

Klinische und therapeutische Relevanz von viralen Onkogenen bei sinunasalen Plattenepithelkarzinomen

Thomas Christian Fritz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth
2. Priv.-Doz. Dr. Jennifer Altomonte

Die Dissertation wurde am 17.01.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
Das Plattenepithelkarzinom der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen sowie des Kopf- Hals-Bereiches	6
1.1 Begriffsabgrenzung	6
1.2 Epidemiologie	6
1.3 Symptomatik	7
1.4 Klassifikation.....	8
1.5 Ätiologie und Risikofaktoren	12
1.6 Pathologie.....	13
1.7 Molekularpathologie	13
1.8 Therapie.....	15
1.9 Prognose.....	16
2 Virale Onkogene	18
2.1 Epstein-Barr-Virus.....	18
2.2 Humanes Papillomavirus	19
2.3 Diagnostik der viralen Onkogene	19
3 Zielsetzung	21
4 Material und Methoden	22
4.1 Material.....	22
4.1.1 Patientenkollektiv	22
4.1.2 Verwendete Kits zur HPV und EBV-Detektierung	23
4.1.3 Reagenzien	24
4.1.5 Antikörper, Hybridisierungssonden für Immunhistochemie und In situ Hybridisierung	25
4.1.6 Primer und Sonden für die quantitative real-time PCR zur Zellzahlbestimmung... ..	25
4.1.7 Primer und Sonden für den EBV-Nachweis mittels quantitativer real-time PCR	26
4.1.8 Geräte	27
4.1.9 Verbrauchsmaterialien	28
4.1.10 Computerprogramme	28
4.2 Methoden	29
4.2.1 Experimenteller Teil	29
4.2.2 Statistischer Teil	41

5 Ergebnisse	42
5.1 <i>Charakterisierung der Kollektive</i>	42
5.2 <i>Statistische Auswertung</i>	52
5.2.1 <i>Kreuztabellen</i>	53
5.2.2 <i>Überlebenskurven</i>	59
6 Diskussion	63
6.1 <i>Deskriptive Statistik</i>	64
6.2 <i>Einfluss des Trägerstatus für Onkoviren auf Überleben und Metastasierung</i>	66
6.3 <i>Anwendungsproblematik und kritische Beurteilung der Methoden</i>	70
7 Zusammenfassung	72
8 Verzeichnisse	74
8.1 <i>Abbildungsverzeichnis</i>	74
8.2 <i>Tabellenverzeichnis</i>	75
8.3 <i>Literaturverzeichnis</i>	77
9 Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

HNSCC	head and neck squamous cell cancer
SNSCC	sinonasal squamous cell cancer
HPV	humanes Papillomavirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
NPC	Nasopharynxkarzinom
Rez.	Rezidiv
ISP	invertiertes sinunasales Papillom
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
WHO	world health organization
TNF	Tumor Nekrose Faktor
IL-1 β	Interleukin - 1 Beta
NF- κ B	Nuclear-Factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
COX 2	Cyclooxygenase 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
KRAS, HRAS, NRAS	Kirsten-, Harvey- und Neuroblastoma Rat Sarcoma Virus Oncogene Homolog
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
SOX2	Sex Determining Region Y – Box 2
CD	Cluster of Differentiation
CCND1	Cyclin D1 kodierendes Gen

CTTN	Cortactin kodierendes Gen
ND	Neck Dissection
NK	Natural Killer
LMP	latentes Membranprotein
miRNAs	micro-RNA
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBER	Epstein-Barr virus-encoded small RNAs
E2Fs	Transkriptionsfaktor
CDK	Cyclin abhängige Kinase
ISH	In Situ Hybridisierung
IHC	Immunhistochemie
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
rpm	rounds per minute
Ct	cycle threshold
ef	exakter Test nach Fisher
cq	Chi-Quadrat-Test nach Pearson
USA	United States of America
vs.	versus

1 Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen sowie des Kopf-Hals-Bereiches

1.1 Begriffsabgrenzung

Zu den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gehören Tumore der Nase, der Nasennebenhöhlen, der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oro- und Hypopharynx sowie des Larynx. In dieser Arbeit wurden die Plattenepithelkarzinome nochmals unterteilt in SNSCC (sinonasal squamous cell cancer) und HNSCC (head and neck squamous cell cancer). Bei den SNSCC kann das Karzinom folglich in Nasenhaupt-, Keilbein-, Stirn-, Kieferhöhlen und Siebbeinzellen liegen, während bei den HNSCC das Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle, dem Naso- Oro- und Hypopharynx und Larynx liegt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit befasst sich mit den SNSCCs.

1.2 Epidemiologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches stellen mit jährlich etwa 630.000 Erstdiagnosen die sechsthäufigste Krebsart weltweit dar und verursachen den Tod von etwa 350.000 Personen jedes Jahr (Parkin et al., 2005; Vigneswaran et al., 2014).

Sinunasale Tumoren gehören mit lediglich 5% der Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches und weniger als 1% aller Malignome zu den seltenen Entitäten. Der am meisten vorkommende histologische Typus ist mit 35-38% das Plattenepithelkarzinom (SNSCC) (Sanghvi et al., 2014). An zweiter und dritter Stelle kommen adenoid-zystische und Adenokarzinome (Tomazic, 2017). Malignome der paranasalen Sinus sind zu 60-75% Plattenepithelkarzinome (Sanghvi et al., 2014). Es bestehen sowohl Unterschiede in der Lokalisation als auch in der Geschlechterverteilung. Am häufigsten sind die Kieferhöhlen betroffen, gefolgt von der Nasenhaupthöhle. Vergleicht man hingegen die Nasenhaupthöhle mit allen paranasalen Sinus zusammen, so sehen wir in der Nasenhaupthöhle (46,08%) weniger SNSCCs als paranasal (53,92%). Männer (64,44%) sind fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen (35,56%). Somit ergibt sich eine Prävalenz von Männern zu Frauen für das Vorhandensein eines SNSCC von

1,81:1. Bei der Gesamtinzidenz liegt die Ratio männlich zu weiblich sogar bei 2,26:1. Die Mehrheit der Patienten ist über 55 Jahre alt (79,18%). Die Gesamt-Inzidenz der SNSCCs ist zwischen 1973 und 2009 rückläufig. Während sie 1973 bei 0,41 Fälle pro 100.000 Patienten lag, gab es hingegen 2009 noch 0,32 Fälle pro 100.000 Patienten. Die durchschnittliche Gesamtinzidenz von 1973-2009 betrug 0,36 Fälle pro 100.000 Patienten. Das Gesamtüberleben bei SNSCCs für 5, 10 und 20 Jahre lag bei 52,95%, 44,67% und 29,37% (Sanghvi et al., 2014).

1.3 Symptomatik

Die Mehrzahl der sinunasalen Tumoren zeichnen sich wegen der okkulten Lage eher durch klinische Inapparenz aus. Symptome zu Beginn des Leidens lassen eher an einen chronisch entzündlichen Vorgang denken. Lokalisationsbezogen kommt es am ehesten zu einer Behinderung der Nasenatmung, Rhinorrhoe, Schwellungen, Schmerzen und Sensibilitätsausfällen. Einseitige rezidivierende Epistaxis, Exsudat, Blutungen, Perforationen, Deviationen, Farbveränderungen, Druckgefühl, Hyposmie und Hautrötungen gehören ebenso zu der beschriebenen Symptomatik. Fortgeschrittene Karzinome können sich durch Diplopie, Exophthalmus oder neurologische Ausfälle darstellen. (Llorente et al., 2014; Mast, 2014; Pickhard et al., 2012)

1.4 Klassifikation

Zur Einteilung maligner Tumoren der Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen wird die TNM-Klassifikation benutzt. Hierbei steht der Buchstabe „T“ für die Ausbreitung des Primärtumors, „N“ für das Vorkommen oder Fehlen regionären Lymphknotenbefalls (Halslymphknoten) und „M“ für das Vorkommen oder Fehlen von Fernmetastasen. Eine histomorphologische Malignitätsgraduierung, das Grading, wird mit „G“ und das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors mit „R“ ausgedrückt. Das Suffix „p“ steht für eine histologische, das Suffix „c“ für eine klinische Beurteilung. In Tabelle 1 und 2 sind die aktuell gültige TNM-Klassifikation und UICC-Stadieneinteilung (8. Auflage) aufgeführt (Wittekind, 2017).

pT-Stadium	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Entsprechend Lokalisation und Infiltration des Primarius

Kieferhöhle	
pT1	Tumor auf die antrale Schleimhaut begrenzt <u>ohne</u> Arrosion oder Destruktion des Knochens
pT2	Tumor mit Arrosion oder Destruktion des Knochens (ausgenommen die posteriore Wand) einschließlich Ausdehnung auf harten Gaumen und/oder mittleren Nasengang
pT3	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Knochen der dorsalen Wand der Kieferhöhle, Subkutangewebe, Boden oder mediale Wand der Orbita, Fossa pterygoidea, Sinus ethmoidalis
pT4a	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Inhalt der vorderen Orbita, Wangenhaut, Processus pterygoideus, Fossa infratemporalis, Lamina cribrosa, Kehlbeinhöhle, Stirnhöhle
pT4b	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Orbitaspitze, Dura, Gehirn, mittlere Schädelgrube, Hirnnerven ausgenommen den maxillären Ast des N. trigeminus (V2), Nasopharynx, Clivus

Nasenhöhle und Siebbeinzellen	
pT1	Tumor auf einen Unterbezirk der Nasenhöhle oder Siebbeinzellen beschränkt, mit oder ohne Arrosion des Knochens
pT2	Tumor in zwei Unterbezirken eines Bezirkes oder Ausbreitung auf einen Nachbarbezirk innerhalb des Nasenhöhlen-Siebbeinzellen-Areals, mit oder ohne Arrosion des Knochens
pT3	Tumor breitet sich in die mediale Orbita oder den Orbitaboden aus oder in Kieferhöhle, harten Gaumen oder Lamina cribrosa
pT4a	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen, Inhalt der vorderen Orbita, Haut von Nase oder Wange, minimale Ausbreitung in vordere Schädelgrube, Processus pterygoideus, Keilbeinhöhle oder Stirnhöhle
pT4b	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Orbitaspitze, Dura, Gehirn, mittlere Schädelgrube, Hirnnerven ausgenommen den maxillären Ast des N. trigeminus (V2), Nasopharynx, Clivus

pN-Stadium	
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
pN2	Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben: <ul style="list-style-type: none"> • pN2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, mit extranodaler Ausbreitung oder mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung

	<ul style="list-style-type: none"> • pN2b: Metastase(n) in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung • pN2c: Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne Extranodale Ausbreitung
pN3a	Metastase(n) in einem Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
pN3b	Metastase(n) in einem Lymphknoten mehr als 3 cm in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

pM-Stadium	
pMX	Keine histologische Beurteilung von Fernmetastasen möglich
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt

R-Stadium	
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

G	Grading
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert

G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 1: TNM-Klassifikation (Wittekind, 2017)

Stadien	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung (Wittekind, 2017)

1.5 Ätiologie und Risikofaktoren

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass anhaltende inflammatorische Prozesse in der Mukosa und exogene Noxen, allen voran das Rauchen, zur Ausbildung sinunasaler Tumoren führen (Tomazic, 2017). Für die Entstehung der sinunasalen Plattenepithelkarzinome werden sowohl gewisse Umweltfaktoren als auch virale Onkogene, wie das Epstein-Barr Virus (EBV) und das humane Papillomavirus (HPV) diskutiert. Zu den Umweltfaktoren gehören das Rauchen und berufliche Noxen wie Klebstoffe, Textilstäube, Schweißrauch und Arsen. Rauchen gilt als sicherer Risikofaktor und erhöht das Risiko an einem SNSCC zu erkranken um das Zwei- bis Dreifache. Der bei Schweißarbeiten auftretende Rauch sowie Textilstäube haben einen Dosis-abhängigen Effekt auf die Entwicklung eines SNSCC (Kilic et al., 2017; Sanghvi et al., 2014).

