemotherapiert (2,3%). Patienten mit einem HNSCC wurden im Zeitraum von 1993 bis 1996 diagnostiziert. Die Therapie der HNSCCs bestand bei 15 Patienten in einer chirurgischen Resektion ohne weitere Behandlung (23,1%) und bei 50 Patienten in einer chirurgischen Tumorentfernung mit anschließender Radiatio (76,9%). Die Kollektive wiesen eine ähnliche Verteilung des T-Stadiums auf. So hatten jeweils ca. 75% der Patienten beider Kollektive einen T1/T2 Tumor und ca. 25% Tumore eines höheren Stadiums. Außerdem zeigte sich auch, dass die 5-Jahresüberlebensrate (70,3%) beider Kollektive vergleichbar war. Weitere klinische Charakteristika sind in Tab. 18 aufgeschlüsselt.

Charakteristika	HNSCC	SNSCC
Alter Medianes Alter Range	73 Jahre 56-90 Jahre	61 Jahre 37-84 Jahre
Geschlecht Männlich Weiblich	61 (93,8%) 4 (6,2%)	33 (75%) 11 (25%)
pT Stadium* 1 2 3 4	21 (32,8%) 26 (40,6%) 10 (15,6%) 7 (10,9%)	22 (50%) 11 (25%) 6 (13,6%) 5 (11,4%)
pN Stadium* 0 1-3	34 (52,3%) 30 (53,1%)	42 (95,5%) 2 (4,5%)

pM Stadium*		
0	64 (100%)	43 (97,7%)
1	0 (0%)	0 (0%)
x		1 (2,3%)
Grading*		
G1	4 (6,3%)	2 (4,5%)
G2	34 (53,1%)	31 (70,5%)
G3	26 (40,6%)	11 (25%)
Lokalisation		
Mundhöhle	11 (16,9%)	
Oropharynx	21 (32,3%)	
Hypopharynx	13 (20%)	
Larynx	20 (30,8%)	
Nasenhaupthöhle (NHH)		34 (77,3%)
Nasennebenhöhlen (NNH)		5 (11,3%)
NHH und NNH		5 (11,3%)
Alkoholkonsum		
Regelmäßig	36 (55,4%)	10 (22,8%)
Nicht regelmäßig	10 (15,4%)	18 (41%)
Keine Angaben	19 (29,2%)	16 (36,4%)
Tabakkonsum		
Raucher	41 (63,1%)	12 (27,3%)
Nichtraucher	18 (27,7%)	16 (36,4%)
Keine Angaben	6 (9,2%)	16 (36,4%)
Metastasenstatus*		
Ja	32 (49,2%)	6 (13,6%)
Fernmetastasen	2 ((3,1%)	1 (2,2%)
Lymphknotenmetastasen	30 (46,2%)	5 (11,4%)
Nein	32 (49,2%)	38 (86,4%)

Tab. 18: Charakterisierung der Kollektive HNSCC (N = 65) und SNSCC (N = 44)

* Bei einem HNSCC Patienten fehlte die TNM Klassifizierung

3.2 Auswertung der Sequenzanalysen

Zur Übersicht sind in Tab. 19 die Ergebnisse aller Schmelzkurven- und Sequenzanalysen aufgeführt, die im Folgenden einzeln erklärt und dargestellt werden.

Versuch	HNSCC	SNSCC
Schmelzkurvenanalyse		
KRAS	11 (16,9%)	0
BRAF	6 (9,2%)	1 (2,6%)
EGFR	6 (9,2%)	0
PIK3CA	4 (6,1%)	5 (13,1%)
Sanger Sequenzierung		
KRAS	0	0
BRAF	2 (3,25%)*	0
EGFR	0	0
PIK3CA	0	2 (5,2%)
TP53	10 (15,2%)	9 (24,3%)

Tab. 19: Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen und Sanger Sequenzierungen (positive Fälle)

*Polymorphismus

KRAS

Bei KRAS wurden die Exons 2 und 3 untersucht. Es fanden sich in 16,9% der HNSCCs Abweichungen in den Schmelzkurven von der Wildtypkurve. Bei der Sequenzanalyse konnte jedoch keine Mutation gefunden werden.

BRAF

Bei BRAF wurden Mutationsanalysen im Exon 15 durchgeführt, in welchem auch der Hotspot liegt, der zur V600E Variante des Proteins führt. Bei den untersuchten Kollektiven konnte lediglich in zwei HNSCC-Proben (3,25%) ein Polymorphismus (c.1821c>t) festgestellt werden. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte eine Abweichung von der Wildtypkurve in 9,2% der Fälle bei HNSCC und in 2,6% bei SNSCC.

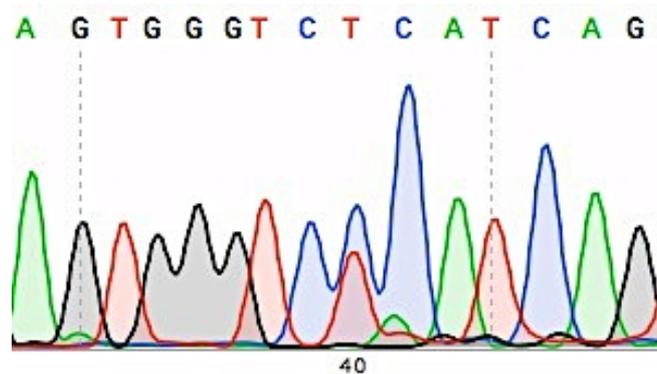


Abb. 2: BRAF c.1821c>t, silent mutation

EGFR

Es wurden Exon 19 und 21 des EGFR untersucht. In der Schmelzkurvenanalyse zeigten 9,2% der HNSCC-Proben eine Abweichung von der Wildtypkurve. Beim SNSCC waren alle Schmelzkurvenverläufe unauffällig. Die anschließende Sequenzierung deckte in beiden Kollektiven keine Mutationen auf.

PIK3CA

Von der PIK3CA wurden die Exons 9 und 20 auf Mutationen untersucht. Die Schmelzkurven wichen in 6,1% bei HNSCC und in 13,1% bei SNSCC von denen des Wildtyps ab. Bei der anschließenden Sanger-Sequenzierung konnten im SNSCC Kollektiv eine Probe mit einer Mutation im Exon 9 (c.1624g>a) und eine mit einer Mutation im Exon 20 (c.3140a>t) gefunden werden. Insgesamt hatten also 5,2% der sinunasalen Tumore eine Mutation in diesem Gen. Bei den HNSCCs fanden sich keine Mutationen.

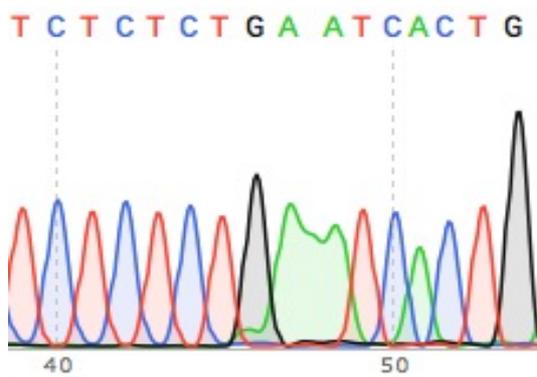


Abb. 3: PIK3CA c.1624g>a, p.E542K

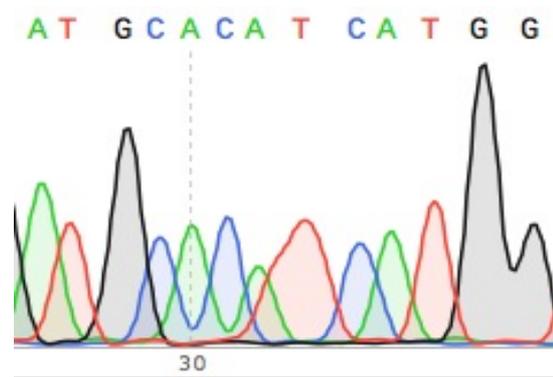


Abb. 4: PIK3CA c.3140a>t, p.H1047L

TP53

Bei TP53 wurden die Exons 5, 6, 7 und 8 auf Mutationen untersucht, wobei in den ersten drei Exons verschiedene Mutationen und Polymorphismen gefunden wurden. Es wurden alle Proben ohne vorherige Schmelzkurvenanalyse sequenziert. 15,2% der HNSCCs sowie 24,3% der SNSCCs wiesen eine echte Mutation im Gen auf. Zudem fanden sich bei 1,5% der HNSCC- und bei 10,5% der SNSCC-Proben verschiedene Polymorphismen. Die Daten für das HNSCC-Kollektiv wurden im Rahmen einer früheren Dissertation der Arbeitsgruppe gewonnen und hier nur zu Vergleichszwecken herangezogen.