Generell ist die Datenlage für die oben genannten Viren und deren Assoziation zu SNSCCs im Vergleich zu anderen Malignomen äußerst dürftig. Ein Zusammenhang von EBV und SNSCCs für das Auftreten von Metastasen konnte erstmalig 2015 von Doescher et al. aufgezeigt werden (Doescher et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen HPV und SNSCC konnte erstmals 1989 in einer Studie zu sinunasalen Papillomen gezeigt werden, in welcher zwei Drittel der Proben HPV-positiv waren (Klemi et al., 1989). So konnte bei invertierten sinunasalen Papillomen (ISP) das onkogene Potential von low-risk HPV aufgezeigt werden. Bei nicht ISP-assoziierten SNSCCs scheinen vor allem die high-risk HPV von größerer Bedeutung. Letztere entfalten ihr malignes Potential über die Wirkung der Onkoproteine E6 und E7 auf das Protein P53 (p53) und das Protein Retinoblastom (pRb) und dessen Signalweg. Die low-risk HPV assoziierten Tumoren scheinen womöglich eher über das Onkoprotein E5 und seine steigernde Wirkung auf den Signalweg des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) eine Rolle zu spielen (Udager et al., 2018). Für das bisher besser untersuchte Adenokarzinom besteht ein erhöhtes Risiko bei Exposition zu Holzstaub. Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines SNSCC konnte gleichzeitig nicht beobachtet werden (Gordon et al., 1998).

1.6 Pathologie

Die WHO definiert das Plattenepithelkarzinom im Bereich des oberen aerodigestiven Traktes als malignen epithelialen Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung. Gekennzeichnet wird der histologische Malignitätsgrad durch die Anwesenheit von Interzellularbrücken und dem Umfang an Hornbildung. Die SNSCCs bilden sich in der Regel aus makroskopisch unauffälliger Mukosa, z.T. können sie auch aus benignen invertierten Papillomen entstehen. Etwa 10-15% dieser Papillome entarten maligne (Mast, 2014).

1.7 Molekularpathologie

Die Datenlage zu der Tumorgenese der sinunasalen Plattenepithelkarzinome ist spärlich. Vieles basiert auf noch zu verifizierenden Hypothesen oder ist Teil aktueller Forschungen und Studien.

Wie jedoch eingangs erwähnt, kann die Entwicklung eines SNSCC mit einer chronischen Inflammation z.B. durch inhalative Reizstoffe wie etwa Rauchen vergesellschaftet sein. Der permanente Stimulus führt womöglich über den Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin - 1 Beta (IL-1 β) zu einer vermehrten Transkription des Nuclear-Factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B), welches wiederum eine größere Rolle in der Karzinogenese spielt. Des Weiteren wurde bei SNSCCs vermehrt Cyclooxygenase 2 (COX 2) gefunden. Dies scheint die These zu untermauern, dass der Tumor auf dem Boden einer anhaltenden Inflammation entsteht. Bei invertierten sinunasalen Papillomen (ISP), einer fakultativen Präkanzerose eines SNSCCs, wurde dies bereits nachgewiesen. Als weiterer Erklärungsansatz gelten DNA-Mutationen, welche z.B. auch durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies ausgelöst werden können. Dadurch soll es letztlich zu Auswirkungen auf p53, sowie dem Kirsten-, Harvey- und Neuroblastoma Rat Sarcoma Virus Oncogene Homolog (KRAS, HRAS, NRAS) kommen. (Tomazic, 2017)

Bei bis zu 73% der SNSCC-Patienten liegt eine p53-Mutation vor (Doescher et al., 2015). Bekannt ist, dass bei etwa 40% der SNSCCs der EGFR und bei circa 10% der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) überexprimiert ist. Außerdem werden bei 20% der Patienten der Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) und bei 37% der Patienten der Transkriptionsfaktor Sex Determining Region Y – Box 2

(SOX2) erkannt. Durch „genomic profiling“ konnten weitere potentielle Onkogene aufgedeckt werden: CD44 (Cluster of Differentiation 44), CCND1 (Cyclin D1 kodierendes Gen) und CTTN (Cortactin koderiendes Gen) (Tomazic, 2017).

1.8 Therapie

Aufgrund der geringen Inzidenz bei Plattenepithelkarzinomen im Bereich der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen existiert bisher keine standardisierte therapeutische Vorgehensweise. Es wird vor allem die chirurgisch-kurative R0-Resektion angestrebt. Zusätzlich werden Chemo- und Target-Therapeutika sowie Strahlentherapie eingesetzt. Das übergeordnete Ziel dieser Interventionen ist die Tumorfreiheit, jedoch sollte der Erhalt der Lebensqualität berücksichtigt sein. Neben einem R0-Status muss zudem vor allem bei primär chirurgischer Therapie dem Aspekt der Funktionalität und dem individuellen Aussehen des Patienten Rechnung getragen werden. (Llorente et al., 2014; Mast, 2014; Pickhard et al., 2012)

Eine komplette Tumorsektion kann durch die sensiblen angrenzenden Strukturen wie Augen, Gehirn und Gefäße erschwert werden und ist auch für eine Strahlentherapie nicht außer Acht zu lassen. Oft wird die Kombination aus CT-navigationsgestützter endoskopisch durchgeführter Operation und adjuvanter Strahlentherapie als multimodale Therapiestrategie gewählt (Llorente et al., 2014). T1- und T2-Tumoren (lokal begrenzt) werden versucht vor allem endoskopisch zu entfernen. Bei T3- und T4-Tumoren (ausgedehnt) werden ausgedehntere Methoden wie die subtotale/totale Ablatio nasi oder eine laterale Rhinotomie angewandt (Cantu et al., 2012; Nakamaru et al., 2021). Bei einer Tumorausdehnung bis in die Augenregion erfolgt zum Teil auch eine Exenteratio orbitae. Sind die regionären Lymphknoten klinisch auffällig, werden sie im Rahmen einer Neck Dissection entfernt. 77% der Rezidive werden in den ersten beiden Jahren diagnostiziert. Die deutliche Mehrheit mit 62% bereits im ersten Jahr. Deswegen wird, um möglichst kein Rezidiv zu übersehen, eine definitive plastische Rekonstruktion frühestens ein Jahr nach Therapieende empfohlen. Bis zu diesem Zeitpunkt können die Patienten mit einer Epithese versorgt werden (Pickhard et al., 2012).

Da Lymphknotenmetastasen bei SNSCCs eine eher geringe Inzidenz haben, scheint eine generelle elektive Indikation für eine Neck Dissection (ND) nicht gegeben zu sein. EBV-positive SNSCCs scheinen mit einer höheren Metastasierungsrate einherzugehen, so dass hier eventuell eine Empfehlung zu einer elektiven ND abgeleitet werden könnte (Doescher et al., 2015).

Je nach Ausbreitung und Lokalisation des Tumors kann die Strahlentherapie primär, adjuvant und neoadjuvant ausgeführt werden. Eine primäre Strahlentherapie in

Kombination mit einer Chemotherapie erfolgt bei Tumoren, die chirurgisch nicht zu beherrschen sind. Eine Kombination von chirurgischer Resektion mit adjuvanter Radio(chemo-)therapie erfolgt bei folgenden Begebenheiten: T-Stadium ≥ 2 , Metastasierung in lokal-zervikale Lymphknoten, extrakapsuläre Ausbreitung der Lymphknotenmetastasen (ECE positiv) und einem R1- oder knappen R0-Status (Mast, 2014; Pickhard et al., 2012). Eine alleinige Chemotherapie spielt in palliativen Situationen eine Rolle (Bernier et al., 2004; Mast, 2014; Pickhard et al., 2012). Ein Überlebensvorteil nach Kombination von Chemo- und monoklonaler Antikörpertherapie konnte bei metastasierten und rezidierten HNSCC im Rahmen der EXTREME-Studie aufgezeigt werden (Licitra et al., 2013). Wobei hier natürlich explizit darauf hingewiesen werden muss, dass hierbei HNSCCs und keine SNSCCs inkludiert waren. In Bezug auf HNSCCs ist dies erneut Gegenstand aktueller Phase-III Studien, die eine generelle präoperative Immuntherapie beinhalten (Stafford et al., 2020).

Eine aktuelle Studie zeigt, dass Patienten mit lokoregionär fortgeschrittenem SNSCC von einer neoadjuvanten Therapie zu profitieren scheinen. (Abdelmeguid et al., 2021)

Es konnte ferner gezeigt werden, dass bei lokal fortgeschrittenen SNSCCs die Anwendung monoklonaler Antikörper, wie Cetuximab (Erbix[®], Merck) mit einer adjuvanten Radiatio zu einer Verbesserung der Überlebensrate und der Prognose führen. (Qiu et al., 2018)

1.9 Prognose

Trotz neuer Behandlungsoptionen ist die Prognose von Malignomen in den Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen in den letzten drei Jahrzehnten ungünstig geblieben (Turner et al., 2012). So wird die 5 Jahres-Überlebensrate von Plattenepithelkarzinomen der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen mit lediglich 31% angegeben (Pickhard et al., 2012).

In dieser Körperregion erschweren die vielen sensiblen anatomischen Strukturen eine adäquate Kontrolle des Tumors. So ist das Misslingen einer operativ-kurativen Therapie am ehesten auf eine gescheiterte regionäre Tumorkontrolle (keine R0-Resektion) zurückzuführen. Das Resultat ist eine erhöhte Zahl an postoperativen

Lokalrezidiven vor allem innerhalb des ersten Jahres. (Baier et al., 2005; Khademi et al., 2009; Myers et al., 2002; Szutkowski et al., 2008)

Auf die Nasenhaupthöhle begrenzte Plattenepithelkarzinome bilden weniger Lokalrezidive aus und haben eine bessere Prognose als die Primarii der Nasennebenhöhlen (Pickhard et al., 2012).