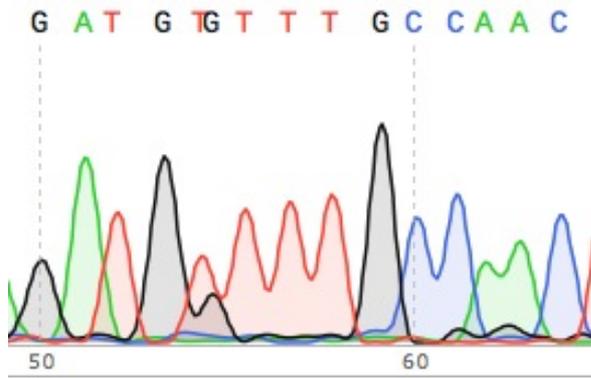


Abb. 5: TP53 c.400t>g, p.F134V

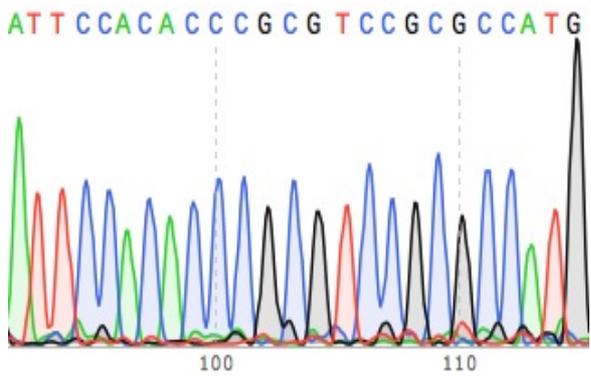


Abb. 6: TP53 c.454c>g, c.457c>t, c.460_472del

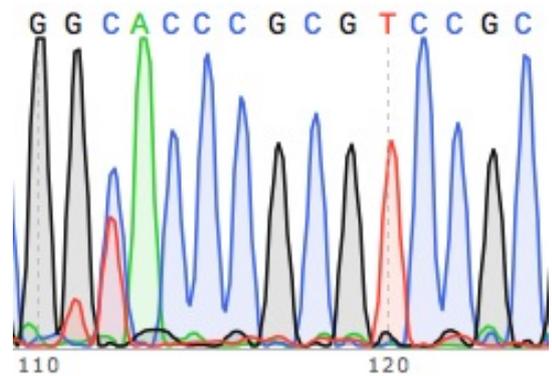


Abb. 7: TP53 c.462c>t, silent mutation

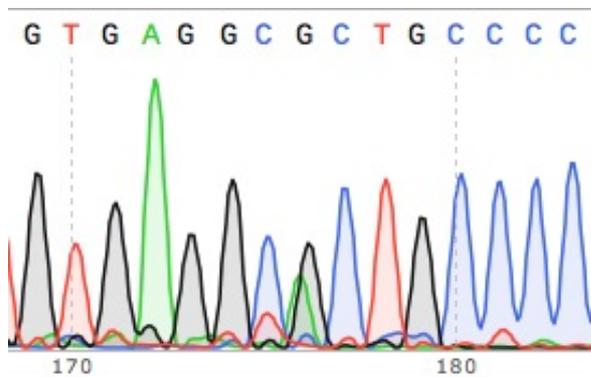


Abb. 8: TP53 c.524g>a, p.R175H

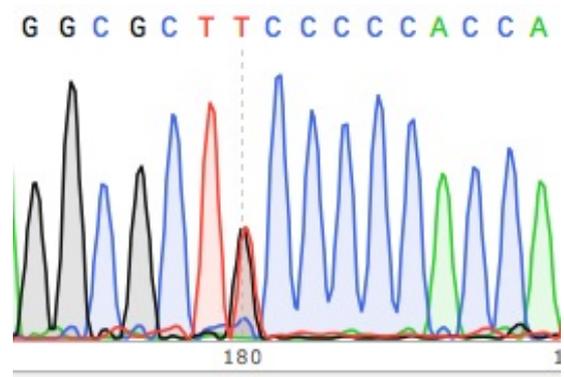


Abb. 9: TP53 c.527g>t, p.C176F

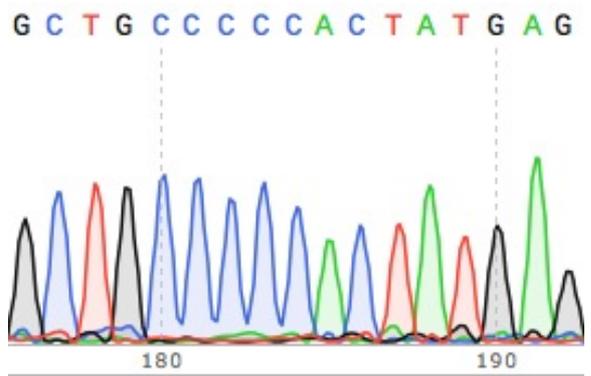


Abb. 10: TP53 c.535c>t, p.H179Y

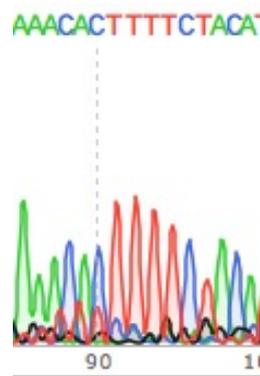


Abb. 11: TP53 c.638g>t, p.R213L

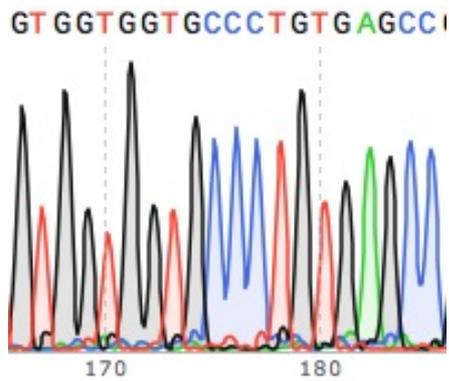


Abb. 12: TP53 c.659a>g, p.Y220C

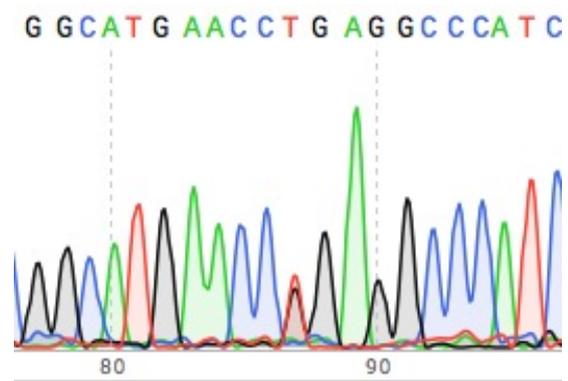


Abb. 13: TP53 c.743g>t, p.R248L

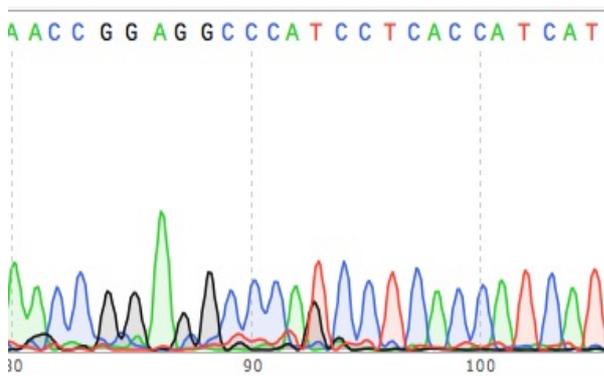


Abb. 14: TP53 c.752t>g, p.I251S

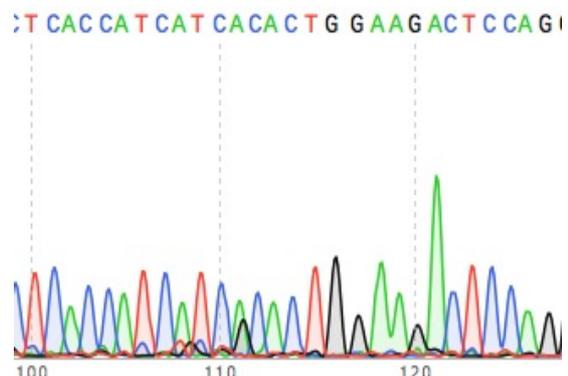


Abb. 15: TP53 c.766a>g, p.T256A

3.3 Auswertung der semiquantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR sollte das Vorliegen der EGFR vIII Variante überprüft werden. Es konnte in 9,2% der HNSCC-, sowie in 10,5% der SNSCC-Fälle ein positiver Nachweis erbracht werden (siehe auch Tab. 20). Als Positivkontrolle wurde bei jeder Versuchsreihe eine mit der EGFR vIII Variante transfizierte Zelllinie mitgemessen. Als Negativkontrolle diente eine Zelllinie mit Wildtyp-EGFR. Die Zelllinien wurden freundlicherweise vom onkologischen Labor der HNO-Klinik des Klinikums rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Exemplarisch sind in Abb. 16 je eine Schmelzkurve und eine Amplifikationskurve dargestellt.

Versuch	HNSCC	SNSCC
Real-TimePCR EGFR vIII	6 (9,2%)	4 (10,5%)

Tab. 20: Ergebnisse semiquantitative RT-PCR (positiver Nachweis)

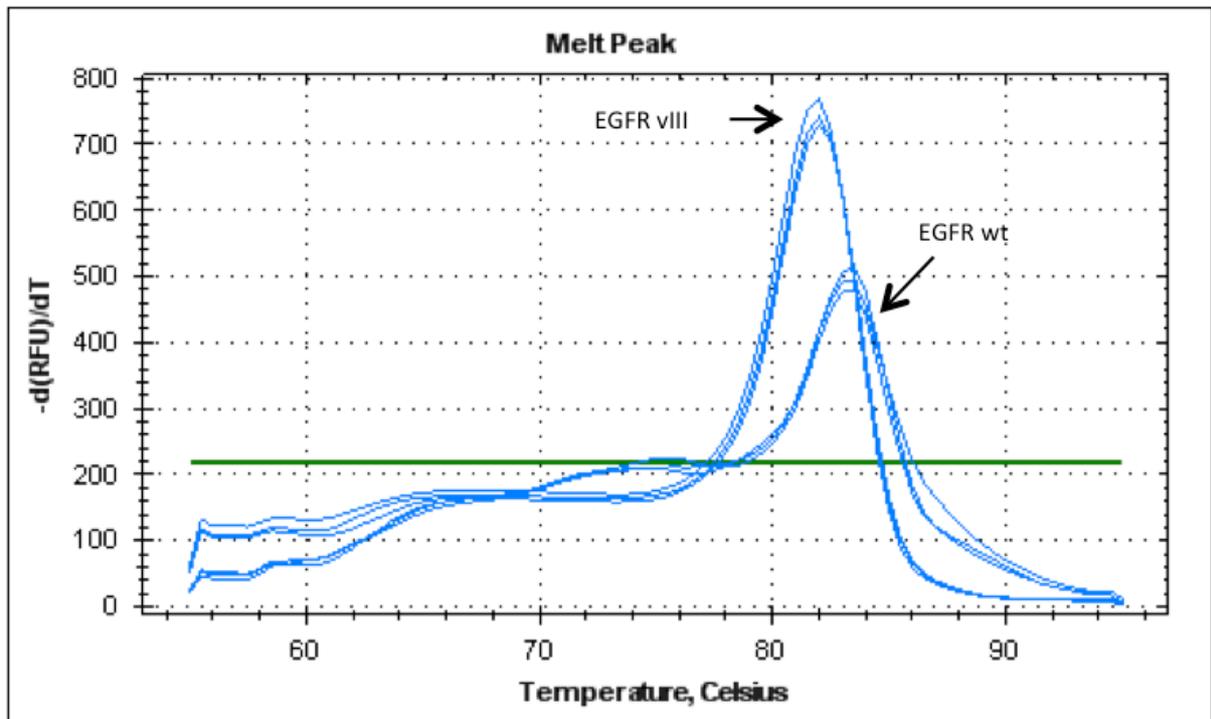
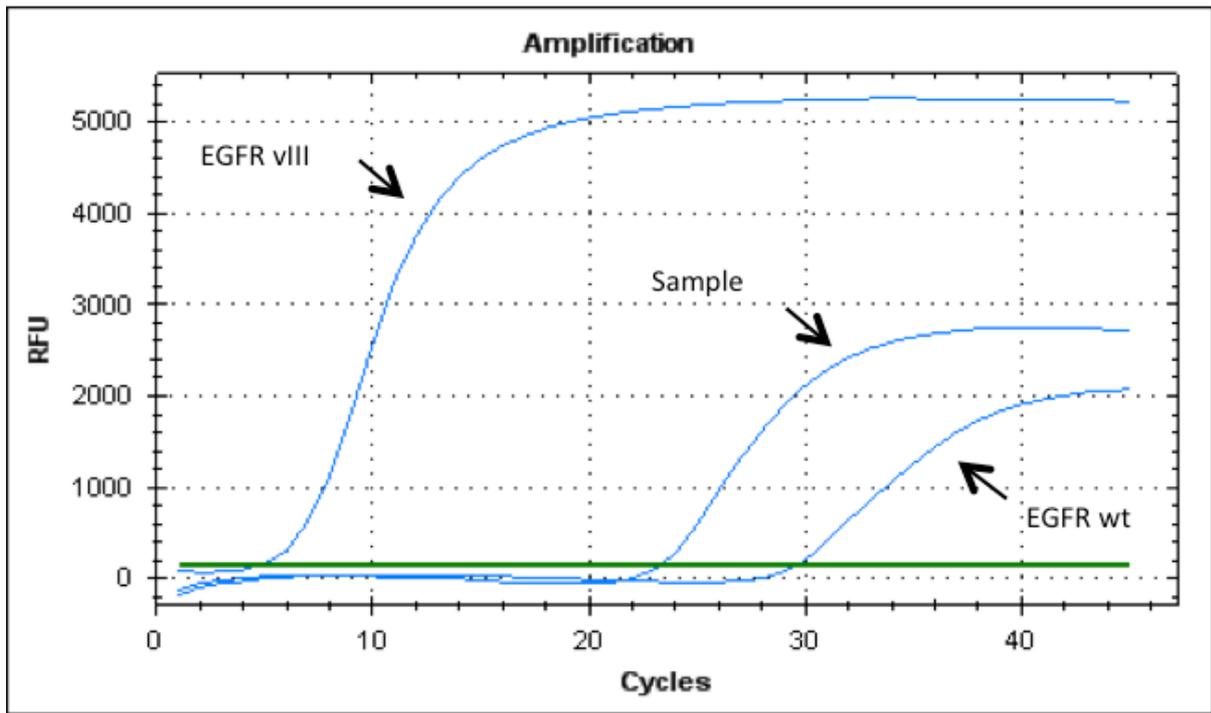


Abb. 16: Beispiel einer Amplifikations- und Schmelzkurve der semiquantitativen RT-PCR. Im oberen Bild sind Amplifikationskurven für ein Sample mit EGFR vIII Primer und je eine EGFR vIII Positivkontrolle, sowie eine EGFR Wildtyp Kontrolle. Im unteren Bild sind die verschiedenen Schmelzpunkte der EGFR vIII Sequenz und der EGFR Wildtyp Sequenz dargestellt.

3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und ISH

Im Folgenden sind beispielhaft positive Färbungen der angewendeten Marker in unterschiedlicher Intensität dargestellt. Da bei den In-situ-Hybridisierungen für EBV und HPV lediglich zwischen positiv und negativ unterschieden wurde, sind in diesen Fällen nur drei positive Beispiele aufgeführt. Tab. 21 gibt einen kurzen Überblick über die Ergebnisse, welche im Folgenden noch genauer beschrieben werden.

Versuch	HNSCC	SNSCC
In-situ-Hybridisierung		
EBV	7 (10,8%)	20 (47,6%)
HPV	8 (20%)	8 (19%)
Immunhistochemie		
p16 ^{INK4A} (cut-off = 4)	27 (93,1%)	19 (45,2%)
p53 (cut-off = 3)	30 (46,2%)	25 (56,8%)
EGFR (cut-off = 3)	41 (95,3%)	18 (42,9%)

Tab. 21: Häufigkeiten positiver Versuchsergebnisse nach Kollektiven

In-situ-Hybridisierung für EBV und HPV

Bei den In-situ-Hybridisierungen wurden diejenigen Fälle als positiv erachtet, bei welchen mehr als 10% der Tumorzellen eine intensive Färbung der Zellkerne aufwiesen. So waren im HNSCC-Kollektiv 10,8% der Proben positiv für EBV und 20% der Proben positiv für HPV. Im SNSCC-Kollektiv waren mit 47,6% deutlich mehr Fälle positiv für EBV und mit 19% ein ähnlicher Anteil positiv für HPV.

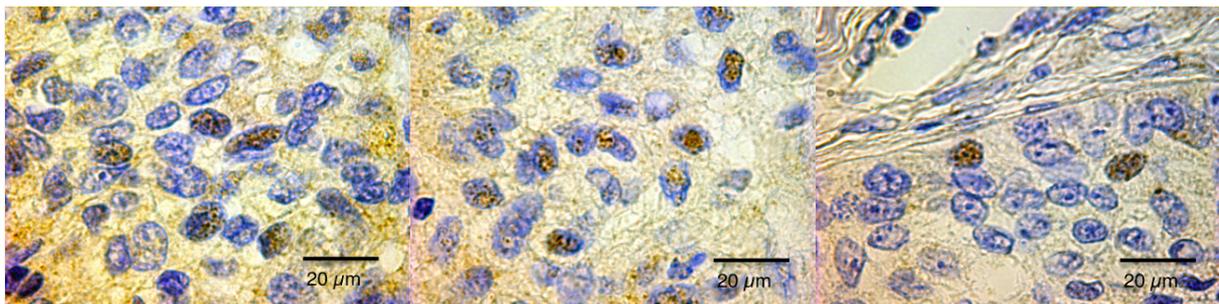


Abb. 17: In-situ-Hybridisierung für EBV, 63x Vergrößerung mit Immersionsöl

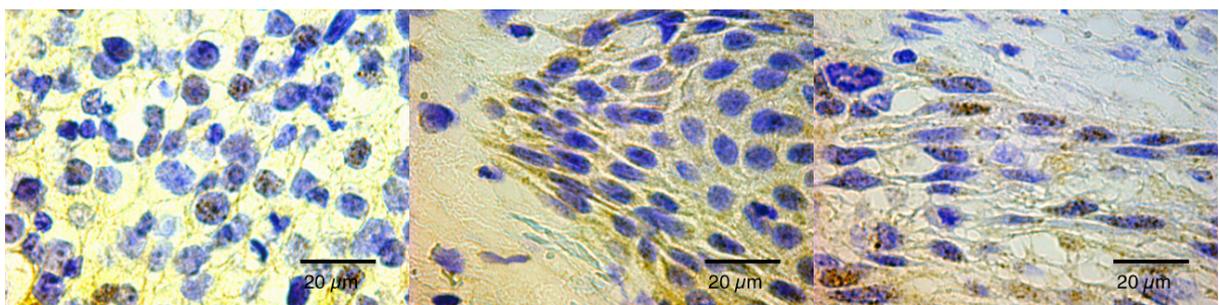


Abb. 18: In-situ-Hybridisierung für HPV, 63x Vergrößerung mit Immersionsöl

Immunhistochemie für p16^{INK4A}

Bei der immunhistochemischen Färbung von p16^{INK4A} wurde ein cut-off Wert von 4 festgelegt. Fälle, die einen Score darunter hatten (6,9% HNSCC, 56,8% SNSCC), wurden als Tumore mit normaler Proteinexpression erachtet. Fälle mit einem Score größer oder gleich 4 (93,1% HNSCC, 45,2% SNSCC) als Tumore mit erhöhter Expression.

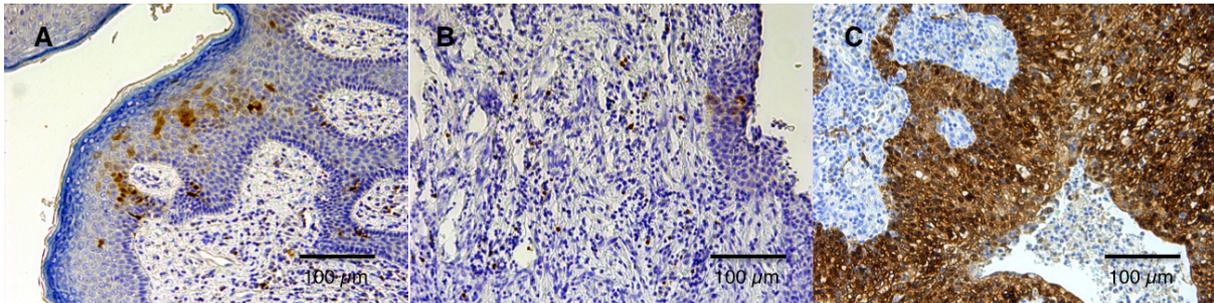


Abb. 19: Immunhistochemische Darstellung von p16^{INK4A}, 10-fache Vergrößerung

A: schwache Färbung, B: mittelstarke Färbung, C: starke Färbung

Immunhistochemie für p53

Hier wurde der cut-off Wert für eine Überexpression mit 3 festgelegt. Im HNSCC-Kollektiv fand sich somit bei 46,2% eine Überexpression und im SNSCC bei 56,8%.

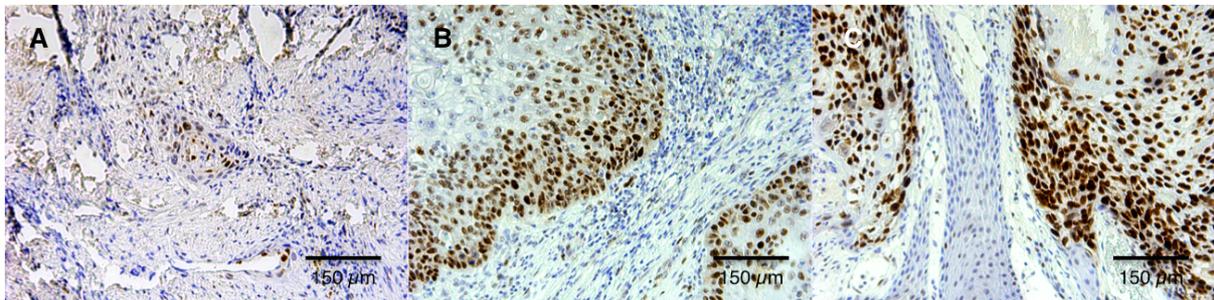


Abb. 20: Immunhistochemische Darstellung von p53, 20-fache Vergrößerung

A: schwache Färbung, B: mittelstarke Färbung, C: starke Färbung

Immunhistochemie für den EGFR

Der cut-off Wert für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des EGFR wurde ebenfalls bei 3 festgelegt. Somit ergab sich eine Überexpression in 95,3% der HNSCC-Fälle und in 42,9% der SNSCC-Fälle.

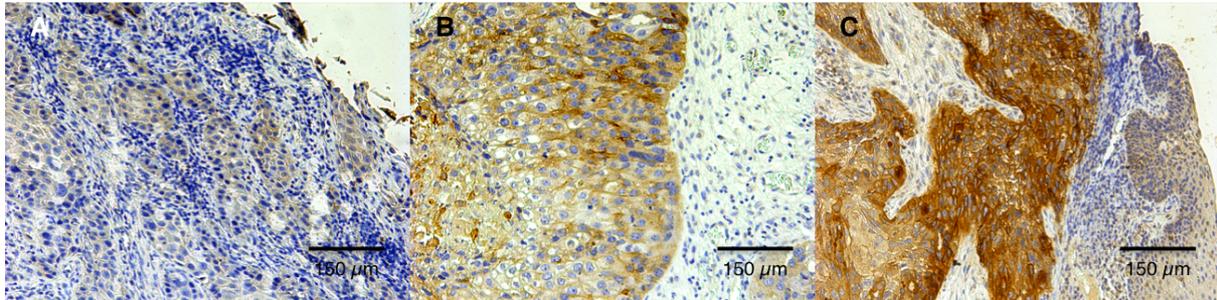


Abb. 21: Immunhistochemische Darstellung des EGFR, 20-fache Vergrößerung

A: schwache Färbung, B: mittelstarke Färbung, C: starke Färbung

3.5 Statistische Auswertung

3.5.1 Kreuz-Tabellen

Zusammenhänge zwischen Markerexpression, Mutationsstatus, viraler Infektion und klinischen Daten wurden durch Kreuz-Tabellen mittels Qui-Quadrat-Test und dem exakten Test nach Fisher für kleinere Fallzahlen ermittelt. Als klinische Kategorien wurden das T-Stadium, der Lymphknotenstatus, die Rezidivrate, sowie die Rate an Patienten, die überhaupt Metastasen (Lymphknoten- und Fernmetastasen zusammengefasst) entwickelten oder bei Diagnose bereits hatten, eingesetzt. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen dem Alkohol- und Nikotin-Status der Patienten und der Infektion mit HPV bzw. EBV untersucht (Tab. 23). Tab. 22 gibt eine Übersicht über die p-Werte der jeweiligen Korrelationsanalysen. Die signifikanten Ergebnisse sind im Folgenden genauer beschrieben.

Marker	T-Stadium		N-Stadium		Rezidiv		Metastasenstatus	
	p-Werte		p-Werte		p-Werte		p-Werte	
TP53								
HNSCC	0,243	cq	0,664	cq	0,661	cq	0,823	cq
SNSCC	0,094	cq	0,418	cq	0,75	cq	0,835	cq
EGFR vIII								
HNSCC	0,336	cq	0,57	cq	0,233	cq	0,805	cq
SNSCC	0,781	cq	0,559	cq	0,083	cq	0,670	cq

EBV HNSCC SNSCC	0,412 0,384	cq cq	0,197 0,129	cq cq	0,012 0,592	cq cq	0,11 0,007	cq ef
HPV/p16^{INK4A} HNSCC SNSCC	0,021 0,284	cq cq	0,457 0,688	cq cq	0,567 0,77	cq cq	0,28 0,328	cq cq
EGFR HNSCC SNSCC	0,666 0,033	cq ef	0,129 0,209	cq cq	0,219 0,839	cq cq	0,198 0,611	cq cq
p53 HNSCC SNSCC	0,09 0,016	cq ef	0,916 0,779	cq cq	0,202 0,299	cq cq	0,813 0,608	cq cq

Tab. 22: Signifikanzen der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen Markerexpression und klinischen Daten; Berechnung mittels Pearson's Chi-Quadrat-Test (cq) und exaktem Test nach Fisher (ef)

Marker	Nikotin		Alkohol	
	p-Werte		p-Werte	
EBV HNSCC SNSCC	0,806 0,573	cq cq	0,606 0,359	cq cq
HPV/p16^{INK4A} HNSCC SNSCC	0,781 0,501	cq cq	0,536 0,184	cq cq

Tab. 23: Signifikanzen der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen HPV- oder EBV-Infektion und Nikotin- und Alkoholkonsum; Berechnung mittels Pearson's Chi-Quadrat-Test (cq)

EBV vs. Metastasenstatus bei SNSCC

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen dem Vorliegen einer EBV-Infektion im Tumorgewebe und der Ausbildung von Metastasen bei EBV. Zwar hatten insgesamt nur 6 von 44 Patienten Metastasen, jedoch waren alle diese Tumore positiv für EBV, und obwohl auch 14 Patienten ohne Metastasen positiv für EBV waren, ergab sich doch eine statistisch sehr signifikante Korrelation mit einem p-Wert von 0,007. Zudem konnten vier der fünf Lymphknotenmetastasen für EBV angefärbt werden. Auch diese waren allesamt positiv. Im Vergleichskollektiv (HNSCC) konnte ein solcher Zusammenhang nicht gefunden werden.

SNSCC	Metastasen		Gesamt
	Ja	Nein	
EBV negativ	0	22	22
EBV positiv	6	14	20
Gesamt	6	36	42

Tab. 24: Kreuz-Tabelle EBV ISH vs. Metastasen (bei Erstdiagnose und als Rezidiv) bei SNSCC. p-Wert: **0,007**

EBV vs. Rezidiv bei HNSCC

HNSCCs zeigten eine vermehrte Rezidivneigung bei negativem EBV-Nachweis. So hatten Patienten mit einem positiven EBV-Status im Tumorgewebe keine Rezidive (14,6%), und alle Patienten mit einem Rezidiv waren negativ für EBV (43,6%). Allerdings waren auch 41,7% negativ für EBV und entwickelten kein Rezidiv. Trotzdem war dieser Zusammenhang mit einem p-Wert von 0,012 statistisch signifikant.

HNSCC	Rezidiv		Gesamt
	Ja	Nein	
EBV negativ	21	20	41
EBV positiv	0	7	7
Gesamt	21	27	48

Tab. 25: Kreuz-Tabelle EBV ISH vs. Rezidiv (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv und Fernmetastasierung) bei HNSCC. p-Wert: **0,012**

HPV vs. T-Stadium bei HNSCC

HNSCC zeigten mit einem p-Wert von 0,021 ein signifikant vermindertes Vorliegen von HPV bei Tumoren niedrigerer T-Stadien. Es wurden T1/2 und T3/4 Tumore jeweils als eine Gruppe zusammengefasst. In der ersten Gruppe war lediglich ein Tumor positiv für HPV, was 7,1% der T1/2 Karzinome entspricht. Bei den T3/4 Tumoren waren 50% der Proben positiv für einen HPV-Nachweis.

HNSCC	T-Stadium		Gesamt
	T1-2	T3-4	
HPV/p16 ^{INK4A} negativ	13	4	17
HPV/p16 ^{INK4A} positiv	1	4	5
Gesamt	14	8	22

Tab. 26: Kreuz-Tabelle HPV und p16^{INK4A} Status vs. T-Stadium bei HNSCC. p-Wert: **0,021**

T-Stadium vs. Expression von EGFR und p53 bei SNSCC

SNSCCs zeigten eine signifikant vermehrte Expression des EGFR sowie von p53 bei Tumoren eines höheren T-Stadiums. So war der EGFR in 72,7% der T3/4 Tumore überexprimiert (vs. 32,3% der T1/2), was mit einem p-Wert von 0,033 statistisch signifikant ist. p53 war in 90% der T3/4 Stadien und in nur 48,4% der T1/2 Tumore überexprimiert, was ebenfalls mit einem p-Wert von 0,016 statistisch signifikant ist.

SNSCC	T-Stadium		Gesamt
	T1-2	T3-4	
EGFR			
negativ	21	3	24
positiv	10	8	18
Gesamt	31	11	42

Tab. 27: Kreuz-Tabelle EGFR Expression vs. T-Stadium bei SNSCC. p-Wert: **0,033**

SNSCC	T-Stadium		Gesamt
	T1-2	T3-4	
p53			
negativ	16	1	17
positiv	15	10	25
Gesamt	31	11	42

Tab. 28: Kreuz-Tabelle p53 Expression vs. T-Stadium bei SNSCC. p-Wert: **0,016**

3.5.2 Überlebenskurven

Überlebenskurven mit einem Log-Rank-Test auf statistische Signifikanz wurden für alle Marker und die klinischen Parameter Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und metastasenfreies Überleben berechnet. Der Unterschied von rezidivfreiem zu metastasenfreiem Überleben liegt darin, dass ersteres alle Arten von Rezidiven, also Lokalrezidive, Fernmetastasen und Lymphknotenmetastasen beinhaltet. Das metastasenfremie Überleben hingegen errechnet sich aus der Zeit bis zum Auftreten einer Metastase (Lymphknoten- oder Fernmetastase) und berücksichtigt dadurch auch Metastasen bei Tumorerstdiagnose.

Gesamtüberleben

Bei der Analyse des Gesamtüberlebens abhängig von der Markerexpression gab es zwei statistisch signifikante Ergebnisse. Zum ersten hatten SNSCC Patienten mit einer TP53 Mutation in ihrem Tumor ein signifikant vermindertes Überleben im Gegensatz zu denen ohne bzw. mit einer stillen Mutation. So war die mittlere

Überlebenszeit der Gruppe mit Mutationen 2,31 Jahre und die der Gruppe ohne Mutationen 8,74 Jahre. Die 3-Jahresüberlebensrate war 43,8% für die TP53-Mutationen tragende Gruppe und 84,1% für die ohne Mutationen.