2 Virale Onkogene

2.1 Epstein-Barr-Virus

Bei dem zu den Herpesviren zählenden Epstein-Barr-Virus (EBV, auch bekannt als Humanes Herpesvirus 4 = HHV4) handelt es sich um ein DNA-Virus. Mehr als 90% der Erwachsenen weltweit sind infiziert. Klinisch bleibt die Erstinfektion meist stumm. Kommt es zu einer Erstinfektion in höherem Jugendalter kann es zum Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose kommen. (de-The et al., 1978; Young et al., 2004).

CD21 positive B-Gedächtniszellen dienen als Latenzkompartiment. Dabei können die B-Gedächtniszellen entweder direkt infiziert werden oder naive Gedächtniszellen werden durch EBV in der weiteren Differenzierung zu reifen Gedächtniszellen gesteuert. Durch Ausschalten der viralen Genexpression wird der Erhalt des viralen Genoms ermöglicht, die Überwachung durch das Immunsystem verhindert und eine lebenslange Persistenz ermöglicht. Bei einer Reaktivierung kommt es zur Induktion der viralen Genexpression. Die Folge sind Replikation, Vermehrung und Ausbreitung des Virions. Es werden epigenetische Mechanismen des Wirtes genutzt, um die Genexpressionsstufen des Virus zu regulieren, welche wiederum zu malignen Transformationen führen. (Scott, 2017; Young et al., 2004)

Am häufigsten tritt hierbei nach Infektion der B-Zellen und einer folgenden malignen Transformation ein malignes Lymphom auf, wie beispielsweise das Burkitt-Lymphom. Bei epithelialer Affektion ist vor allem das Nasopharynxkarzinom oder auch Magenkarzinome zu nennen. Neuere Studien zeigen des Weiteren eine Assoziation zu der Ausbildung von NK-/T-Zelllymphomen. (Griffin, 2000; Sexton et al., 2020; Tsao et al., 2017; Yin et al., 2019)

Auf molekularer Ebene hat EBV mehrere Angriffspunkte auf Apoptose und Zellzyklus beim Übergang von der G1 zur S-Phase. Dabei spielen latente Membranproteine (LMP1, LMP2), miRNAs, EBNAs, EBER und E2Fs eine Rolle, indem sie auf pRb, p53, Cycline und Caspasen einwirken. (Chen et al., 2019; Sinha et al., 2022; Yin et al., 2019)

Vom EBV-assoziierten-Nasopharynxkarzinom ist bekannt, dass es sowohl zu einer regional zervikalen und retropharyngealen Lymphknotenmetastasierung als auch zu einer Fernmetastasierung führen kann (Chen et al., 2019).

2.2 Humanes Papillomavirus

Bei dem humanen Papillomavirus (HPV) handelt es sich auch um ein DNA-Virus. Es wurden bisher über 200 verschiedene Typen kategorisiert. Sie besitzen Tropismus für Plattenepithelien der Haut und Schleimhäute. Ein einzigartiger Aspekt der Molekularbiologie des humanen Papillomavirus beinhaltet, dass die Vervollständigung des viralen Lebenszyklus von dem Differenzierungsgrad der epithelialen Wirtszelle abhängig ist. Die HPVs werden unterteilt in 39 Genera, basierend auf der Übereinstimmung der L1-Sequenz (für das Hauptkapsidprotein) von mindestens 60%. Hierbei wird jedes Genus mit einem griechischen Buchstaben (mit alpha startend) versehen. Papillomaviren (PV) innerhalb eines Genus mit einer Übereinstimmung von 60-70% der L1-Sequenz werden als Spezies bezeichnet. Als Typ wird ein PV bei einer Übereinstimmung der L1-Sequenz von 71-89% angegeben. Des Weiteren gibt es Subtypen (90-98% identische L1-Sequenz) und Varianten (>98% identische L1-Sequenz). Vor allem alpha-Genus-Viren zählen zu ätiologischen Faktoren einiger humaner Karzinome, wie zum Beispiel im oralen und anogenitalen Bereich. (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004; Harden et al., 2017)

Die alpha-Genus HPV-high-risk Typen (16,18, 31, 33) spielen eine evidente Rolle bei der Entstehung des Zervixkarzinoms (Schiffman et al., 2007). Deren virale Onkoproteine E6 und E7 wirken auf Tumorsuppressorproteine, um epitheliale Zellen zu transformieren. E6 inaktiviert p53, E7 inaktiviert durch Überexpression von p16^{INK4A} indirekt das Retinoblastomprotein. Diese Aktionen führen zur Blockade antiproliferativer und antiapoptotischer Aktivitäten sowie zur Unterbindung der DNA-Reparatur. (Harden et al., 2017; Kreimer et al., 2005)

2.3 Diagnostik der viralen Onkogene

Tumorsuppressorprotein p16^{INK4A}

Die etablierte Einteilung der HSNCC durch die WHO in HPV-positive und HPV-negative SCCs, die sich in Ätiopathogenese, Therapie und Überlebenszeit unterscheiden, nennt einen klaren Surrogatmarker für die HPV-positiven SCCs - p16^{INK4A} (Johnson et al., 2020; Westra et al., 2017)

Wie Jouhi et al. aufzeigen konnten, können Patienten mit einem HPV-positiven Tumor zuverlässig mittels p16-Immunhistochemie identifiziert werden (Jouhi et al., 2017).

Bei etwa 21% der SNSCCs kann eine Überexpression von Tumorsuppressorprotein p16^{INK4A} nachgewiesen werden (Llorente et al., 2014). Larque et. al definierten p16^{INK4A} als geeigneten Surrogatmarker für den Nachweis von HPV bei SNSCCs (Larque et al., 2014).

Das zur Gruppe der Cyclin abhängigen Kinase (CDK) Inhibitoren gehörende Tumorsuppressorprotein p16^{INK4A} wird auf Chromosom 9p21 durch CDKN2A kodiert. Der p16-Cyclin D1-CDK4-Rb Signalweg ist zentral für die Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase während des Zellzyklus. p16 ist ein hemmender Regulator von D1-CDK4, wobei das Gen in manchen Tumoren durch Übermethylierung abgeschaltet wird. (Levine, 1997)

Surrogatmarker plasmatische EBV-DNA

Die plasmatische EBV-DNA wurde beim Nasopharynxkarzinom zum Screening der Population, zur Prognosestellung, zur Festlegung einer Therapiestrategie und zum Überwachen des Therapieansprechens sowie der Krankheitskontrolle genutzt. (Chen et al., 2019; Chua et al., 2016) Da die plasmatische EBV-DNA jedoch kein Teil der Datenerhebung/Studie war, kann dazu keine Aussage getroffen werden.

Latente Membran Proteine und miR-155

Die latenten Membran Proteine (LMP-1/LMP-2) und miR-155 scheinen laut Lao et al. für EBV-assoziierte Nasopharynxkarzinome in bis zu ¾ der Fälle signifikant erhöht zu sein (Lao et al., 2019). Hierfür lagen jedoch in Bezug auf die Multicenterstudie keine Daten vor, weshalb dazu keine Aussage getroffen werden kann.

3 Zielsetzung

Da es sich wie eingangs beschrieben um eine sehr seltene Tumorentität handelt, gibt es bisweilen kaum Studien, welche sich gezielt mit den sinusalen Plattenepithelkarzinomen beschäftigen. Um eine entsprechend hohe Fallzahl zu generieren, wurden in der Literatur häufig die verschiedenen histologischen Entitäten zusammengefasst. Folglich war es nicht möglich klare Therapieempfehlungen ableiten zu können v.a. im Hinblick auf die Durchführung einer Neck Dissection. Ziel dieser Arbeit war es nun im Rahmen einer internationalen Studie retrospektiv Plattenepithelkarzinome der Nase und Nasennebenhöhlen zu sammeln.

Zunächst soll anhand der klinischen und pathologischen Parameter (Grading, TNM, Krankheitsverlauf) das SNSCC genau charakterisiert werden. Hierbei interessierten Überlebensdaten ebenso wie das Zusammenspiel mit eventuellen exogenen Faktoren.

Anhand der zusammengetragenen Fälle sollte zudem eine virale Onkogenese betrachtet werden. Speziell wurde auf die humanpathogenen Viren EBV und HPV untersucht. Deren mögliche Assoziation auf das Metastasierungsverhalten und die Karzinogenese sind Kernfragen dieser Arbeit. Dabei wurden verschiedene standardisierte Detektionsmethoden angewandt, um den EBV- und HPV-Status zu evaluieren. Welche Methode hierbei am geeignetsten erscheint, soll ebenso diskutiert werden. In direkter Konsequenz zu einer viralen Assoziation und möglichen Korrelation zur Entstehung von Metastasen steht die Antwort auf die Frage aus, ob folglich eine Neck Dissection in prospektiven Studien untersucht werden sollte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Proben von Patienten untersucht, bei denen die Diagnose eines sinunasalen Plattenepithelkarzinoms gestellt wurde. Alle Fälle wurden vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München nachmikroskopiert, sodass die Diagnose eines SNSCC sichergestellt wurde. Hierbei handelt sich um eine retrospektive Multicenterstudie, an welcher europaweite Zentren (siehe genaueres unter 5.1 Charakterisierung der Kollektive) teilnahmen. Ein Zentrum ist hierbei definiert aus einer Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und einer kooperierenden Pathologie. Das Projekt wurde von der Ethikkommission (Zeichen: 89/16 S) zugelassen.

Kollektiv	Tumorlokalisation	Therapie	Herkunft	Anzahl
SNSCC	Nasenvorhof Nasenhaupthöhle Siebbein Kieferhöhle Stirnhöhle Keilbeinhöhle	stadien- gerecht*	12 Zentren	475

Tabelle 3: Studienübersicht

* operativ: endoskopische und offene chirurgische Ansätze zum Erreichen einer R0-Situation;
R(C)Tx: adjuvante und primäre Ansätze v.a. mit platinhaltigen Substanzen

4.1.2 Verwendete Kits zur HPV und EBV-Detektierung

In Tabelle 4-6 werden alle verwendeten Kits aufgelistet.