Das zweite signifikante Ergebnis ergab sich für HNSCC-Patienten, die eine p53-Überexpression in der immunhistochemischen Färbung zeigten. Hierbei stellte sich ein Überlebensvorteil derjenigen Patienten dar, in deren Tumoren das Protein überexprimiert war. So war die mittlere Überlebenszeit für die erste Gruppe 11,71 Jahre und die der Gruppe ohne Überexpression 6,48 Jahre. Die 3-Jahresüberlebensrate der Gruppe mit einer p53-Überexpression war 90%, die der Vergleichsgruppe war hingegen 69,2%.

Marker	Negativ	Positiv	p-Wert
TP53 Mutation HNSCC (n=52) SNSCC (n=38)	11,56 (9,47 – 13,65) 8,74 (5,09 – 12,40)	8,92 (5,46 – 12,38) 2,31 (1,19 – 3,43)	0,438 0,048
EGFR vIII HNSCC (n=119) SNSCC (n=36)	7,99 (6,57 – 9,40) 5,79 (4,44 – 7,13)	9,48 (6,64 – 12,31) 9,22 (1,83 – 16,60)	0,17 0,22
EBV HNSCC (n=48) SNSCC (n=44)	9,92 (8,17 – 11,67) 5,90 (4,28 – 7,53)	11,029 (7,20 – 14,86) 9,23 (4,41 – 14,04)	0,42 0,35
HPV / p16^{INK4A} HNSCC (n=23) SNSCC (n=44)	11,39 (8,84 – 13,93) Nicht berechenbar	12,64 (10,00 – 15,28) Nicht berechenbar	0,39 0,36
p16^{INK4A} HNSCC (n=29) SNSCC (n=44)	Nicht berechenbar 7,80 (3,19 – 12,42)	Nicht berechenbar 6,87 (4,91 – 11,68)	0,31 0,13
p53-Expression HNSCC SNSCC	6,48 (3,87 – 9,09) 4,36 (3,56 – 5,16)	11,71 (9,78 – 13,64) 7,66 (4,13 – 11,19)	0,009 0,43
EGFR-Expression HNSCC (n=43) SNSCC (n=42)	Nicht schätzbar 8,46 (4,64 – 12,27)	Nicht schätzbar 5,12 (3,57 – 6,66)	- 0,301*

Tab. 29: Gesamtüberleben aus Kaplan-Meier-Analysen. Es sind immer mittlere Überlebenszeiten mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall in Jahren angegeben. p-Werte wurden wie oben beschrieben mit dem Log-Rank-Test oder dem generalisierten *Wilcoxon-Test ermittelt.

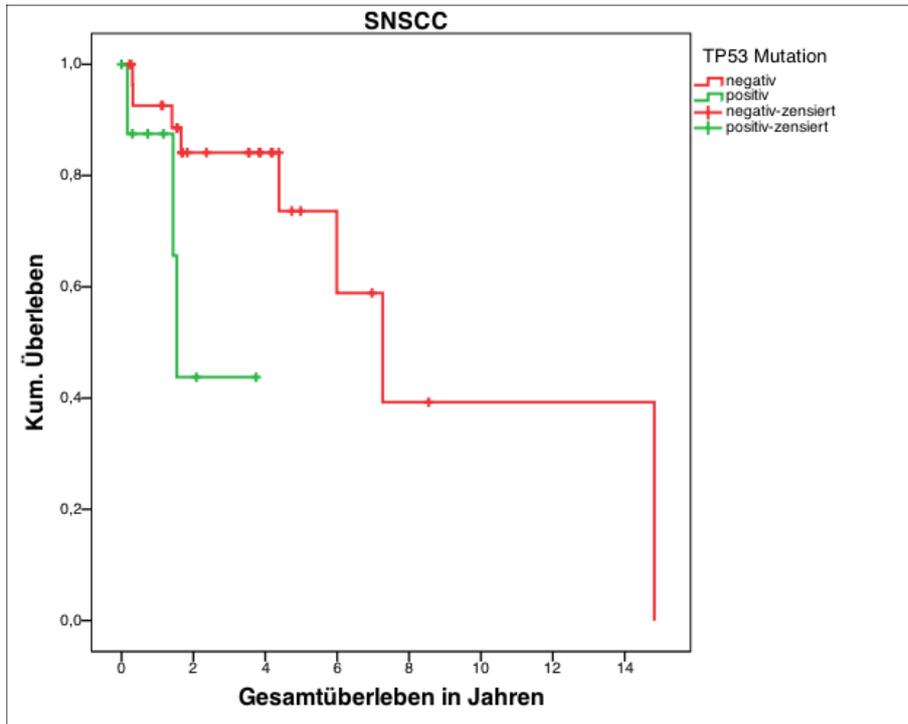


Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der TP53 Mutationen bzgl. des Gesamtüberlebens von SNSCC-Patienten; p-Wert: **0,048**

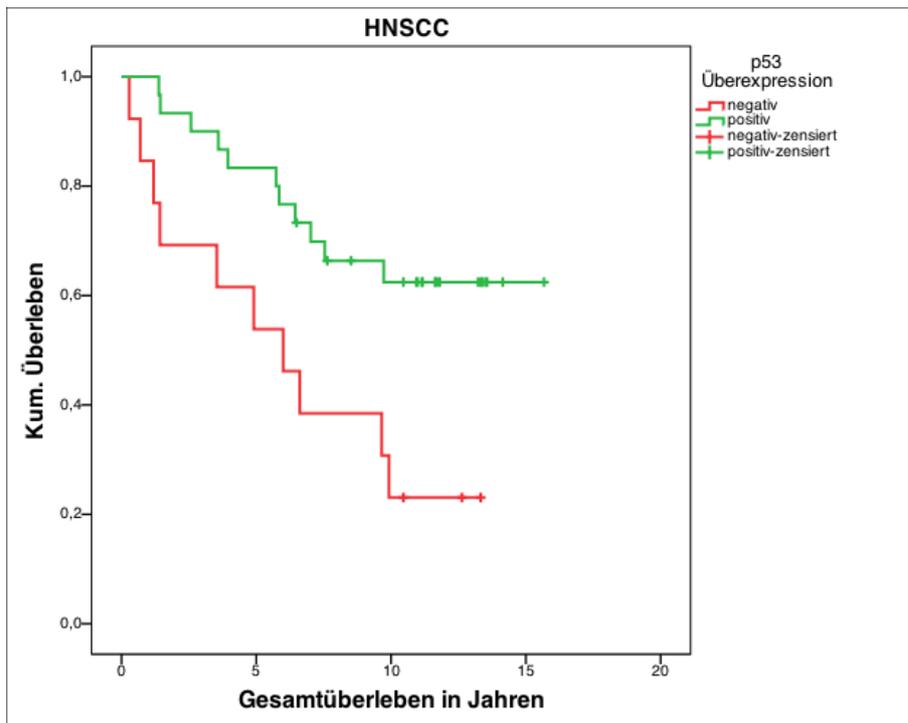


Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der p53-Expression bzgl. des Gesamtüberlebens von HNSCC-Patienten; p-Wert: **0,009**

Rezidivfreies Überleben

Wie schon in den Kreuz-Tabellen veranschaulicht, gab es im HNSCC-Kollektiv unter den EBV-positiven Fällen keinen mit Rezidiv. Dadurch ergibt sich ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben für diese Gruppe mit einer 3-Jahres-Rezidivfreiheitsrate von 100%, im Gegensatz zur EBV-negativen Gruppe, die eine Rate von 75,6% aufweist. Mittlere Überlebenszeiten waren nicht schätzbar, da alle EBV-positiven Fälle zensiert waren.

Marker	Negativ	Positiv	p-Wert
TP53 HNSCC (n=121) SNSCC (n=38)	11,25 (9,07 – 13,43) 9,32 (6,23 – 12,42)	7,971 (4,78 – 11,16) 2,89 (0,53 – 1,85)	0,518 0,556
EGFR vIII HNSCC (n=121) SNSCC (n=36)	7,30 (5,78 – 8,81) 5,91 (4,35 – 7,46)	8,78 (5,62 – 11,95) 6,18 (0,00 – 12,37)	0,50* 0,17 0,13
EBV HNSCC (n=48) SNSCC (n=44)	Nicht berechenbar 5,93 (4,01 – 7,84)	Nicht berechenbar 8,48 (4,59 – 12,37)	0,11 0,037 0,96
HPV / p16^{INK4A} HNSCC (n=23) SNSCC (n=42)	10,26 (8,12 – 12,40) 8,52 (5,48 – 11,55)	11,85 (7,83 – 15,87) 2,87 (0,79 – 4,94)	0,87 0,66 0,54
p16^{INK4A} HNSCC (n=29) SNSCC (n=44)	Nicht berechenbar 6,195 (1,76 – 10,63)	Nicht berechenbar 6,54 (4,84 – 8,23)	0,95 0,38 0,77
p53 Expression HNSCC (n=44) SNSCC (n=42)	7,04 (4,26 – 9,86) 3,988 (3,05 – 4,93)	10,46 (8,67 – 12,25) 8,09 (4,45 – 11,73)	0,067 0,53
EGFR Expression HNSCC (n=43) SNSCC (n=42)	Nicht schätzbar 9,72 (6,43 – 13,00)	Nicht schätzbar 3,48 (2,39 – 4,56)	- 0,457

Tab. 30: Rezidivfreies Überleben aus Kaplan-Meier-Analysen. Es sind immer mittlere Überlebenszeiten mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall in Jahren angegeben. p-Werte wurden wie oben beschrieben mit dem Log-Rank-Test oder dem generalisierten *Wilcoxon-Test ermittelt.

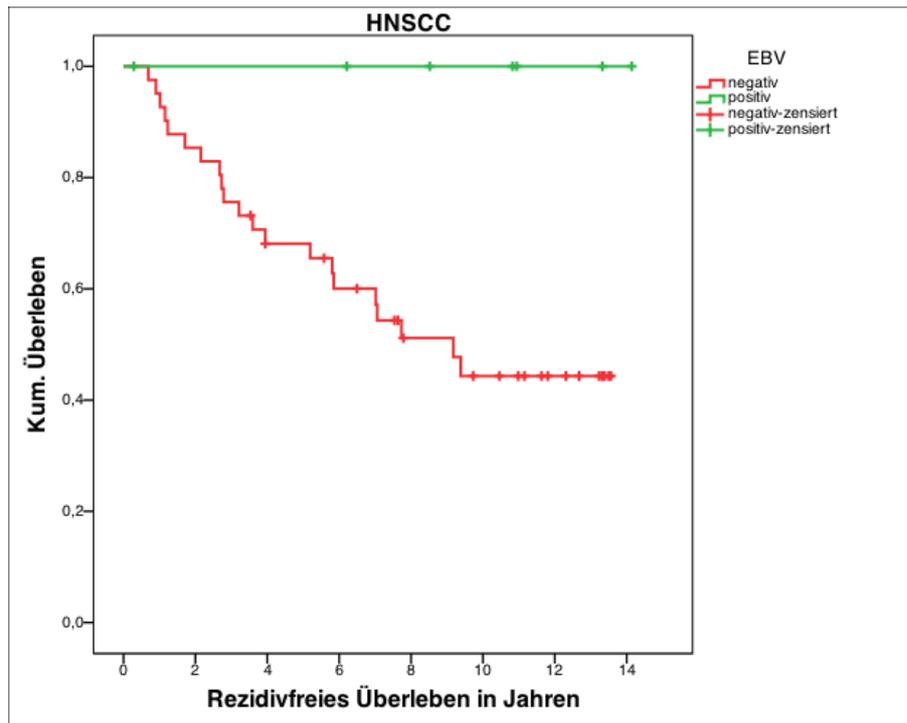


Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz von EBV RNA bzgl. des rezidivfreien Überlebens von HNSCC-Patienten; p-Wert: 0,037

Metastasenfreies Überleben

Wie ebenfalls bereits in den Kreuz-Tabellen veranschaulicht, gab es im SNSCC Kollektiv keine EBV-negativen Fälle, die Metastasen ausbildeten, oder bei Tumordiagnose hatten. Es ergab sich dadurch eine signifikant verbesserte 3-Jahres metastasenfreie Rate für EBV-negative SNSCCs von 100% gegenüber 69,5% bei Patienten mit einem positiven EBV-Nachweis im Tumorgewebe. Mittlere Überlebenszeiten waren nicht schätzbar, da alle EBV-negativen Fälle zensiert waren.

Marker	Negativ	Positiv	p-Wert
TP53 HNSCC (n=54) SNSCC (n=38)	11,10 (8,54 – 13,66) 7,32 (6,20 – 8,43)	9,22 (4,91 – 13,53) 3,25 (2,35 – 4,15)	0,774 0,978
EGFR vIII HNSCC (n=65) SNSCC (n=36)	10,42 (8,19 – 12,65) 7,36 (6,28 – 8,44)	8,0 (5,05 – 12,95) 3,19 (1,55 – 4,84)	0,652 0,592
EBV HNSCC (n=48) SNSCC (n=42)	9,75 (7,51 – 11,99) Nicht schätzbar	3,19 (0 – 6,93) Nicht schätzbar	0,05 0,011

HPV/p16^{INK4A} HNSCC (n=23) SNSCC (n=42)	10,48 (7,09 – 13,87) 7,10 (5,92 – 8,27)	3,05 (0 – 6,33) 2,87 (0,79 – 4,94)	0,275 0,532
p16^{INK4A} HNSCC (n=29) SNSCC (n=42)	6,32 (0 – 15,07) 4,94 (3,44 – 6,43)	9,81 (6,95 – 12,68) 8,058 (7,13 – 8,98)	0,764 0,085
p53 Expression HNSCC (n=44) SNSCC (n=42)	7,34 (4,20 – 10,48) 4,14 (3,3 – 4,99)	8,67 (6,0 – 11,34) 7,29 (5,96 – 8,62)	0,901 0,564
EGFR Expression HNSCC (n=43) SNSCC (n=42)	Nicht schätzbar 7,02 (5,67 – 8,37)	Nicht schätzbar 5,75 (4,19 – 7,32)	- 0,526*

Tab. 31: Metastasenfreies Überleben aus Kaplan-Meier-Analysen. Es sind immer mittlere Überlebenszeiten mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall in Jahren angegeben. p-Werte wurden wie oben beschrieben mit dem Log-Rank-Test oder dem generalisierten *Wilcoxon-Test ermittelt.

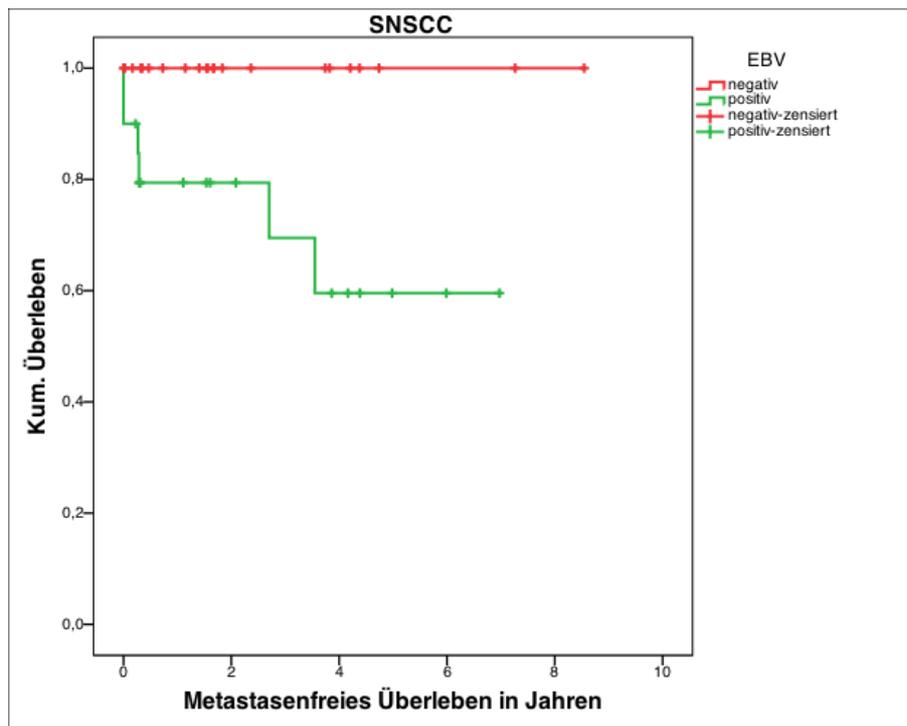


Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz von EBV-RNA bzgl. des metastasenfreien Überlebens von SNSCC-Patienten; p-Wert: **0,011**

4. Diskussion

Plattenepithelkarzinome der Nase und der Nasennebenhöhlen sind mit einer Inzidenz von weniger als 0,3/100000 eine seltene Tumorentität, deren Prognose sich über die letzten drei Jahrzehnte kaum verbessert hat (Turner and Reh 2012). Die Studienlage für diese Tumore ist vergleichsweise schlecht und die meisten Veröffentlichungen behandeln, auf Grund der geringen Fallzahlen, alle histologischen Subtypen dieser Lokalisation und nicht nur Plattenepithelkarzinome alleine (Robbins et al. 2011). Die primäre Therapie besteht zumeist in einer chirurgischen Resektion mit großzügig freien Rändern und wird, wegen der hohen Rezidivrate, vermehrt von adjuvanter Radio- oder Radiochemotherapie gefolgt. Um herauszufiltern, von welcher Therapie ein Patient am meisten profitiert, müssen biologische Marker für die Vorhersage eines Therapieerfolges gefunden werden (Franchi et al. 2011).

Für Plattenepithelkarzinome des Pharynx und Larynx gibt es hingegen einige prognostische Marker, die teilweise allmählich Eingang in die klinische Praxis finden. Hierbei ist an erster Stelle das humane Papillomavirus zu nennen, dessen Vorliegen in einem Tumor die Prognose verbessert und zusammen mit Staging und Nikotin-Status Oropharynxkarzinome in low, intermediate und high risk einteilen lässt (Ang et al. 2010). Der zweite wichtige Biomarker ist der Mutationsstatus von TP53. Eine proteinverändernde Mutation dieses Gens beeinflusst laut einigen Studien nicht nur das Gesamtüberleben negativ, sondern wirkt sich auch auf das Ansprechen einer Radiochemotherapie aus (Nylander et al. 2000).

Seit der Einführung der anti-EGFR Therapie bei Kopf-Hals-Karzinomen mit Cetuximab werden Biomarker gesucht, von welchen ein Therapieansprechen abgeleitet werden kann. Da der Signalweg äußerst komplex ist und viele Proteine die Wirksamkeit einer solchen Therapie vermindern können, gestaltet sich die Suche schwierig und ist bisher ohne eindeutige Ergebnisse geblieben (Leemans et al. 2011).

Um bessere Therapierfolge zu erhalten, muss daher das SNSCC genauer charakterisiert werden. Vor allem müssen Unterschiede zum HNSCC gefunden werden, um die Therapie dementsprechend anzupassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden hinsichtlich dieser Fragestellung im Folgenden diskutiert.

4.1 Kritische Beurteilung der Methoden

Mutationsanalysen mittels High Resolution Melting Analysis

Die Schmelzkurvenanalyse ist eine schnelle und handliche Methode, um DNA-Proben auf Mutationen zu screenen. Die beste Sensitivität und Spezifität für heterozygote Samples ist hierbei für kurze Fragmente unter 400 Basenpaaren gemessen worden, allerdings scheinen homozygote Veränderungen wesentlich schlechter erkannt zu werden und der Goldstandard hierfür ist die direkte Sequenzierung (Reed and Wittwer 2004). Da in den Gewebeproben zumeist Tumoranteile gemischt mit Normalgewebe vorlagen, wurde von einem heterozygoten Mutationsmuster ausgegangen und die verwendeten Primer so ausgewählt, dass Produkte um 100bp amplifiziert werden konnten. Proben, in denen wider Erwarten eine homozygote Mutation vorlag, können dadurch eventuell als falsch negativ beurteilt worden sein. In einer Vergleichsstudie verschiedener Methoden zur Mutationsanalyse zeigte sich, dass bei geringer Tumorzellzahl in einer Probe eine Schmelzkurvenanalyse mit anschließender Sequenzierung die geringste Rate an falsch negativen Proben hatte. Allerdings wurde ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Laboren gemessen (Dijkstra et al. 2013). Daher ist davon auszugehen, dass auch in Proben mit einem Tumorzellanteil von unter 15% korrekte Ergebnisse erzielt wurden. Die Primer und Kontrollen für KRAS, BRAF und den EGFR stammen aus einem klinischen Routinelabor und wurden auf eine gute Sensitivität und Spezifität hin getestet. Die Primer und Kontrollen für die PIK3CA hingegen sind experimenteller Natur und könnten unter Umständen für falsch negative oder falsch positive Ergebnisse verantwortlich sein.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Diese Methode wird klassischerweise zur absoluten oder relativen Quantifizierung einer Gen-Expression oder einer DNA-Sequenz (z.B. Viruslast) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode genutzt, um einen schnellen Nachweis ohne Quantifizierung über das Vorliegen der EGFR VIII Variante zu erhalten und als Erfolgskontrolle für eine Amplifizierung von TP53 zur nachfolgenden Sequenzierung. Die gewählten Primer wurden in einer von Yoshimoto et al. veröffentlichten Arbeit bereits erfolgreich eingesetzt (Yoshimoto et al. 2008). Da die Methode seit vielen Jahren etabliert und bewährt ist und die durchgeführten Analysen in mehreren

Ansätzen die gleichen Ergebnisse zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Daten verlässlich sind.

In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie

Die Schwierigkeit bei diesen Methoden liegt primär darin, dass es sich immer um eine subjektive Auswertung handelt. Hierbei gibt es verschiedene Fallstricke, die bei einer Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Zum einen müssen angefärbte Tumorzellen klar als solche identifiziert werden und zum anderen Zellen, die eine Färbung aufweisen könnten, abgegrenzt werden. Besonders bei der In-situ-Hybridisierung mit der EBER-Sonde müssen Lymphozyten gegenüber Tumorzellen abgegrenzt werden und dürfen nicht in die Auswertung miteinfließen.

Die zweite Problematik stellt sich bei der Berechnung der angefärbten Fläche. Da unter dem Mikroskop nur Ausschnitte des Präparats betrachtet werden können, ist die Fläche eine Schätzung, die sich aus einer Betrachtung von fünf zufälligen Abschnitten ergibt.

Die letzte Problematik bietet die ermittelte Intensität. Ein Präparat wird gegen eine subjektive Skala des Auswertenden verglichen, was eine hohe Unsicherheit birgt. Zudem sagt die Intensität nicht immer verlässlich aus, wie stark ein Marker exprimiert ist, da sie von anderen Faktoren wie der Menge an Antikörper oder der Qualität des Präparates abhängig ist.

Diese Problematik muss bei einer Auswertung und Interpretation dieser beiden Methoden immer beachtet werden. Um die Subjektivität der Methode zu minimieren, wurde die Auswertung immer von drei unabhängigen Untersuchern vorgenommen und die Skala der Intensität und Fläche in kleine Schritte unterteilt.

4.2 Mutationsanalysen und Überleben

TP53

Wie bereits eingangs erwähnt, wirkt sich eine proteinverändernde Mutation des TP53 negativ auf das Gesamtüberleben von HNSCC aus (Nylander et al. 2000). Die hier durchgeführten Untersuchungen für SNSCC ergaben ebenfalls einen signifikanten Überlebensnachteil für Patienten, deren TP53 eine Mutation aufwies ($p=0.048$). Im HNSCC-Kollektiv konnte kein signifikant vermindertes Überleben ermittelt werden. Dies mag daran liegen, dass es sich beim verwendeten Kollektiv tendenziell um low risk Fälle handelt. Die Erstellung des Kollektivs erfolgte vor einigen Jahren für eine Studie über adjuvante Behandlung mit Mistelextrakt, und es wurden daher nur Patienten in gutem Allgemeinzustand und mit einem resektablen Tumor eingeschlossen, was man ebenfalls an der Verteilung der T-Stadien im HNSCC-Kollektiv sehen kann (Steuer-Vogt et al. 2001). Die Auswahl des Kollektivs für die vorliegende Vergleichsstudie bot sich daher an, da die Verteilung mit ca. 75% T1/2 und ca. 25% T3/4 Stadien in beiden Kollektiven sehr ähnlich war. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich 4 Exons des TP53 auf Mutationen untersucht und so wahrscheinlich einige Veränderungen nicht erkannt, weswegen die Mutationsrate niedriger scheint als in vergleichbaren Arbeiten. Um diese Verzerrung weiter zu untersuchen, wird zur Zeit ein neues Kollektiv erstellt, das alle HNSCC-Fälle der Klinik einschließt und klären wird, ob es sich eben um einen Fehler bei der Auswahl des Kollektivs handelt oder tatsächlich um niedrige Mutationsraten ohne signifikanten Überlebensnachteil. Eine Arbeit über Plattenepithelkarzinome des Sinus maxillaris konnte ein signifikant schlechteres Ansprechen auf Radiochemotherapie bei positivem Mutationsstatus zeigen und damit ein schlechteres rezidivfreies Überleben (Bandoh et al. 2002). Daher wäre es interessant, auch diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, was auf Grund der unzureichenden Dokumentation der teilweise schon lang zurückliegenden SNSCC-Fälle hier nicht möglich war, in einer prospektiven Studie jedoch durchgeführt werden sollte.

EGFR

Mutationen im EGF-Rezeptor scheinen bei kaukasischen Patienten deutlich seltener zu sein als bei asiatischen, wie anhand zweier Studien gezeigt werden konnte. Alle Mutationen, die die Arbeitsgruppen fanden, waren entweder im Exon 19 oder 21

lokalisiert (Lee et al. 2005, Loeffler-Ragg et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten bei beiden Kollektiven keine Mutationen in den Exons 19 und 21 festgestellt werden und dementsprechend konnte auch keine statistische Analyse durchgeführt werden.

Weiter wurden die Proben auf das Vorliegen der EGFR vIII Variante untersucht, da erst kürzlich gezeigt wurde, dass diese in 21 bis 42% bei HNSCC vorliegt und mit einem schlechteren Ansprechen auf anti-EGFR-Therapien assoziiert zu sein scheint (Sok et al. 2006, Szabo et al. 2011). Bei den hier untersuchten HNSCC-Patienten fand sich allerdings nur bei 9,2% der Fälle eine EGFR vIII Variante, was unter Umständen ebenfalls auf die Auswahl des Kollektivs zurückzuführen ist und in einer weiteren Studie neu aufgearbeitet werden sollte. Bei den SNSCC-Patienten hatten 10,4% der Fälle eine EGFR vIII Variante. Es konnte in beiden Kollektiven kein Einfluss auf das Überleben ermittelt werden. Auch bei einer weiteren Korrelation zu T- und N-Stadium, Rezidivrate und Metastasenbildung konnte keine signifikante Assoziation aufgedeckt werden. Somit kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage über einen Vorteil oder Nachteil des Vorliegens einer EGFR vIII Variante getroffen werden. Auch wurden die Patienten nicht mit anti-EGFR-Antikörpern behandelt, so dass keine Korrelation für ein Ansprechen auf die Therapie bei Vorliegen der EGFR vIII Variante ermittelt werden kann.