Kits	Hersteller	Art.-Nummer
AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden	80234
<ul style="list-style-type: none"> Abbott RealTime High Risk HPV Reagent Kit Abbott RealTime High Risk HPV Control Kit Abbott Cervi-Collect Specimen Collection Kit 	Abbott, Chicago, USA	<ul style="list-style-type: none"> 00884999002531 00884999002524 00884999009660

Tabelle 4: verwendete Kits

Kits	Protokoll-Nr.	Hersteller	Art.-Nummer
ISH iVIEW Blue Plus Detection Kit	5: HPV high	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	760-097
ISH iVIEW Blue Detection Kit	4: EBER	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	800-092
ultraVIEW Universal DAB Detection Kit	3: p16	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	760-500

Tabelle 5: verwendete Kits

Kits	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Abbott RealTime High Risk HPV Reagent/ Kit Abbott RealTime High Risk HPV Control Kit Abbott Cervi-Collect Specimen Collection Kit 	Abbott, Chicago, USA

Tabelle 6: verwendete Kits

4.1.3 Reagenzien

In Tabelle 7 werden alle verwendeten Reagenzien und Enzyme aufgelistet, welche für die in Tabelle 8 dargestellten Pufferlösungen notwendig sind.

Enzyme und Reagenzien	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Deparaffinization Solution • PKD Puffer • Proteinase K • RLT Puffer • FRN Puffer • DNase I • RPE Puffer • RNase freies Wasser • ATL Puffer • AL Puffer • AW1 Puffer • AW2 Puffer • ATE Puffer • RDD Puffer 	Qiagen GmbH, Hilden
<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol p.a. • Isopropanol p.a. • Xylol p.a. 	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 7: verwendete Reagenzien und Enzyme

RPE Puffer	44 ml Ethanol p.a. ad 11 ml RPE Puffer-Konzentrat
AW1 Puffer	25 ml Ethanol p.a. ad 19 ml AW1 Puffer-Konzentrat
AW2 Puffer	30 ml Ethanol p.a. ad 13 ml AW2 Puffer-Konzentrat
FRN Puffer	42 ml Isopropanol p.a. ad 14 ml FRN Puffer-Konzentrat
DNaseI	Aliquot: 550 µl RNase freies Wasser ad DNaseI. Lagerung der 50 µl Aliquots bei -20° Celsius

Tabelle 8: Darstellung der zuzubereitenden Puffer und Enzyme

4.1.5 Antikörper, Hybridisierungssonden für Immunhistochemie und In situ Hybridisierung

In Tabelle 9 werden die für die Färbungen nötigen Antikörper und Hybridisierungssonden aufgeführt. Die Hybridisierungen wurden auf das Kontrollgewebe (Zervixkarzinom/Tonsille) eingestellt und für das Zielgewebe modifiziert.

Name	Klon	+ Kontrolle	Firma	Verdünnung	Art.-Nr.
CINtec® Histology Antikörper p16 ^{INK4a}	E6H4	Zervix	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	ready	705-4793
Inform HPV III Family 16 Probe: Stämme 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58 und 66		Zervix	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	ready	0800-4295
EBER 1 DNP Probe		Tonsille	Roche Diagnostics GmbH Mannheim	ready	760-1209

Tabelle 9: Antikörper und Hybridisierungssonden

4.1.6 Primer und Sonden für die quantitative real-time PCR zur Zellzahlbestimmung

In Tabelle 10 werden Primer und Sonden der quantitativen real-time PCR (q-rtPCR) zur Zellzahlbestimmung aufgeführt.

Primer/Sonden	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Primer -pRp-T-F (5'): 5' TGC TGG GAA GTG CCA TGA G 3' -pRp-T-R (3'): 5' CGG TGC ATG TTT TCA CGA TAG TA 3' • Sonde 5' FAM-CAT CAT ACA TTT CGG CAG TGA CTA TGA GGA CC-TAMRA 3' 	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Tabelle 10: Primer und Sonden der PCR zur Zellzahlbestimmung.

4.1.7 Primer und Sonden für den EBV-Nachweis mittels quantitativer real-time PCR

In Tabelle 11 werden Primer und Sonden für den EBV-Nachweis mittels quantitativer real-time PCR aufgeführt.

Primer/Sonden	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Primer <ul style="list-style-type: none"> -T-EBV-POL-01 (5'): 5`CCA GCT GCT GCT TGT CGA 3` -T-EBV-POL-02 (3'): 5`TCT TGG CTA GTC TGT TGA CCT CC 3` • Sonde <ul style="list-style-type: none"> -EBV: 5`FAM-TTT GGC GCG GAT CCT CGC A-TAMRA 3` -IK-EBV/Cy5: 5`Cy5-CTG TCC ATC ACT GTC CTT CAC TAT GGC TTT G-BHQ2 3` 	Microsynth, Lindau

Tabelle 11: Primer und Sonden für den EBV-Nachweis mittels quantitativer real-time PCR

4.1.8 Geräte

In Tabelle 12 sind die verwendeten Geräte dargestellt

Gerätename	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Kühlplatte COP 30 • Paraffin-Streckbad TFB 35 • Objektträger-Strecktisch OTS 40 	MEDITE GmbH, Burgdorf
Microm HM 355 S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Microtome Blades N35	pfm medical AG, Köln
Brutschrank Memmert Mod. 400	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipetman® 1000µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Thermomixer comfort • Centrifuge 5430 R • Research Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl 	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
VENTANA BenchMark GX	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Heizblock Techne DRI-Block® DB 2A	Cole-Palmer GmbH, Wertheim
Lichtmikroskop, Zeiss Axioskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Inverses Forschungsmikroskop, Leica DMI6000 B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Taqman-Cycler 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taqman m2000rt	Abbott, Chicago, USA

Tabelle 12: verwendete Geräte

4.1.9 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 13 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Produkt	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Objektträger Superfrost® Plus MENZEL-Deckgläser 24x50 mm 	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Roti®-Histokitt II, synthetisches Einschlussmittel	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pipetten-Spitzen LABSOLUTE® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
<ul style="list-style-type: none"> SafeSeal Reaktionsgefäße 1,5 ml Tube 50 ml 	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht

Tabelle 13: verwendete Verbrauchsmaterialien

4.1.10 Computerprogramme

In der folgenden Tabelle 14 werden alle verwendeten Computerprogramme aufgelistet.

Programm	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Microsoft® Word Version 16.49 Microsoft® Excel Version 16.46 Microsoft® PowerPoint Version 16.50 	Microsoft Corporation, Redmond
NanoDrop 1000 Version 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ventana Medical Systems NEXES Version 10.6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SPSS Statistics Version 25	IBM Corporation, Armonk, New York, USA
Leica Application Suite Version 3.7.0	Leica Microsystems (Switzerland) Limited

Tabelle 14: verwendete Computerprogramme

4.2 Methoden

4.2.1 Experimenteller Teil

DNA-Isolierung aus FFPE-Material

Für den Nachweis virologischer DNA musste aus FFPE-Material DNA isoliert werden. Dabei werden zuerst mittels Mikrotom 2 bis 5 Schnitte à 10 µm Dicke von den Gewebelöcken angefertigt und mit einer sauberen Pinzette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Anzahl der Schnitte ist hierbei abhängig von der Menge des Gewebes im Block.

Entparaffinierung und Proteinase-K Enzymverdau

Es werden 200 µl Deparaffinization Solution zupipettiert. 10 Sekunden kräftiges vortexen im Anschluss bewirkt eine Homogenisierung und eine darauffolgende Zentrifugation (alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur) bei „full speed“ (14000 rpm) eine Phasentrennung. Hierbei setzt sich die mit einem blauen Indikator versetzte Deparaffinization Solution sichtbar oben ab. Der blaue Überstand wird nun möglichst vollständig entfernt. Das zurückbleibende Pellet wird bei 37° Celsius für 10 Minuten im Heizblock unter dem Abzug getrocknet. Das Pellet wird in 150 µl PKD-Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer 100 µl Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Daraufhin werden zur Verdauung 10 µl Proteinase K zugegeben und bei 56° Celsius im Heizblock inkubiert. Anschließend 3 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei „full speed“ abzentrifugiert. Der Überstand (RNA-Aufreinigung) wird verworfen und das Pellet zur DNA-Aufreinigung weitergeführt.

DNA-Aufreinigung

Zu dem Pellet werden 180 µl ATL Puffer resuspendiert, dann 40 µl Proteinase K hinzugegeben und beides homogenisiert. Im Heizblock wird nun zuerst eine Stunde bei 56° Celsius, dann 2 Stunden bei 90° Celsius inkubiert. Nun folgt die Zugabe von 200 µl AL-Puffer und 200 µl Ethanol p.a.. Beides wird jeweils homogenisiert. Die Probe

wird komplett auf ein DNA Spin Column pipettiert und bei 10000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert sowie der Durchlauf verworfen. Nun werden in separaten Schritten erst 700 µl AW1-Puffer, 700 µl AW2-Puffer und dann 700 µl Ethanol p.a. zupipettiert, bei 10000 rpm 15 Sekunden abzentrifugiert und der Durchlauf jeweils verworfen. Anschließend wird das Spin Column für 5 Minuten bei „full speed“ zentrifugiert und erneut der Durchlauf verworfen. Das Spin column wird nun auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es folgt die Zugabe von 60 µl ATE-Puffer und die einminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Spin columns werden noch einmal bei „full speed“ für eine Minute abzentrifugiert um die DNA in das frische Reaktionsgefäß zu eluieren. Die Lagerung erfolgt bei -20° Celsius.

Polymerase-Chain-Reaction

Bei der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) kommt es zu einer Amplifikation von Nukleinsäure eines bestimmten Abschnittes DNA und einer gleichzeitigen Detektion. Dieses Verfahren wird seit Anfang der 1980er Jahre angewandt.

Die Hauptkomponenten der PCR sind ein Template, Primer, freie Nukleotidbasen und das DNA-Polymeraseenzym. Das DNA-Template enthält die spezifische Region, welche amplifiziert werden soll. Primer, oder Oligonukleotide, sind kurze DNA-Stränge, die komplementär an das 3'-Ende der Zielregion binden. Es werden sowohl Vorwärts- als auch Reversprimer benötigt, einer für den jeweils komplementären DNA-Strang. Die DNA-Polymerase ist das thermostabile Enzym, welches die DNA-Replikation ausführt (Mullis, 1990). Bei der Taqman-PCR werden, um die Reaktion sichtbar zu machen, fluoreszenz-markierte Sonden zugegeben. Während der Polymerisation werden die an den Template-Strang gebundene Sonden abgespalten und emittieren hierbei ein Fluoreszenzsignal.

Im Wesentlichen besteht eine PCR aus drei temperaturabhängigen Schritten:

- Denaturierung/Melting bei 95° Celsius
- Annealing bei 55-65° Celsius
- Elongation/DNA-Replikation bei 75-80° Celsius

Bei der Denaturierung kommt es zu einer Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden Stränge der Template-DNA zusammenhalten. Dadurch wird der nächste Schritt des „Annealings“ ermöglicht, bei welchem die Primer an komplementäre Basenpaare der Einzelstränge binden. Im letzten Schritt wird von den Primern ausgehend mit Hilfe der DNA-Polymerase von 3' nach 5' wieder ein komplementärer Doppelstrang gebildet. Die nun neu gebildete DNA ist identisch zu dem ursprünglichen Template und wird analog in den sich anschließenden Zyklen benutzt. Somit wird nach jedem Zyklus eine Verdoppelung der zugrundeliegenden DNA erzielt. Diese exponentielle Art der Amplifikation kann bei etwa 30 bis 40 Zyklen ein Plateau erreichen (Ghannam et al., 2018).