KRAS

Wie auch der EGF-Rezeptor selbst, beeinflusst der downstream Signalweg das Ansprechen von HNSCC auf anti-EGFR-Therapien, jedoch konnte bislang kein Protein isoliert werden, dessen Funktion besonders wichtig für einen Therapieerfolg ist. Im Gegensatz hierzu ist das Screening auf KRAS-Mutationen bei kolorektalen Karzinomen vor der Einleitung einer Therapie mit beispielsweise Cetuximab obligat (Dijkstra et al. 2013).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit den Ursachen für die Resistenzbildung auf anti-EGFR-Therapien bei HNSCC beschäftigt und dabei auch KRAS auf Mutationen analysiert. Wie auch in dieser Arbeit konnten dabei keine Mutationen in den untersuchten Exons ausgemacht werden (De Carvalho et al. 2013, Boeckx et al. 2014). In vorliegender Arbeit fanden sich in 17% der Fälle Abweichungen der Schmelzkurven gegenüber den in der Sequenzierung festgestellten Wildtyp-Fällen.

Interessanterweise gab es auch bei Boeckx et al. eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der HRMA und der Sanger-Sequenzierung. Die belgische Arbeitsgruppe fand ein abweichendes Schmelzkurvenprofil in ca. 7% der Fälle. Die Erklärung für die Verzerrung liegt laut Boeckx et al. in verschiedenen Faktoren. So sei die HRMA eine sensitivere Methode zur Identifizierung von heterozygoten Mutationen und erkenne eine Frequenz von 3% mutierter Allele in einem DNA-Template (Deschoolmeester et al. 2010). Weiter liege das Problem einer korrekten Sequenzierung in den adversen Effekten, die Formalin auf DNA hat. Da in vorliegender Studie ebenfalls keine Gefrierschnitte zur weiteren Evaluation bereitstanden, lässt sich letztlich nicht klären, ob es sich um wenige heterozygote Mutationen in den Schmelzkurven handelt. Im SNSCC-Kollektiv hingegen gab es keinerlei Abweichung in den Schmelzkurven und somit muss bei allen Fällen von einem Wildtyp-KRAS in Exon 2 und 3 ausgegangen werden. Bisher wurden nur wenige Studien über dieses Gen bei sinunasalen Malignomen veröffentlicht. In einem Review von Franchi et al. wird die Mutationsfrequenz mit 1% für Plattenepithelkarzinome angegeben. (Franchi et al. 2011). Somit weichen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht wirklich von denen anderer Gruppen ab, und es ist anzunehmen, dass KRAS-Mutationen bei SNSCC eine untergeordnete Rolle spielen.

BRAF

Ähnlich wie auch KRAS führen Mutationen im BRAF-Gen zu einem verminderten Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie und sind daher von Interesse bei allen Karzinomen, für die eine solche Behandlung zur Wahl steht (Hunt et al. 2014). Allerdings scheinen Mutationen in diesem Gen in den meisten Entitäten, wie auch in HNSCC, sehr selten zu sein (Weber et al. 2003, Suda et al. 2012). Diese Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und es wurden bis auf einen Polymorphismus in einzelnen Proben keine Mutationen gefunden.

Auch für SNSCC konnte diese Arbeit vorhergehende Ergebnisse bestätigen und es wurden keine Mutationen im BRAF-Gen gefunden (Lopez et al. 2012).

Demnach scheint BRAF bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches keine Rolle zu spielen und kann wohl in Folgeuntersuchungen zunehmend vernachlässigt werden.

PIK3CA

Der PI3K-PTEN-AKT Signalweg ist in ca. 50% der HNSCC verändert und kann zur Stimulierung von Tumorwachstum führen. Aus diesem Grund gibt es erste Versuche, spezifische Inhibitoren für diesen anzuwenden. Auch gibt es schon Inhibitoren, die direkt auf Mutationen von PIK3CA abzielen (Hunt et al. 2014). Um diese anwenden zu können, müssen natürlich zunächst Mutationen identifiziert werden, wobei die häufigsten im Exon 9 und 20 liegen, welche auch in dieser Studie untersucht wurden. Die Datenlage über Häufigkeiten von Mutationen bei HNSCC ist inkonsistent. So geben Hunt et al. in einem kürzlich veröffentlichten Review Mutationsfrequenzen von 5-15% an. In Einzelarbeiten jedoch findet man auch Ergebnisse ohne Mutationen (De Carvalho et al. 2013). Diese Ergebnisse decken sich mit den vorliegenden, wobei diese mit Vorsicht zu betrachten sind, da es sich um ein low risk Kollektiv handelt und dadurch schwere Mutationen eventuell seltener auftreten. Für SNSCC hingegen gibt es keine Daten über PI3K-Mutationen. Wenn man aber die Ergebnisse vorliegender Arbeit (5,2 %) mit denen der Literatur für HNSCC vergleicht, ergibt sich eine passende Frequenz, was für ein ähnliches Profil hinsichtlich dieses Signalweges sprechen könnte. Um die Ergebnisse weiter zu verifizieren, müssten PTEN und AKT auf Mutationen untersucht werden und eine vermehrte Aktivierung des Signalwegs, ähnlich wie bei HSNCC, nachgewiesen werden.

4.3 Expressionsmuster und T-Stadium

p53-Expression

In einer Studie über Expression von p53 in HNSCC konnte gezeigt werden, dass ca. 60% der Tumore das Protein überexprimieren. Dies war mit einem schlechteren Überleben, sowie einer schlechteren Differenzierung assoziiert (Boslooper et al. 2008). Auch im untersuchten HNSCC-Kollektiv gab es eine hohe Rate an Überexpression (46,2%), die jedoch als Gruppe signifikant mit einem besseren Überleben einherging. Ein Zusammenhang zwischen p53-Überexpression und Mutation von TP53 ließ sich in vorliegender Arbeit nicht finden. Insgesamt ist sich die Literatur uneins über Bedeutung und Einfluss auf das Überleben von p53 überexprimierenden Tumoren. So gibt es Studien in welchen eine p53-Expression mit Mutationen im TP53-Gen korrelierten, sowie andere, die diesen Zusammenhang

nicht fanden und andere Mechanismen der Stabilisierung des p53-Proteins vermuten (Nylander et al. 2000).

Für SNSCC gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Expression von p53 befassen haben, meist jedoch im Zusammenhang mit einer malignen Transformation von invertierten Papillomen zu SNSCC. Oncel et al. fanden in 33% der Tumoren eine stark erhöhte Expression und auch Katori et al. konnten eine signifikante Expressionssteigerung von p53 in malignen Tumoren der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen im Vergleich zur normalen Mucosa sehen (Katori et al. 2006, Oncel et al. 2011). Somit ist die Anzahl der gefundenen Samples in dieser Studie mit 56,8% eher hoch. Auch für SNSCC konnte keine Korrelation mit dem Mutationsstatus gefunden werden, jedoch gab es eine signifikante Korrelation zwischen einem höheren T-Stadium und positiver p53-Expression. Dies wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte an einer zunehmenden Inaktivierung und Bindung von p53 an andere Proteine, die im Zuge der Tumorprogression mutiert sind, liegen.

EGFR-Expression

Eine vermehrte Expression des EGFR ist für HNSCC schon lange bekannt und mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Leemans et al. 2011). Auch im verwendeten HNSCC-Kollektiv gab es eine sehr hohe Expressionsrate von 95% der auswertbaren Fälle. Eine Korrelation mit einem schlechteren Überleben konnte jedoch nicht gezeigt werden, da es nur zwei Fälle ohne Überexpression gab und daher keine Statistik berechnet werden konnte.

Für SNSCC ist die Datenlage auch in dieser Hinsicht schlecht und es gibt bisher außerhalb dieser Arbeitsgruppe kaum Daten zur Expression des EGFR in dieser Entität. So wurden in einer bereits veröffentlichten Studie eines Teilkollektivs des hier untersuchten 89% Samples mit einer Überexpression gefunden (Pickhard AC 2012). Im erweiterten Kollektiv nun sank die Zahl auf 43%, es konnte jedoch im Gegensatz zur vorherigen Studie eine signifikante Assoziation zu einem klinisch-pathologischen Parameter gefunden werden. So scheint die Expression, ähnlich der von p53, mit einem höheren Tumorstadium zu korrelieren. Signifikante Überlebensnachteile konnten nicht nachgewiesen werden, allerdings war das mittlere Gesamt- und rezidivfreie Überleben für EGFR-positive Tumoren kürzer als für negative. Dies könnte sich mit einer Vergrößerung des Kollektivs weiter verifizieren lassen.

4.4 Viraler Einfluss auf Metastasierung und Überleben

HPV

Ang et al. konnten zeigen, dass oropharyngeale HNSCC nach ihrem HPV-Status in Risikogruppen eingeteilt werden können und dass das Vorliegen von HPV in diesen Tumoren ein Faktor für ein besseres Überleben ist (Ang et al. 2010). Mit zunehmender Anzahl an bestätigenden Studien wurde gefordert, alle HNSCC nach ihrem HPV-Status zu klassifizieren und in Arbeiten, die sich mit HNSCC beschäftigen, HPV immer in der statistischen Auswertung zu berücksichtigen (Leemans et al. 2011). Um einen stabilen Beweis eines HPV-Befalls zu bekommen wird empfohlen, zwei etablierte Methoden zu verwenden und miteinander zu matchen (Lajer and von Buchwald 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die HPV In-situ-Hybridisierung, sowie die p16^{INK4A} immunhistochemische Färbung verwendet. Proben, die im Ergebnis übereinstimmten, wurden als positiv gewertet. Die Prävalenz von HPV in HNSCC wurde in einer größeren Metaanalyse mit 25,9% für alle Lokalisationen angegeben (Kreimer et al. 2005). Die Ergebnisse in vorliegender Arbeit bestätigen diese Zahl (20,5%) ebenso wie die Assoziation mit einem höheren T-Stadium (Lajer and von Buchwald 2010). Allerdings konnte kein signifikanter Überlebensvorteil ermittelt werden. Da jedoch ein Trend hierzu vorliegt, kann vermutet werden, dass bei einer ausgewogeneren T-Verteilung hin zu einem höheren T-Stadium auch diese Beobachtung verifiziert werden könnte.

Für SNSCC gibt es bisher kaum Publikationen, die den HPV-Status ermittelt haben. Meist behandeln Studien über sinunasale Neoplasien auch alle Entitäten, was eine spezifische Aussage hinsichtlich Plattenepithelkarzinomen schwierig macht. Jedoch fanden Alos et al. bei SNSCC und HNSCC ein ähnliches Risikoprofil. So konnte auch für SNSCC gezeigt werden, dass Patienten mit einem HPV-positiven Tumor ein besseres Überleben aufweisen (Alos et al. 2009). In einer Metaanalyse aller Arbeiten zu diesem Thema wurden Prävalenzen von bis zu 30% in SNSCC ermittelt, wobei es jedoch von Studie zu Studie große Unterschiede gab. Die hier ermittelte Prävalenz von 9,7% ist eher niedrig, jedoch wurden, wie oben beschrieben, auch nur die Fälle als HPV-infiziert erachtet, die in beiden Methoden ein positives Ergebnis aufwiesen. Es scheint auch methodische Unterschiede zu geben, wobei diese laut den Autoren der Analyse nicht signifikant zu sein scheinen (Syrjanen and Syrjanen 2013).

EBV

Die Rolle von EBV in HNSCC ist einigermaßen bekannt und wird zumeist mit Nasopharynxkarzinomen assoziiert, wo es laut einigen Autoren zur Metastasierung führt. Vor allem in Ländern mit hohen Prävalenzen dieser Entität wird sie daher intensiv beforscht. Man versucht dort sogar, Proteine des Virus als Ziele einer targeted therapy zu nutzen (Kaneda et al. 2012, Yoshizaki et al. 2012). So überrascht es nicht, dass in vorliegender Arbeit, bei der nur HNSCC von Mundhöhle, Oro-, Hypopharynx und Larynx ausgewertet wurden, keine hohe Infektionsrate gefunden wurde, wie auch kein signifikanter Einfluss auf Überleben oder Metastasierung.

Für SNSCC jedoch, eine Entität, die überhaupt selten metastasiert, konnte hier zum ersten Mal eine signifikante Assoziation von EBV und Metastasenbildung gezeigt werden. Bisher gab es nur wenige Studien, die sich mit EBV bei sinunasalen Karzinomen beschäftigten und ihre Ergebnisse waren inkonsistent. Meist war EBV dort mit undifferenzierten und NK/T-Zell Lymphomen assoziiert und kam vor allem in asiatischen Populationen vor (Leung et al. 1995, Gao et al. 2000, Gotte and Hormann 2004). In vorliegender Studie war beinahe die Hälfte aller Proben positiv für EBV. Zudem waren alle sechs Fälle, die bei Diagnose, oder im Verlauf Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen hatten, EBV-positiv. Diese Korrelation war statistisch signifikant. Zudem wurden die Lymphknotenmetastasen selbst auf EBV untersucht und auch hier konnte in allen Proben ein positiver Nachweis erbracht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass EBV in SNSCC, ähnlich wie bei Nasopharynxkarzinomen, zur Metastasierung beiträgt. Der Mechanismus wird in einer EBV- (durch LMP2A) vermittelten Beeinflussung von Notch1 und dadurch mitochondrialer Proteine vermutet, was zur verstärkten Zellmigration führt (Pal et al. 2014). Dieser Mechanismus sollte in Folgestudien eingehend überprüft werden. Bei Bestätigung könnte dadurch eine Therapieempfehlung für SNSCC ausgesprochen werden hinsichtlich der Früherkennung von metastasenbildenden Tumoren, die dann einer selektiven Neck Dissection oder Bestrahlung der Lymphabflusswege zugeführt werden sollten.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, das seltene Plattenepithelkarzinom der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhle genauer zu charakterisieren und Unterschiede zum

Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Pharynx und Larynx aufzudecken. Ferner sollten molekulare bzw. virale Marker gefunden werden, die mit einer Metastasierung von SNSCC assoziiert sind.

Hierzu wurden zwei Patientenkollektive (SNSCC und HNSCC) der HNO-Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar miteinander verglichen. Als molekulare Marker wurden die Gene für den EGFR, KRAS, BRAF, die PI3K und TP53 auf Mutationen untersucht. Zudem wurde das Proteinexpressionsmuster für den EGFR, p16^{INK4a} und p53 betrachtet. Für den infektiologischen Teil der Arbeit wurden die Tumore auf das Vorliegen von HPV und EBV untersucht.

In der Zusammenschau der molekularbiologischen Untersuchungen von HNSCC und SNSCC schienen sich die beiden Kollektive relativ ähnlich zu sein. Die Mutationsfrequenz der genannten Gene war beinahe identisch, und auch bei den Expressionsmustern und der Assoziation der Marker zu klinischen Parametern gab es keine großen Abweichungen.

Bei den Ergebnissen der virologischen Untersuchungen hingegen gab es starke Abweichungen zwischen den Vergleichskollektiven. So war die Infektionsrate von HPV bei SNSCC niedriger als bei HNSCC und war nicht mit klinischen Verlaufparametern assoziiert. Interessant war das Ergebnis für die Untersuchungen auf eine Infektion mit EBV. Hier zeigte sich, dass zum einen SNSCCs deutlich häufiger EBV-positiv waren als HNSCCs und zum anderen eine signifikante Assoziation zwischen einem EBV-Nachweis im Tumorgewebe und der Ausbildung von Lymphknoten bzw. Fernmetastasen bei SNSCCs bestand. So waren alle Primarien, von denen eine Metastasierung ausging, sowie die untersuchten Lymphknotenmetastasen selbst EBV-positiv.

Schlussfolgernd kann man also sagen, dass sich SNSCC und HNSCC trotz der ähnlichen Profile auf genetischer und Proteinebene insbesondere in ihrer Metastasierungsfrequenz und den damit assoziierten Markern unterscheiden. Da es für SNSCC bisher keine eindeutige Empfehlung zur Behandlung der Halslymphknoten gibt, wäre der Zusammenhang zwischen positivem EBV-Nachweis und Metastasierung ein Ansatz für weitere Studien, die evtl. zu einer Empfehlung zur Neck Dissection bei EBV-Nachweis führen könnten.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des EGFR Signalwegs.....	10
Abb. 2: BRAF c.1821c>t, silent mutation.....	32
Abb. 3: Abb. 3: PIK3CA c.1624g>a, p.E542K.....	33
Abb. 4: Abb. 4: PIK3CA c.3140a>t, p.H1047L.....	33
Abb. 5: TP53 c.400t>g, p.F134V.....	34
Abb. 6: TP53 c.454c>g, c.457c>t, c.460_472del.....	34
Abb. 7: TP53 c.462c>t, silent mutation.....	34
Abb. 8: TP53 c.524g>a, p.R175H.....	34
Abb. 9: TP53 c.527g>t, p.C176F.....	34
Abb. 10: TP53 c.535c>t, p.H179Y.....	34
Abb. 11: TP53 c.638g>t, p.R213L.....	34
Abb. 12: TP53 c.659a>g, p.Y220C.....	35
Abb. 13: TP53 c.743g>t, p.R248L.....	35
Abb. 14: TP53 c752t>g, p.I251S.....	35
Abb. 15: TP53 c.766a>g, p.T256A.....	35
Abb. 16: Beispiel einer Amplifikations- und Schmelzkurve der semiquantitativen RT-PCR.....	36
Abb. 17: In-situ-Hybridisierung für EBV, 63x Vergrößerung mit Immersionsöl.....	37
Abb. 18: In-situ-Hybridisierung für HPV, 63x Vergrößerung mit Immersionsöl.....	37
Abb. 19: Immunhistochemische Darstellung von p16 ^{INK4A} , 10-fache Vergrößerung.....	38
Abb. 20: Immunhistochemische Darstellung von p53, 20-fache Vergrößerung.....	38
Abb. 21: Immunhistochemische Darstellung des EGFR, 20-fache Vergrößerung.....	39
Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der TP53-Mutationen bzgl. des Gesamtüberlebens von SNSCC-Patienten.....	44
Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der p53-Expression bzgl. des Gesamtüberlebens von HNSCC-Patienten.....	44

Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz von EBV-RNA bzgl. des rezidivfreien Überlebens von HNSCC-Patienten.....	46
Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz von EBV-RNA bzgl. des metastasenfremen Überlebens von SNSCC-Patienten.....	47

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation.....	2
Tab. 2: Stadieneinteilung der HNSCC.....	3
Tab. 3: Verwendete Patientenkollektive.....	14
Tab. 4: Verwendete Kits.....	14
Tab. 5: Verwendete Reagenzien und Enzyme.....	15
Tab. 6: Gemischte Reagenzien und Puffer.....	15
Tab. 7: Antikörper, Hybridisierungs sonden mit Positivkontrolle.....	16
Tab. 8: Verwendete Geräte.....	17
Tab. 9: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tab. 10: Computerprogramme.....	18
Tab. 11: Reagenzien cDNA-Synthese.....	20
Tab. 12: Reagenzien PCR.....	21
Tab. 13: Primersequenzen Real-Time-PCR.....	23
Tab. 14: Reagenzien Real-Time-PCR.....	24
Tab. 15: Primersequenzen HRMA.....	25
Tab. 16: Reagenzien HRM.....	25
Tab. 17: Score für IHC.....	27
Tab. 18: Charakterisierung der Kollektive.....	30
Tab. 19: Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen und Sanger-Sequenzierungen	32
Tab. 20: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR.....	35
Tab. 21: Häufigkeiten positiver Versuchsergebnisse nach Kollektiven.....	37
Tab. 22: Signifikanzen der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen Markerauspression und klinischen Daten.....	40
Tab. 23: Signifikanzen der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen HPV- oder EBV-Infektion und Nikotin- und Alkoholkonsum.....	40
Tab. 24: Kreuz-Tabelle EBV ISH vs. Metastasen (bei Erstdiagnose und als Rezidiv) bei SNSCC.....	41

Tab. 25: Kreuz-Tabelle EBV ISH vs. Rezidiv (Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv und Fernmetastasierung) bei HNSCC.....	41
Tab. 26: Kreuz-Tabelle HPV und p16 ^{INK4A} Status vs. T-Stadium bei HNSCC.....	41
Tab. 27: Kreuz-Tabelle EGFR Expression vs. T-Stadium bei SNSCC.....	42
Tab. 28: Kreuz-Tabelle p53 Expression vs. T-Stadium bei SNSCC.....	42
Tab. 29: Gesamtüberleben aus Kaplan-Meier-Analysen.....	43
Tab. 30: Rezidivfreies Überleben aus Kaplan-Meier-Analysen.....	45
Tab. 31: Metastasenfreies Überleben aus Kaplan-Meier-Analysen.....	46

6.3 Literaturverzeichnis

"<nejmoa0912217.pdf>."

Alos, L., S. Moyano, A. Nadal, I. Alobid, J. L. Blanch, E. Ayala, B. Lloveras, W. Quint, A. Cardesa and J. Ordi (2009). "Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome." *Cancer* **115**(12): 2701-2709.

Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tan, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond and M. L. Gillison (2010). "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer." *N Engl J Med* **363**(1): 24-35.

Bandoh, N., T. Hayashi, K. Kishibe, M. Takahara, M. Imada, S. Nonaka and Y. Harabuchi (2002). "Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma." *Cancer* **94**(7): 1968-1980.

Bernier, J., C. Domenge, M. Ozsahin, K. Matuszewska, J. L. Lefebvre, R. H. Greiner, J. Giralt, P. Maingon, F. Rolland, M. Bolla, F. Cognetti, J. Bourhis, A. Kirkpatrick and M. van Glabbeke (2004). "Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer." *N Engl J Med* **350**(19): 1945-1952.

Böcker, W. and P. U. Heitz (2008). *Pathologie*, Elsevier, Urban & Fischer.

Boeckx, C., C. Weyn, I. Vanden-Bempt, V. Deschoolmeester, A. Wouters, P. Specenier, C. Van Laer, D. Van den Weyngaert, M. Kockx, J. B. Vermorcken, M. Peeters, P. Pauwels, F. Lardon and M. Baay (2014). "Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response." *BMC Res Notes* **7**(1): 337.

Boslooper, K., A. King-Yin Lam, J. Gao, S. Weinstein and N. Johnson (2008). "The clinicopathological roles of alpha-B-crystallin and p53 expression in patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Pathology* **40**(5): 500-504.

Campo-Trapero, J., J. Cano-Sanchez, B. Palacios-Sanchez, J. J. Sanchez-Gutierrez, M. A. Gonzalez-Moles and A. Bascones-Martinez (2008). "Update on molecular pathology in oral cancer and precancer." Anticancer Res **28**(2B): 1197-1205.

Cardesa, A. and P. J. Slootweg (2006). Pathology of the Head and Neck, Springer.

Cooper, J. B. and E. E. W. Cohen (2009). "Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in head and neck cancer." Head & Neck **31**(8): 1086-1094.

Cunningham, D., Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau and E. Van Cutsem (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-345.

Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. C. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.

De Carvalho, T. G., A. C. De Carvalho, D. C. Maia, J. K. Ogawa, A. L. Carvalho and A. L. Vettore (2013). "Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma." Oncol Rep **30**(1): 334-340.

Deschoolmeester, V., C. Boeckx, M. Baay, J. Weyler, W. Wuyts, E. Van Marck, M. Peeters, F. Lardon and J. B. Vermorken (2010). "KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis." Br J Cancer **103**(10): 1627-1636.

Dijkstra, J. R., D. A. M. Heideman, G. A. Meijer, J. E. Boers, N. A. Hart, J. Diebold, A. Hirschmann, G. Hoefler, G. Winter, G. Miltenberger-Miltenyi, S. V. Pereira, S. D. Richman, P. Quirke, E. L. Rouleau, J. M. Guinebretiere, S. Tejpar, B. Biesmans and J. H. J. M. Krieken (2013). "KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance." Virchows Archiv **462**(1): 39-46.

Ellis, C. A. and G. Clark (2000). "The importance of being K-Ras." Cellular Signalling **12**(7): 425-434.

Franchi, A., L. Miligi, A. Palomba, L. Giovannetti and M. Santucci (2011). "Sinonasal carcinomas: Recent advances in molecular and phenotypic characterization and their clinical implications." Critical Reviews in Oncology/Hematology **79**(3): 265-277.

Gao, P. F., W. X. Chen, L. Y. Xiao and X. J. Yan (2000). "[Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in sinonasal malignant neoplasms]." Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi **14**(8): 347-348.

Gordon, I., P. Boffetta and P. A. Demers (1998). "A case study comparing a meta-analysis and a pooled analysis of studies of sinonasal cancer among wood workers." Epidemiology **9**(5): 518-524.

Gotte, K. and K. Hormann (2004). "Sinonasal malignancy: what's new?" ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec **66**(2): 85-97.

Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh and R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-417.

Hoffmann, M., N. Klose, S. Gottschlich, T. Gorogh, A. Fazel, C. Lohrey, W. Rittgen, P. Ambrosch, E. Schwarz and T. Kahn (2006). "Detection of human papillomavirus DNA in benign and malignant sinonasal neoplasms." Cancer Lett **239**(1): 64-70.

Holmila, R., J. Bornholdt, P. Heikkilä, T. Suijala, J. Fevotte, D. Cyr, J. Hansen, S. M. Snellman, M. Dictor, T. Steiniche, V. Schlunssen, T. Schneider, E. Pukkala, K. Savolainen, H. Wolff, H. Wallin, D. Luce and K. Husgafvel-Pursiainen (2010). "Mutations in TP53 tumor suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer." Int J Cancer **127**(3): 578-588.

Hunt, J. L., L. Barnes, J. S. Lewis, Jr., M. E. Mahfouz, P. J. Slotweg, L. D. Thompson, A. Cardesa, K. O. Devaney, D. R. Gnepp, W. H. Westra, J. P. Rodrigo, J. A. Woolgar, A. Rinaldo, A. Triantafyllou, R. P. Takes and A. Ferlito (2014). "Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications." Eur Arch Otorhinolaryngol **271**(2): 211-223.

Hunter, K. D., E. K. Parkinson and P. R. Harrison (2005). "Profiling early head and neck cancer." Nat Rev Cancer **5**(2): 127-135.

Kaneda, A., K. Matsusaka, H. Aburatani and M. Fukayama (2012). "Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis." Cancer Res **72**(14): 3445-3450.

Katori, H., A. Nozawat and M. Tsukuda (2006). "Relationship between p21 and p53 expression, human papilloma virus infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma." Clin Oncol (R Coll Radiol) **18**(4): 300-305.

Khademi, B., A. Moradi, S. Hoseini and M. Mohammadianpanah (2009). "Malignant neoplasms of the sinonasal tract: report of 71 patients and literature review and analysis." Oral Maxillofac Surg **13**(4): 191-199.

Kreimer, A. R., G. M. Clifford, P. Boyle and S. Franceschi (2005). "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(2): 467-475.

Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögren, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Molecular Aspects of Medicine **27**(2-3): 95-125.

Lajer, C. B. and C. von Buchwald (2010). "The role of human papillomavirus in head and neck cancer." APMIS **118**(6-7): 510-519.

Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Y. Kim, H. K. Nam, W. S. Park, S. W. Nam, M. S. Kim, D. I. Sun, Y. S. Lee, J. J. Jang, J. Y. Lee, N. J. Yoo and S. H. Lee (2005). "Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck." Clin Cancer Res **11**(8): 2879-2882.

Leemans, C. R., B. J. Braakhuis and R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

Leung, S. Y., S. T. Yuen, L. P. Chung, W. K. Kwong, M. P. Wong and S. Y. Chan (1995). "Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas." Am J Surg Pathol **19**(9): 994-1001.

Levine, A. J. (1997). "p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division." Cell **88**(3): 323-331.

Licitra, L., S. Storkel, K. M. Kerr, E. Van Cutsem, R. Pirker, F. R. Hirsch, J. B. Vermorken, A. von Heydebreck, R. Esser, I. Celik and F. Ciardiello (2013). "Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies." Eur J Cancer **49**(6): 1161-1168.