Quantitative real-time PCR (q-rtPCR) für Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde vom Institut für Virologie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München (Direktorin: Prof. Dr. U. Protzer) durchgeführt (Ansprechpartner: Dr. D. Hoffmann). Dieses Verfahren wird angewandt um bei dem Nachweis von EBV mittels quantitativer real-time PCR gewährleisten zu können, dass genug Material vorhanden ist. Somit sollen keine falsch negativen Ergebnisse ausgewertet werden. Die quantitative PCR im Taqman ist als „in-house“ Verfahren etabliert. Bei Viren ist es aussagekräftiger, ihre Menge in EDTA-Blut (Knochenmark, Biopsie) auf die Anzahl der peripheren Blutleukozyten zu beziehen. Diese wird durch Quantifizierung des humanen Prionproteins (single copy Gen) bestimmt. Bei dieser quantitativen PCR wird genomische DNA (Menge: 5 µl extrahierter Nukleinsäure) z.B. aus Biopsaten zur Versuchsdurchführung benötigt.

Um die Qualität zu kontrollieren sowie eine analytische Freigabe der Ergebnisse zu gewährleisten müssen alle Standards amplifiziert worden sein. Die Kurven der Amplifikation müssen einen exponentiellen Verlauf haben. Dabei liegt der Threshold bei 0,150000, die Fluoreszenz der negativen Kontrollen muss unterhalb des Thresholds liegen und der Ct-Wert des $1e^6$ Standards muss im Sollbereich liegen. Dabei wurde durch das Institut für Virologie auf Erfahrungswerten basierend ein Ct-Wert von <33 gewählt. Außerdem muss der Korrelationskoeffizient der Standardkurve einen Wert >0,980 haben und die Steigung der Standardkurve muss im Sollbereich liegen. Über die Ct-Werte kann nun von der Standardkurve die Gesamtmenge (Quantity) abgelesen werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der EBV-PCR kann die zellzahlbezogene EBV-Last errechnet werden.

Nachweis EBV mittels quantitativer real-time PCR

Diese Methode wurde vom Institut für Virologie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München erstellt und für den Nachweis von EBV angewandt. Es handelt sich um ein *in house* Verfahren für einen quantitativen EBV-DNA-Nachweis inklusive interner Kontrolle mittels Taqman.

In den Proben können Inhibitoren enthalten sein, die während der Nukleinsäureextraktion nicht entfernt wurden und daher den Nachweis und besonders die Quantifizierung virusspezifischer Nukleinsäuren stören. Deshalb wird zum Ausschluss einer Inhibition im gesamten Testansatz eine EBV-PCR spezifische interne Kontrolle (IK-EBV) mitgeführt. Bei dieser IK-EBV handelt es sich um ein dem Amplifikat gleichgroßes Plasmid, das dem Mastermix zugegeben wird und über die EBV-spezifischen Primer und eine IK-spezifische Sonde erkannt wird. Wird das Signal für die IK-EBV später als zu einem definierten Ct-Wert detektiert, gilt die Probe für EBV als inhibiert.

Bei dieser quantitativen PCR wird DNA (Menge: 7 µl extrahierter Nukleinsäure) z.B. aus Biopsaten zur Versuchsdurchführung benötigt. Die Nachweisgrenze liegt bei ≤ 10 Geq/Ansatz.

Cyclerprofil		Temperatur	Dauer
1 mal	Hold I:	50° Celsius	2 Minuten
1 mal	Hold II:	95° Celsius	10 Minuten
45 Zyklen	Denaturierung	95° Celsius	15 Sekunden
	Annealing/Extension	60° Celsius	1 Minute

Tabelle 15: Cyclerprofil, Temperatur und Dauer des quantitativen EBV-DNA-Nachweises

Die Qualitätskontrolle und die Kriterien für analytische Freigabe der Ergebnisse erfolgt analog der Regeln bei der Zellzahlbestimmung. Nur der Threshold liegt bei 0,100000. So müssen, um die Qualität zu kontrollieren sowie eine analytische Freigabe der Ergebnisse zu gewährleisten alle Standards amplifiziert worden sein. Zusätzlich muss, um die Sensitivität des Laufs zu gewährleisten, mindestens einer der Standards $1e^1$ amplifiziert worden sein. Wenn dies nicht zutrifft, verschiebt sich die Nachweisgrenze für alle Proben um den Faktor 10 nach oben (<5000 statt <500 Geq/ml). Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgt nach dem *in house* Verfahren

und wurden durch die Mitarbeiter des Instituts für Virologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Judith Seebach und Dr. med. Dieter Hoffmann übermittelt. Über die Ct-Werte kann, wie bei der Zellzahlbestimmung, an der ermittelten Standardkurve die Gesamtmenge (Quantity) abgelesen werden. Eine definitive Obergrenze, ab welcher Gesamtmenge eine Probe als EBV-positiv gewertet wird, gibt es nicht. Jedes Ergebnis wird demnach als EBV-positiv erachtet.

Über die folgende Formel aus dem *in house* Verfahren lässt sich die zellzahlbezogene EBV-Last ermitteln.

Formel:

$$\frac{QtyVirus}{QtyZellzahl} \times 200000 = \frac{Geq}{10^5} \text{ Zellen}$$

Abbildung 1: Ermittlung der zellzahlbezogenen EBV-Last

Nachweis HPV mittels multiplex real-time PCR

Dieses kommerzielle Testkit der Firma Abbott (Chicago, USA) wird vom Institut für Virologie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München für den Nachweis von HPV angewandt. Das Verfahren weist die Hochrisiko-Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 nach. Wegen der besonderen Bedeutung von Genotypen 16 und 18 werden diese durch spezifische Sonden differenziert. Der Test kann bei unklaren zytologischen Befunden eingesetzt werden. Es handelt sich um eine multiplex real-time PCR, bestehend aus 3 Forward und 2 Reverse Primern. Dadurch werden Abschnitte mit etwa 150 Basenpaaren Länge der konservierten L1-Region amplifiziert. Spezifische fluoreszenz-markierte Sonden detektieren die Genotypen 16 (VIC), 18 (NED) und alle anderen (FAM). Als Kontrolle der Zellzahl, dem Vorhandensein von Inhibitionen (ergo Amplifikationseffizienz) sowie der Extraktionsqualität wird Beta Globin (Cy5) nachgewiesen. Der Analyt ist aus Biopsien gewonnene DNA (Menge: 25 µl extrahierte Nukleinsäure).

Da es sich um kommerzielle Kits der Firma Abbott (Chicago, USA) handelt und somit deren Geschäftsgeheimnis unterliegt, sind Sequenzen, Sonden und Cyclerprofil nicht bekannt. Das Testkit weist die Hochrisiko-Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 nach. Wegen der besonderen Bedeutung von Genotypen 16 und 18 werden diese durch spezifische Sonden differenziert.

Um die Qualität zu gewährleisten und die Ergebnisse für weitere Analyse freizugeben gibt es folgende Kriterien: Der Taqman m2000rt legt Baseline und Threshold automatisch fest. Der Ct-Wert der Probe muss kleiner 32 sein, da sonst das Ergebnis als negativ gewertet wird (Cut off). Je nach Genotyp gelten verschiedene Nachweisgrenzen.

- GT 16, 18, 35, 39, 45, 51, 59, 66, 68 500 Geq/Ansatz
- GT 31, 33, 52, 56 2000 Geq/Ansatz
- GT 58 5000 Geq/Ansatz

Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgt nach dem *in house* Verfahren und wurden durch die Mitarbeiter des Instituts für Virologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Judith Seebach und Dr. med. Dieter Hoffmann übermittelt

Nachweis von EBV-DNA mittels quantitativer real-time PCR

Für den Nachweis von EBV-DNA mittels quantitativer real-time PCR wurde erst eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dies wird vollzogen, um gewährleisten zu können, dass genug Ausgangsmaterial vorhanden ist und somit keine falsch negativen Ergebnisse ausgewertet werden. Es handelt sich hierbei um ein *in house Protokoll*. Über die Ct-Werte (y-Achse Beispielstandardkurve Abbildung 1) kann, wie bei der Zellzahlbestimmung, an der ermittelten Standardkurve die Quantity (=Gesamtmenge) abgelesen werden. Eine definitive Obergrenze, ab welcher Gesamtmenge eine Probe als EBV-positiv gewertet wird, gibt es nicht. Jedes Ergebnis mit EBV-Nachweis wird demnach als EBV-positiv erachtet.

Durchführung und Auswertung erfolgten durch das Institut für Virologie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München. Weitere Informationen sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen.

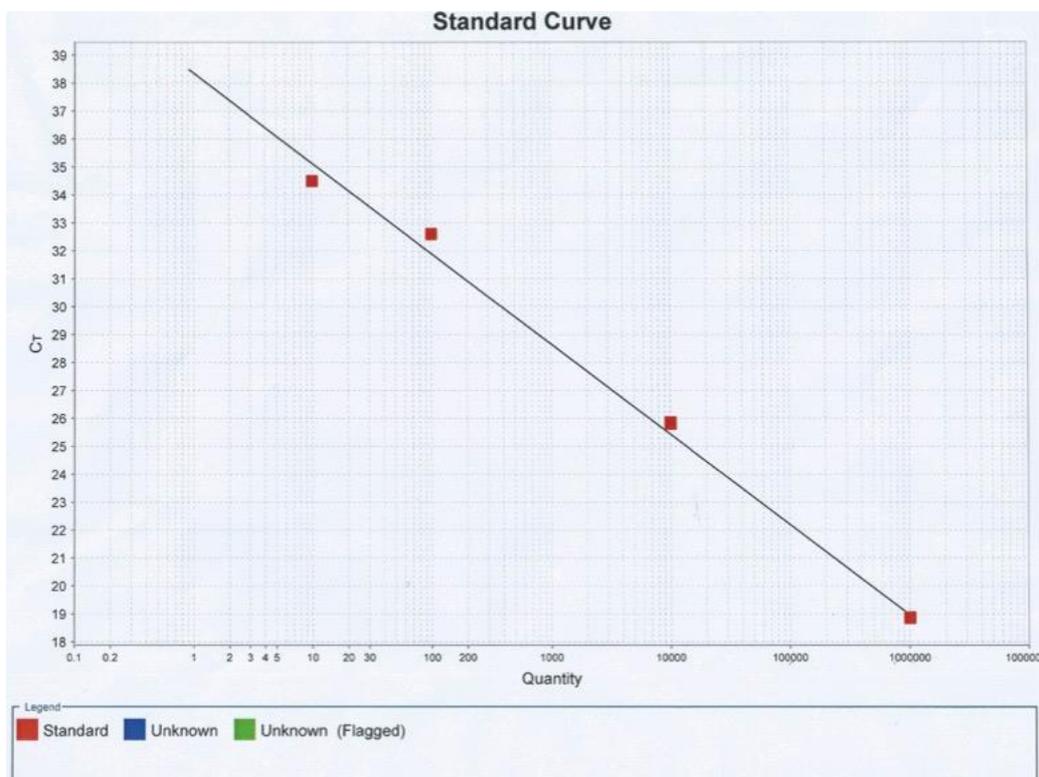


Abbildung 2: Beispielstandardkurve zur Ermittlung der Quantity/Gesamtmenge (x-Achse = Ct-Wert; y-Achse = Quantity)

Anfertigung von Leerschnitten für Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung

Aus dem in Paraffin eingebettetem Patientenmaterial werden mit einem Mikrotom 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Leerschnitte werden über Nacht bei 65° Celsius getrocknet, wodurch das meiste überschüssige Paraffin abtropft und das Material auf den Gläsern weiter fixiert wird. Danach werden die Objektträger 4 x 5 Minuten mit Xylol entparaffiniert. Es folgen 2 x 2 Minuten Isopropanol, 2 x 2 Minuten 96% Ethanol, 2 x 2 Minuten 70% Ethanol und am Ende eine Rehydrierung in aqua destillata.

Immunhistochemie (IHC)

Die Färbungen für die IHC werden mit dem Ventana Benchmark IHC/ISH Färbemodul mit dem in Tabelle 9 genannten Antikörper durchgeführt. Der Nachweis erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Eine Positivkontrolle wird bei jeder Färbereihe mitgeführt. Die Auswertung erfolgt nach Einweisung durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München und wird durch zwei unabhängige Mitarbeiter der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde ausgeführt.

Dabei wird ein Wert ermittelt, der sich aus dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Flächen des Tumors (A) festlegt. Die Intensität der Färbungen geht hierbei nicht in die Bewertung ein, weil bei allen Färbungen die Intensität ähnlich stark ausfiel.

Die Positivität der immunhistochemischen Färbung des Markers p16^{INK4A} wird wie folgt betrachtet. 0% bis 70% positiv p16-gefärbte Tumorfläche werden als HPV-negativ angesehen. Bei über 70% positiv p16-gefärbter Tumorfläche wird der Fall als HPV-positiv eingeordnet (siehe Tabelle 16).

p16-IHC	A	Score	HPV
negativ	0-70%	0	negativ
positiv	>70%	1	positiv

Tabelle 16: Score zur Bewertung der p16-IHC Positivität

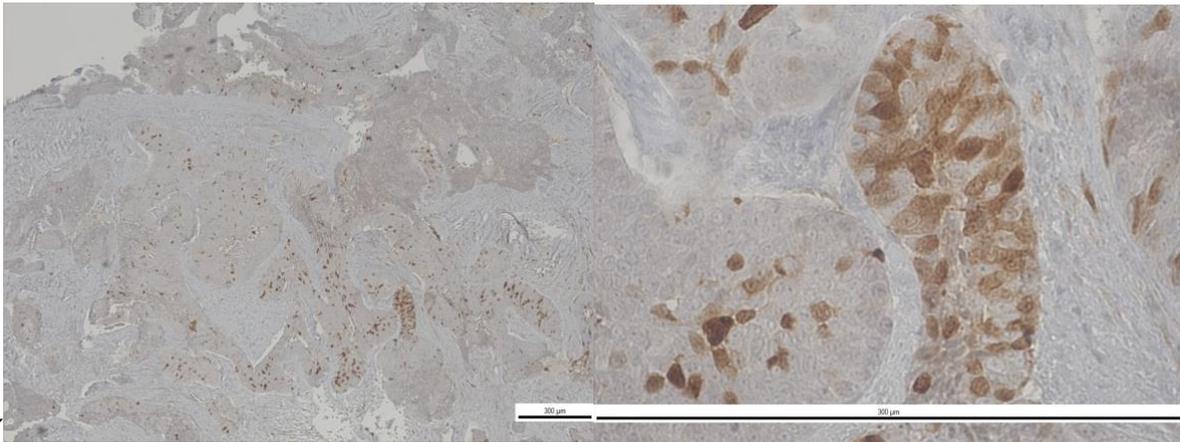


Abbildung 3: HPV-IHC Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall

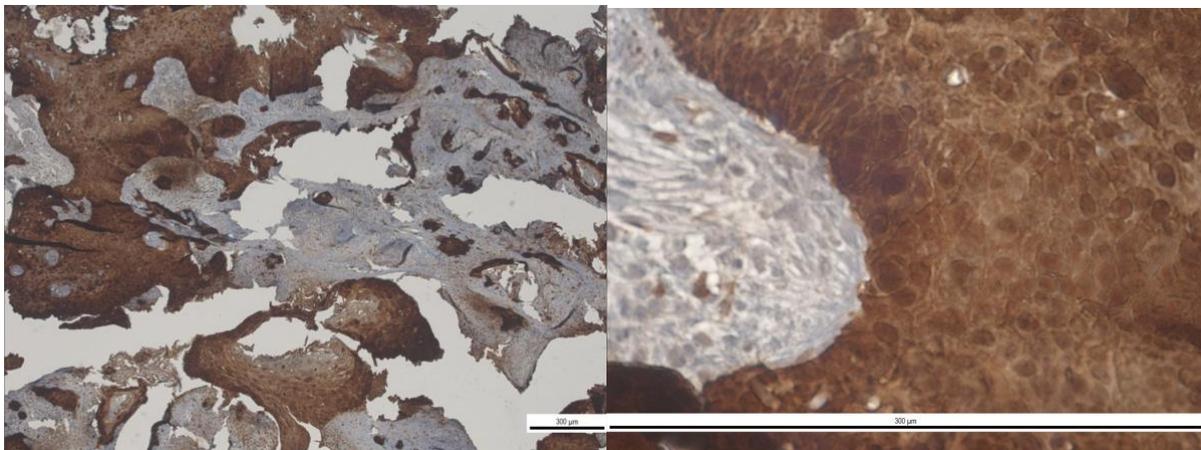


Abbildung 4: HPV-IHC Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall

In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die Färbungen für die ISH werden mit dem Ventana Benchmark IHC/ISH Färbemodul mit den in Tabelle 9 genannten Hybridisierungssonden durchgeführt. Der Nachweis erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Eine Positivkontrolle wird bei jeder Färbereihe mitgeführt. Die Auswertung erfolgt nach Einweisung durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München und wird durch zwei unabhängige Mitarbeiter der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde ausgeführt.

Dabei wird ein Wert ermittelt, der sich aus dem prozentualen Anteil positiver Zellen des Tumors (P) festlegt. Die Intensität der Färbungen geht hierbei nicht in die Bewertung ein, da bei den meisten Färbungen die Intensität ähnlich stark ausfiel.

Die Positivität der in-situ-Hybridisierungen wird wie folgt betrachtet. Von 0-10% ISH-positiven Tumorzellen wird der Fall als HPV/EBV-negativ bewertet. Ab mehr als 10% ISH-positiven Tumorzellen wird der Fall als HPV/EBV-positiv angesehen.