Loeffler-Ragg, J., M. Witsch-Baumgartner, A. Tzankov, W. Hilbe, I. Schwentner, G. M. Sprinzi, G. Utermann and H. Zwierzina (2006). "Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma." Eur J Cancer **42**(1): 109-111.

Lopez, F., C. Garcia Inclan, J. Perez-Escuredo, C. Alvarez Marcos, B. Scola, C. Suarez, J. L. Llorente and M. A. Hermsen (2012). "KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer." Oral Oncol **48**(8): 692-697.

Lowy, D. R. and B. M. Willumsen (1993). "Function and regulation of ras." Annu Rev Biochem **62**: 851-891.

Mast, G. (2009). Kopf-Hals-Malignome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Zuckschwerdt Verlag.

Nylander, K., E. Dabelsteen and P. A. Hall (2000). "The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck." J Oral Pathol Med **29**(9): 413-425.

Oncel, S., T. Cosgul, A. Calli, C. Calli and E. Pinar (2011). "Evaluation of p53, p63, p21, p27, ki-67 in paranasal sinus squamous cell carcinoma and inverted papilloma." Indian J Otolaryngol Head Neck Surg **63**(2): 172-177.

Pal, A. D., N. P. Basak, A. S. Banerjee and S. Banerjee (2014). "Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A alters mitochondrial dynamics promoting cellular migration mediated by Notch signaling pathway." Carcinogenesis.

- Perez-Ordenez, B., M. Beauchemin and R. C. Jordan (2006). "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Pathol **59**(5): 445-453.
- Pickhard, A., F. Durst, R. Staudenmaier and R. Reiter (2012). "Management und Prognose von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen." Laryngo-Rhino-Otologie **91**(10): 627-632.
- Pickhard AC, Piontek G, Knopf A, Stark T, Boulesteix AL, Staudenmaier R and Reiter R (2012). "Expression of STK15, EGFR, p53 and p16INK4A by Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the Nasal Cavity and the Paranasal Sinuses." J Otol Rhinol **1:2**.
- Porceddu, S., J. Martin, G. Shanker, L. Weih, C. Russell, D. Rischin, J. Corry and L. Peters (2004). "Paranasal sinus tumors: Peter maccallum cancer institute experience." Head & Neck **26**(4): 322-330.
- Qiu, W., F. Schonleben, X. Li, D. J. Ho, L. G. Close, S. Manolidis, B. P. Bennett and G. H. Su (2006). "PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(5): 1441-1446.
- Ragin, C. C., F. Modugno and S. M. Gollin (2007). "The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus." J Dent Res **86**(2): 104-114.
- Recio, L., S. Sisk, L. Pluta, E. Bermudez, E. A. Gross, Z. Chen, K. Morgan and C. Walker (1992). "p53 mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats." Cancer Res **52**(21): 6113-6116.
- Reed, G. H., J. O. Kent and C. T. Wittwer (2007). "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics." Pharmacogenomics **8**(6): 597-608.
- Reed, G. H. and C. T. Wittwer (2004). "Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis." Clin Chem **50**(10): 1748-1754.
- Robbins, K. T., A. Ferlito, C. E. Silver, R. P. Takes, P. Strojan, C. H. Snyderman, R. de Bree, M. Haigentz, Jr., J. A. Langendijk, A. Rinaldo, A. R. Shaha, E. Y. Hanna, J. A. Werner and C. Suarez (2011). "Contemporary management of sinonasal cancer." Head Neck **33**(9): 1352-1365.
- Safran, M., I. Dalah, J. Alexander, N. Rosen, T. Iny Stein, M. Shmoish, N. Nativ, I. Bahir, T. Doniger, H. Krug, A. Sirota-Madi, T. Olender, Y. Golan, G. Stelzer, A. Harel and D. Lancet (2010). "GeneCards Version 3: the human gene integrator." Database (Oxford) **2010**: baq020.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.

Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." Science **304**(5670): 554.

Schauer, A., H. Rothe, I. Balzer, I. Fiebig and H. Rauschecker (1988). "[Immunohistochemical tumor diagnosis in breast cancer--use for assessing the stage and biology of so-called "small breast cancer"]." Rontgenblatter **41**(8): 340-344.

Smilek, P., J. Neuwirthova, J. Jarkovsky, L. Dusek, J. Rottenberg, R. Kostrica, J. Srovnal, M. Hajduch, J. Drabek and J. Klozar (2012). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas." Neoplasma **59**(5): 508-515.

Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2011). TNM Classification of Malignant Tumours, John Wiley & Sons.

Sok, J. C., F. M. Coppelli, S. M. Thomas, M. N. Lango, S. Xi, J. L. Hunt, M. L. Freilino, M. W. Graner, C. J. Wikstrand, D. D. Bigner, W. E. Gooding, F. B. Furnari and J. R. Grandis (2006). "Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting." Clin Cancer Res **12**(17): 5064-5073.

Stadler, M. E., M. R. Patel, M. E. Couch and D. N. Hayes (2008). "Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways." Hematol Oncol Clin North Am **22**(6): 1099-1124, vii.

Steuer-Vogt, M. K., V. Bonkowsky, P. Ambrosch, M. Scholz, A. Neiss, J. Strutz, M. Hennig, T. Lenarz and W. Arnold (2001). "The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial." Eur J Cancer **37**(1): 23-31.

Strutz, J. and W. Mann (2009). Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Thieme Georg Verlag.

Suda, T., T. Hama, S. Kondo, Y. Yuza, M. Yoshikawa, M. Urashima, T. Kato and H. Moriyama (2012). "Copy number amplification of the PIK3CA gene is associated with poor prognosis in non-lymph node metastatic head and neck squamous cell carcinoma." BMC Cancer **12**: 416.

Syrjanen, K. and S. Syrjanen (2013). "Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis." Hum Pathol **44**(6): 983-991.

Szabo, B., G. A. Nelhubel, A. Karpati, I. Kenessey, B. Jori, C. Szekely, I. Petak, G. Lotz, Z. Hegedus, B. Hegedus, T. Fule, B. Dome, J. Timar and J. Tovari (2011). "Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas." Oral Oncol **47**(6): 487-496.

Turner, J. H. and D. D. Reh (2012). "Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data." Head Neck **34**(6): 877-885.

Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.

Voldborg, B. R., L. Damstrup, M. Spang-Thomsen and H. S. Poulsen (1997). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials." Annals of Oncology **8**(12): 1197-1206.

Weber, A., L. Langhanki, F. Sommerer, A. Markwart, C. Wittekind and A. Tannapfel (2003). "Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck." Oncogene **22**(30): 4757-4759.

Weinberg, R. A. (2007). The biology of cancer, Garland Science.

Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.

Yoshimoto, K., J. Dang, S. Zhu, D. Nathanson, T. Huang, R. Dumont, D. B. Seligson, W. H. Yong, Z. Xiong, N. Rao, H. Winther, A. Chakravarti, D. D. Bigner, I. K. Mellingshoff, S. Horvath, W. K. Cavenee, T. F. Cloughesy and P. S. Mischel (2008). "Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples." Clin Cancer Res **14**(2): 488-493.

Yoshizaki, T., M. Ito, S. Muro, N. Wakisaka, S. Kondo and K. Endo (2012). "Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma." Auris Nasus Larynx **39**(2): 137-144.

Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-768.

Zhang, N., K. Erjala, J. Kulmala, X. Qiu, M. Sundvall, K. Elenius and R. Grenman (2009). "Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro." Radiother Oncol **92**(3): 388-392.

Ziegler, A., S. Lange and R. Bender (2007). "Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode." Dtsch med Wochenschr **132**(S 01): e36-e38.

Ziegler, A., S. Lange and R. Bender (2007). "Überlebenszeitanalysen: Der Log-Rank-Test." Dtsch med Wochenschr **132** **Suppl 1**: e39-41.

6.4 Ergebnisübersicht

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse aus den Sequenzanalysen und den immunhistochemischen Untersuchungen der beiden Kollektive aufgeführt. Es sind hierbei nur Gene aufgeführt, bei denen eine Veränderung vorlag.

Probe	TP53 ¹	BRAF ¹	EGFR VIII ³	EGFR ²	p16 ²	p53 ²	HPV ²	EBV ²
13				6	-	7	pos.	
14				-	-	-	-	-
15	c.817c>t			-	-	-	-	-
16				-	-	-		
17				5	5	6	pos.	pos.
18	c.713g>a			7	5	6		pos.
19				5	-	6	-	
20	c.820g>c			5	7	7		
21/22	c.488t>a			5	2	7		
23			pos.	-	-	-		-
24				-	-	-		
25				5	-	5		-
26				-	6	2		-
27				-	-	2	-	
28				5	6	6	-	-
29	c.583a>t		pos.	6	5	2	-	
30			pos.	7	5	7	-	
31	c.746g>a			5	-	6		
32				5	4	0		
33	c.838a>g			7	6	2	pos.	
34				5	4	7		
35				5	-	0	pos.	
36	c.747_775del 29			5	7	3		
37				7	-	0		
38	c.742c>t, c.818g>t			-	-	-	-	
39				6	-	7		pos.
40				6	6	7	-	

41	pos.	7	-	6		
42		6	-	2		
43		0	5	6	pos.	
44	c.796g>a	5	-	0		pos.
45		-	-	-		
46		-	6	-		
47		5	5	5		pos.
48		-	-	-	-	
49		-	-	-	-	-
50		-	-	-	-	
51		6	5	7		-
52		5	6	4		
53		5	5	3	pos.	pos.
54	c.646g>a	6	-	0	-	
55		-	-	-		-
56	pos.	5	4	3		
57		-	-	-	-	-
58/59		7	4	7		-
60		5	7	3		
61		-	-	-	-	-
62		-	-	-	-	-
63		5	7	7	pos.	
64	c.1821c>t	7	5	6		
65		-	-	-	-	-
66		-	-	-	-	-
67		-	-	-	-	-
68		6	-	0	-	
69		2	4	3		
70	pos.	5	-	2	pos.	
71	c.639a>g	7	5	5		
72		6	5	0	-	
73		-	-	-		pos.

74		-	-	-	-	-
75	c.752t>g	c.1821c>t	5	-	7	
76			6	0	0	
77			6	-	3	-
78			6	-	-	-
79			7	-	7	-

Tab. : Ergebnisübersicht HNSCC

¹ Ergebnisse der Sequenzanalysen

² Ergebnisse der Immunhistochemie, Erklärung des verwendeten Scores siehe S. 27

³ Ergebnisse der Real-Time-PCR

- Keine Daten

Probe	TP53 ¹	PIK3CA ¹	EGFR vIII ³	EGFR ²	p16 ²	p53 ²	HPV ²	EBV ²
1				4	0	6		
2	c.462c>t			0	4	4		
3	c.462c>t			2	2	3		pos.
4		c.1624g>a	pos.	5	0	7		
5				0	5	3		
6				0	4	3		pos.
7	c.524g>a			0	0	0		
8				-	-	-	-	-
9				3	7	4		pos.
10	c.462c>t			3	0	5		
11				4	3	4		pos.
12	c.743g>c		pos.	0	0	3		pos.
13				0	6	2		
14				3	7	3		
15				0	2	2		pos.
16				0	0	7		pos.
17	c.638g>t			3	0	5		pos. pos.
18				2	6	0		
19			pos.	6	6	4		pos. pos.
20				0	2	3		pos. pos.
21		c.3140a>t		0	7	5		pos. pos.

22	c.462c>t			0	3	0		pos.
23	c.400t>g			0	4	2		pos.
24	c.527g>t			0	7	7		
25				0	0	0		
26				5	7	2	pos.	pos.
27				0	0	5		pos.
28				0	2	0		pos.
29	c.462c>t		pos.	4	5	5		
30				2	4	3		pos.
31				0	2	0	pos.	pos.
32	c.752t>g			0	0	0		
33	c.527g>t			4	0	4		
34				0	6	2		
35	c.766a>g			-	-	-	-	-
36			pos.	2	2	6		
37				0	0	5		
38				3	6	0		
39	-	-	-	6	6	0		pos.
40	-	-	-	6	0	2		pos.
41	-	-	-	4	0	4	pos.	pos.
42	-	-	-	5	0	0		
43	-	-	-	7	6	0		
44	-	-	-	4	5	6		

Tab. : Ergebnisübersicht SNSCC

¹ Ergebnisse der Sequenzanalysen

² Ergebnisse der Immunhistochemie, Erklärung des verwendeten Scores siehe S. 27

³ Ergebnisse der Real-Time-PCR

- Keine Daten

Danksagung

An allererster Stelle gilt mein herzlicher Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Anja Pickhard. Sie stand mir bei allen Aufgaben immer mit Rat und Tat zur Seite und wurde es nie müde, eine weitere Fassung der Arbeit zu lesen und zu korrigieren. Das Gelingen dieser Arbeit hing maßgeblich von ihrer außerordentlich engagierten Unterstützung ab. Neben der Betreuung meiner Dissertation war und ist sie auf meinem Weg in den Beruf eine wertvolle Mentorin für mich.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Guido Piontek bedanken, dem ich alle experimentellen Fertigkeiten zu verdanken habe, und der mich bei der Versuchsplanung und -durchführung immer unterstützt hat. Auch danke ich ihm für die unermüdlichen Korrekturen des Manuskripts.

Auch möchte ich Herrn Univ. Prof. Dr. med. Henning Bier danken, dessen onkologisches Labor meine Doktorarbeit erst möglich machte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. Heinz Höfler und bei Herrn Dr. rer. nat. Marcus Bettstetter, die mir den Arbeitsplatz für die Schmelzkurvenanalysen bereitstellten. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Herrn Dr. rer. nat. Marcus Bettstetter für die fachliche Betreuung bei diesen Versuchen.