HPV/EBV-ISH	P	Score	HPV/EBV
negativ	0	0	negativ
positiv	>10%	1	positiv

Tabelle 17: Score zur Bewertung der HPV/EBV-ISH Positivität

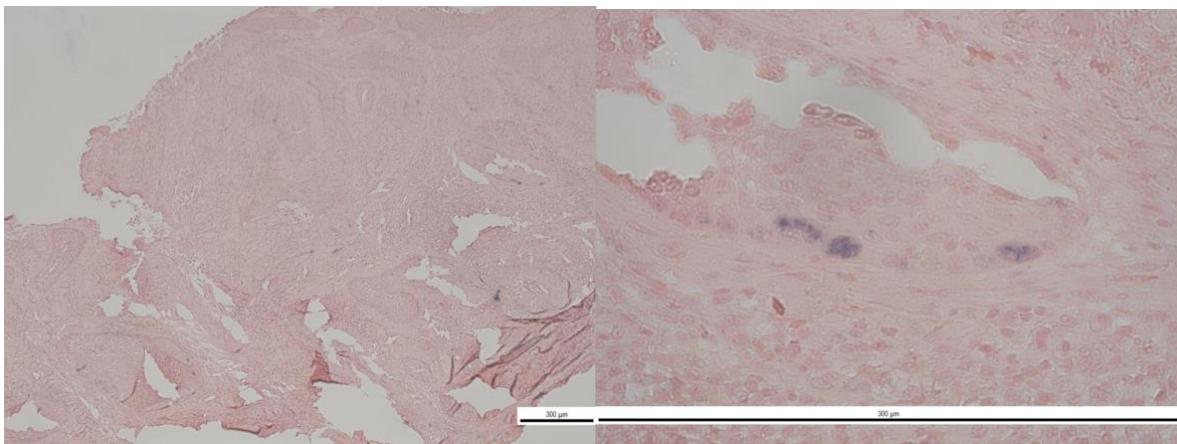


Abbildung 5: HPV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall

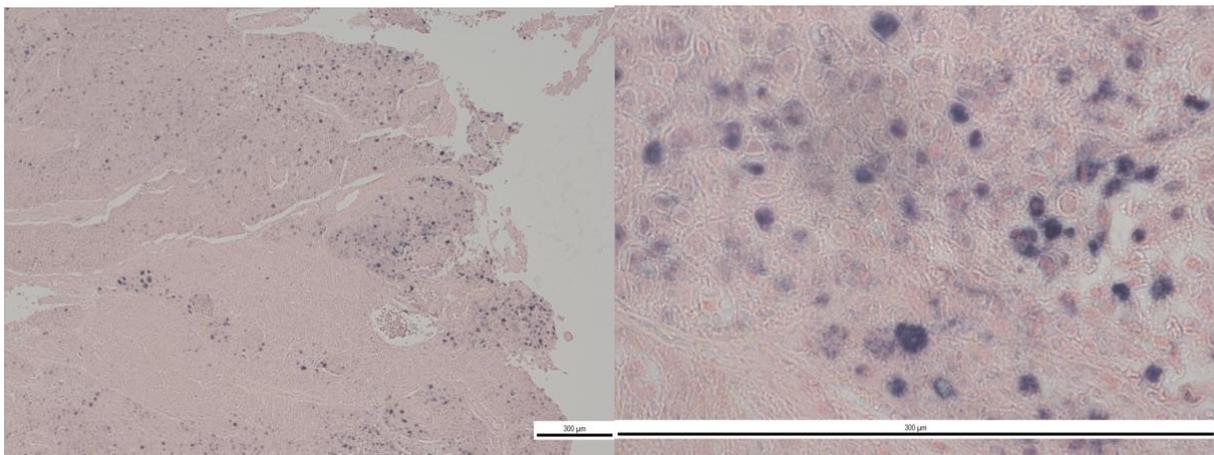


Abbildung 6: HPV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall

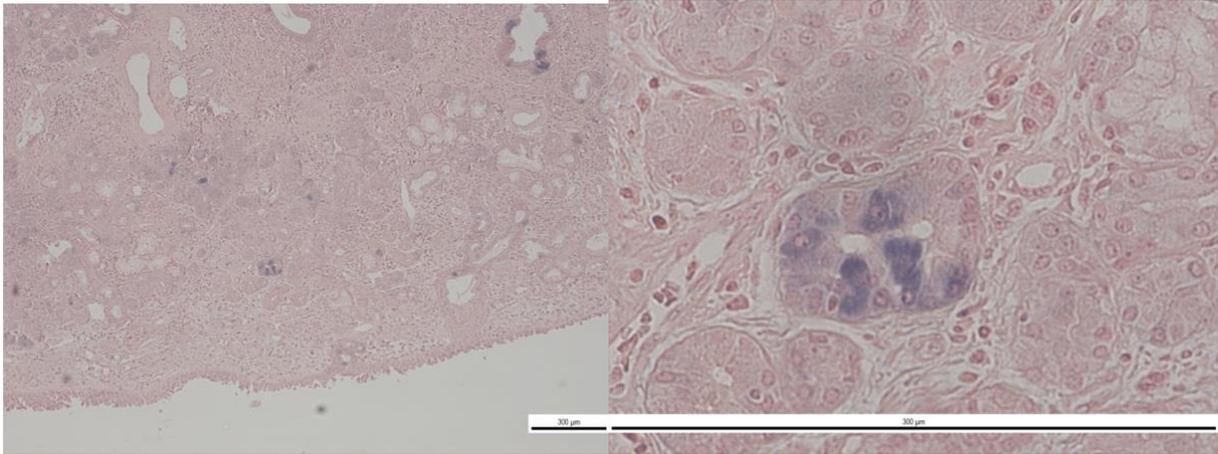


Abbildung 7: EBV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall

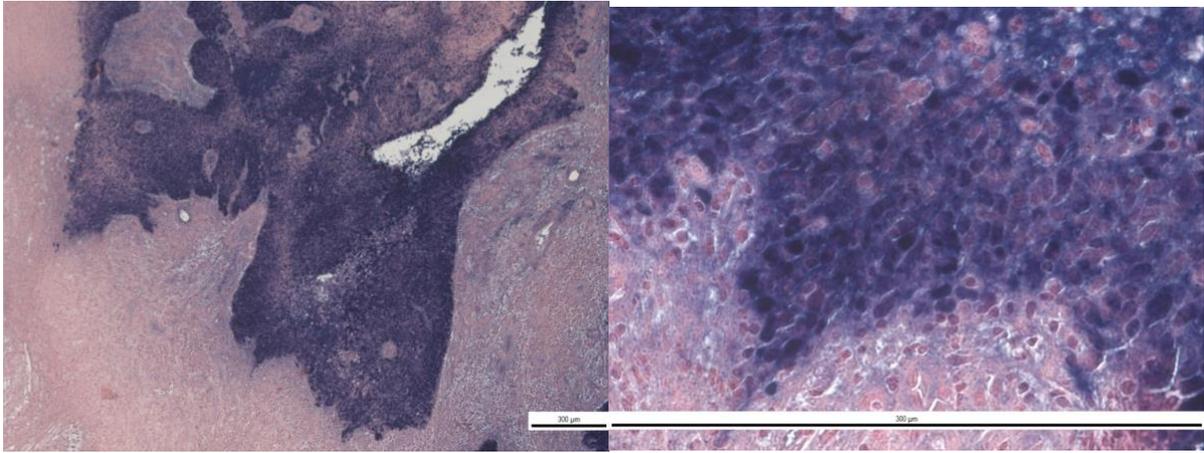


Abbildung 8: EBV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall

4.2.2 Statistischer Teil

Zuerst wurden die klinisch-experimentellen, anonymisierten Daten der Zentren in Microsoft Excel gesammelt und weiterverarbeitet. Für die statistische Auswertung wurde die SPSS Version 25 (IBM, Ehningen) benutzt. Das Konfidenzintervall betrug 95% und das Signifikanzniveau aller Tests lag bei 5% und p -Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Kaplan-Meier und Log-Rank-Test

Überlebenszeitanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode ermittelt und die unterschiedlichen Gruppen mit dem Log-Rank-Test verglichen.

Die Kaplan-Meier-Methode wird bei der Analyse von Überlebenszeitdaten genutzt. Hierbei können die mediane Überlebenszeit und Überlebensraten angegeben werden. Die mediane Überlebenszeit beschreibt den Zeitpunkt, an welchem 50% der Patienten ein bestimmtes Ereignis zuteilwurde. Die Überlebensrate gibt an, wie viele Probanden bis zu einem bestimmten Zeitpunkt noch kein bestimmtes Ereignis (hier Tod) eingetreten ist. Sollte bei einem Patienten das Ereignis während des Beobachtungszeitraumes nicht auftreten, wird dieser Fall zensiert (Ziegler et al., 2007). Wenn der Kaplan-Meier-Schätzer über das komplette Beobachtungsfenster $>50\%$ ist, so kann die mediane Überlebenszeit nicht bestimmt werden. Das trifft zu, wenn bei weniger als 50% der Probanden bis zu der maximalen Beobachtungsdauer ein Geschehnis (hier wäre es der Tod) eingetreten ist. Der Log-Rank-Test ermöglicht es die Überlebenszeiten von zwei unabhängigen Gruppen miteinander zu vergleichen, genauer ob sie gleich lang sind. Dabei wird der gesamte Beobachtungszeitraum und nicht nur ein bestimmter Zeitpunkt betrachtet. Somit lassen sich Kaplan-Meier-Kurven vergleichen. (Zwiener et al., 2011)

Kreuztabellen

Mit Kreuztabellen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem EBV- und HPV-Trägerstatus und den klinischen Daten besteht. Es wurde dabei der Chi-Quadrat-Test sowie der exakte Test nach Fischer für kleinere Fallzahlen verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Kollektive

Bei der europaweiten Studie nahmen bis dato 12 Zentren teil, jeweils bestehend aus einer Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde sowie der kooperierenden Pathologie. Insgesamt wurden 475 Fälle eingeschickt.

Jedes Zentrum musste ein Ethikvotum ihres Instituts sowie ein material transfer agreement vorlegen.

Im Folgenden werden die herangezogenen Ein- und Ausschlusskriterien dargestellt.

-Einschlusskriterien:

Histologisch gesicherter sinusnasaler Tumor, Primärtumore und Rezidive (TNM-Klassifizierung)

-Ausschlusskriterien:

Lymphome, benigne Tumore, Speicheldrüsenkarzinome und undifferenzierte Karzinome werden nicht einbezogen; fehlende Dokumentation oder Fehlen von pathologischen Präparaten/Histologien.

Zentrum	Fälle
Deutschland	
1. TU München	58 (12,2%)
2. Universität Halle	17 (3,6%)
5. Universität Ulm	47 (9,9%)
6. Universität Regensburg	47 (9,9%)
7. Helios Klinikum Dachau	22 (4,6%)
11. Universität Essen	15 (3,2%)
22. LMU München	76 (16%)
24. Universität Tübingen	101 (21,3%)
Spanien	
15. Universität Oviedo	23 (4,8%)
Österreich	
10. Barmherzige Schwestern Linz	26 (5,5%)
20. Universität Wien	30 (6,3%)

Tschechische Republik	
31.Hradec Králové (Königgrätz)	13 (2,7%)
Gesamt (N)	475 (100%)

Tabelle 18: Übersicht über teilnehmende Zentren. Die zum Teil nicht chronologischen Ziffern stammen aus der ursprünglichen Nummerierung der Zentren.

Parameter
Zentrum
Geschlecht
Nikotin
Alkohol
Datum bei Diagnose=Alter bei Diagnose
Lokalisation
Seite
Operation
Neck Dissection zu Beginn
LK-Status
Anzahl gewonnener LK zu Beginn
Adj. RTx
adj. RCTx
prim. R(C)Tx
Gray
Chemotherapeutikum
c/p-TNM-Stadium
Todesursache
Tod
Lokalrezidiv
Datum Lokalrezidiv
LK-Rezidiv
Datum LK-Rezidiv
Neck Dissection im Verlauf
LK-Status im Verlauf
Anzahl gewonnener LK im Verlauf

Fernmetastasen
Datum Fernmetastasen
Lokalisation Fernmetastasen

Tabelle 19: Bei der Studie erhobene klinische und pathologische Parameter

Die SNSCC-Fälle wurden hinsichtlich klinischer und pathologischer Parameter charakterisiert. Zwischen Oktober 1990 und November 2016 wurde in 12 Zentren bei 475 Patienten die Erstdiagnose eines SNSCC gestellt. Dabei betrug das mediane Follow-up 2,76 Jahre. Die 5-Jahresüberlebensrate lag insgesamt bei 76,3% der Gesamtkohorte. Bei 405 von 475 Patienten (85,3%) wurde primär eine chirurgische Therapie durchgeführt.

Bei 4 von 475 Fällen der Gesamtkohorte wurde keine Angabe bezüglich einer Neck Dissection übermittelt. Insgesamt erhielten 157 Fälle (33,3%) der Grundgesamtheit von 471 auswertbaren Fällen eine Neck Dissection. Bei 113 Fällen (24%) wurde im Rahmen der initialen chirurgischen Therapie eine Neck Dissection durchgeführt. Hierbei wurde der Lymphknoten-Status bei 16 Fällen (3,4% der Gesamtkohorte) als positiv (N+) bewertet. 31 Fälle (7,2%) erhielten eine ND im Verlauf, wobei 17 Fälle (3,6%) einen positiven LK-Status hatten. Hierbei ist anzumerken, dass lediglich bei 3 Fällen (0,6%) ein negativer LK-Status (N-) angegeben wurde, da 11 Fälle ohne Angaben übermittelt wurden. 13 Fälle (2,8%) erhielten eine ND-Revision wobei 8 Fälle (1,7%) einen positiven LK-Status aufwiesen.

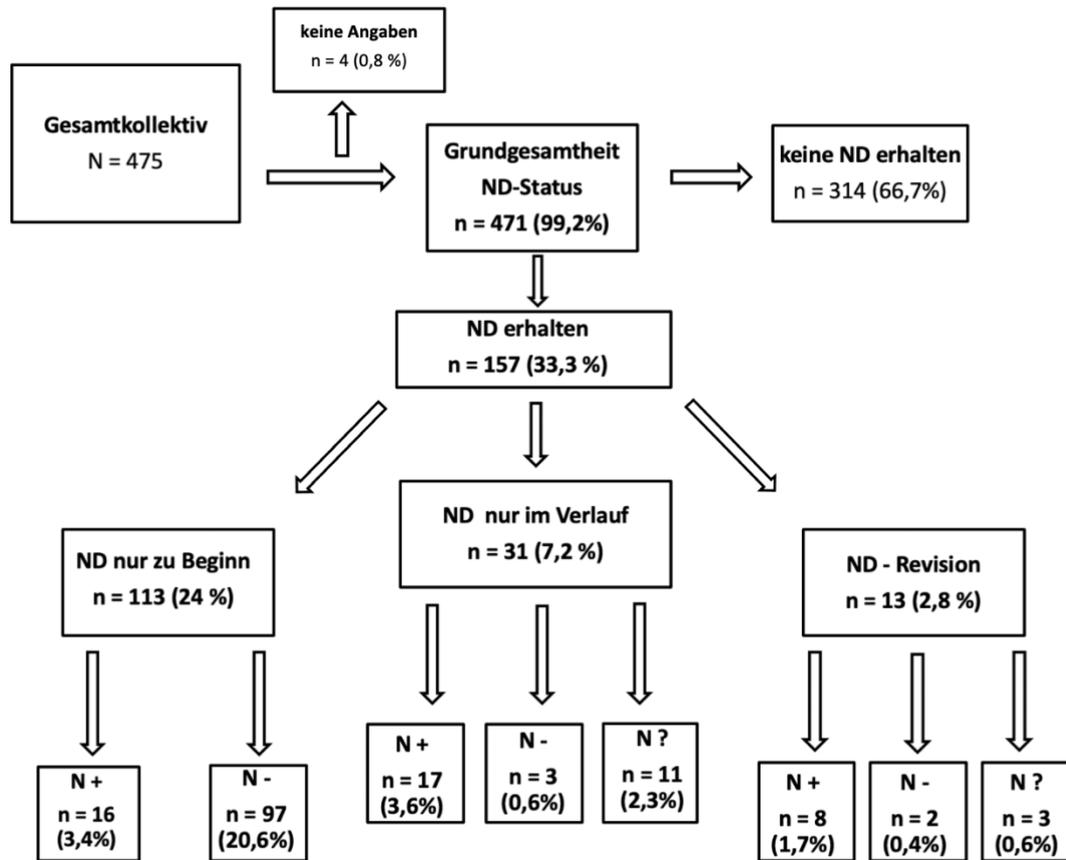


Abbildung 9: ND-Status (Die Prozentangaben ab „ND erhalten“ beziehen sich auf die „Grundgesamtheit ND-Status“ und nicht auf das Gesamtkollektiv)

Bei 5 Patienten (1,1%) von 475 wurden keine Angaben zu adjuvanter Radio- bzw. Radiochemotherapie oder primäre Radio-/Chemotherapie gemacht. Von den verbliebenen 470 Patienten wurden 227 Patienten (48,3%) ausschließlich einer Operation zugeführt. Adjuvant wurden 135 Patienten (28,7%) bestrahlt, 37 Patienten erhielten eine adjuvante Radiochemotherapie (7,9%) und 70 Patienten (14,9%) wurden primär radiochemotherapiert. Das mediane Gray-Level lag bei 64 Gray. In Bezug auf alle durchgeführten Chemotherapien bekamen 85,1 % (63 von 74 Patienten, die einer Chemotherapie zugeführt wurden) eine platinhaltige Substanz. Nachfolgende Tabelle 19 zeigt die ausführliche deskriptive Statistik der Studienpopulation.

Charakteristikum	SNSCC
Alter	
Medianes Alter	60 Jahre
Spannweite	22-97 Jahre

Geschlecht	
männlich	294 (61,9%)
weiblich	181 (38,1%)
Alkohol	
Ja	77 (16,2%)
Nein	279 (58,7%)
keine Angaben	119 (25,1%)
Raucherstatus	
Raucher	140 (29,5%)
Nichtraucher	223 (46,9%)
keine Angaben	112 (23,6%)
T₁₋₂*	
Ja	269 (56,6%)
Nein	202 (42,5%)
Keine Angabe	4 (0,8%)
T₃₋₄*	
Ja	202 (42,5%)
Nein	269 (56,6%)
Keine angaben	4 (0,8%)
cT	
1	41 (8,6%)
2	42 (8,8%)
3	31 (6,5%)
4a	73 (15,4%)
4b	23 (4,8%)
keine Angaben	265 (55,8%)
pT	
1	162 (34,1%)
2	100 (21,1%)
3	44 (9,3%)
4a	83 (17,5%)
4b	10 (2,1%)
keine Angaben/nicht operiert	76 (16%)
pN	
0	112 (23,6%)
1	8 (1,7%)
2a	4 (0,8%)
2b	6 (1,3%)
2c	2 (0,4%)
3	0
keine Angaben	343 (72,2%)
cN	
0	331 (69,7%)
1	18 (3,8 %)

2a	6 (1,3%)
2b	22 (4,6%)
2c	18 (3,8%)
3	0
keine Angaben	80 (16,8%)
cM	
0	448 (94,3%)
1	6 (1,3%)
x	21 (4,4%)
Grading	
G1	56 (11,8%)
G2	258 (54,3%)
G3	146 (30,7%)
G4	2 (0,4%)
keine Angaben	13 (2,7%)
Lokalisation	
Nasenvorhof	119 (25,1%)
Nasenhaupthöhle	195 (41,1%)
Siebbein	57 (12%)
Kieferhöhle	91 (19,2%)
Stirnhöhle	6 (1,3%)
Keilbeinhöhle	7 (1,5%)
Seite	
rechts	200 (42,1%)
links	228 (48%)
beidseits	42 (8,8%)
keine Angaben	5 (1,1%)
Metastasenscore**	
Ja	116 (24,4%)
-Lymphknotenmetastasen	20 (4,2%)
-Fernmetastasen	32 (6,7%)
-Lymphknotenrezidiv	52 (10,9%)
Nein	359 (75,6%)
Lokalrezidiv	
Ja	110 (23,2%)
Nein	324 (68,2%)
keine Angaben	41 (8,6%)
Lymphknotenrezidiv	
Ja	52 (10,9%)
Nein	338 (71,2%)
keine Angaben	85 (17,9%)
Todesursache	
Tumor spezifisch	62 (13,1%)
Tumorunabhängig	81 (17,1%)

keine Angaben	332 (69,9%)
---------------	-------------

Tabelle 20: Charakterisierung der SNSCC-Fälle (N=475) * T_{1-2/3-4}: hierbei wurde primär der pT-Status herangezogen. Sollte es keinen.pT gegeben haben, wurde stattdessen. cT herangezogen.

** Metastasenscore= Lymphknotenstatus, cN, pN, cM, Lymphknoten-Rezidiv, Fernmetastasen

Detektionsmethoden

Humanes Papillomavirus

Für die Detektion von HPV wurde eine immunhistochemische Färbung (p16^{INK4A}), eine in-situ-Hybridisierung für high-risk-HPV (HR-HPV) und eine PCR angewandt

Real-Time PCR	Häufigkeit
HR-HPV	
Ja	91 (19,2%)
-HPV-16	42 (8,8%)
-HPV-18	9 (1,9%)
-HPV16 oder HPV-18	51 (10,7%)
-keine Angabe über HPV-Stämme oder anderer als HPV-16/18	40 (8,4%)
Nein	281 (59,2%)
keine Angaben/kein Material	103 (21,7%)

Tabelle 21: Häufigkeiten multiplex RT-PCR zum Nachweis von HR-HPV.

Marker	Häufigkeiten
p16^{INK4A}	
negativ	322 (67,8%)
positiv	104 (21,9%)
keine Angaben/kein Material	49 (10,3%)
HPV-ISH	
negativ	388 (81,7%)
positiv	33 (6,9%)
keine Angaben/kein Material	54 (11,4%)
HPV-PCR	
negativ	281 (59,2%)

positiv	91 (19,2%)
keine Angaben/kein Material	102 (21,7%)

Tabelle 22: Häufigkeiten HPV-Detektionsmethoden

Markerkombinationen HPV

Markerkombinationen HPV	Häufigkeiten
HPV/p16^{INK4A} u. ISH	
negativ	392 (82,5%)
positiv	30 (6,3%)
keine Angaben/kein Material	53 (11,2%)
HPV/p16^{INK4A} u. PCR	
negativ	321 (67,6%)
positiv	48 (10,1%)
keine Angaben/kein Material	106 (22,3%)
HPV-ISH u. PCR	
negativ	348 (73,3%)
positiv	21 (4,4%)
keine Angaben/kein Material	106 (22,3%)
HPV/p16^{INK4A} u. ISH u. PCR	
negativ	354 (74,5%)
positiv	19 (4%)
keine Angaben/kein Material	102 (21,5%)

Tabelle 23: Häufigkeiten HPV-Markerkombinationen

HPV-Träger

HPV mindestens 2 positive Methoden	Häufigkeiten
negativ	356 (74,9%)
positiv	59 (12,4%)
keine Angaben/kein Material	60 (12,6%)

Tabelle 24: Häufigkeiten HPV-Träger

Epstein-Barr-Virus

Für den Nachweis von EBV wurde die PCR und die in-situ-Hybridisierung ausgewählt.

Real-Time PCR	Häufigkeit
EBV-DNA	
Ja	84 (17,7%)
Nein	293 (61,7%)
keine Angaben/kein Material	98 (20,6%)

Tabelle 25: Häufigkeiten quantitative rt-PCR zum Nachweis von EBV-DNA

Marker	Häufigkeiten
EBV-ISH	
negativ	386 (81,3%)
positiv	39 (8,2%)
keine Angaben/kein Material	50 (10,5%)

Tabelle 26: Häufigkeiten EBV-ISH/PCR

EBV-Träger

Markerkombination	Häufigkeiten
ISH und PCR	
negativ	352 (74,1%)
positiv	22 (4,6%)
keine Angaben/kein Material	101 (21,3%)

Tabelle 27: Häufigkeiten EBV-Träger

HPV und EBV

Es wurden zwei Konstellationen betrachtet, bei denen man eine Positivität für beide Viren gleichzeitig fand. Einmal wenn beide ISH positiv sind und überdies, wenn beide ISH und die jeweilige PCR positiv war. **Die Anzahl dieser doppelt positiven Fälle war so gering, dass statistische Aussagen nicht sinnvoll möglich waren.**

Methodenkombinationen	Häufigkeit
HPV-ISH und EBV-ISH	
negativ	416 (87,6%)
positiv	7 (1,5%)
keine Angaben/kein Material	52 (10,9%)
HPV/EBV-ISH und HPV/EBV-PCR	
negativ	367 (77,3%)
positiv	1 (0,2%)
keine Angaben/kein Material	107 (22,5%)

Tabelle 28: Häufigkeiten Methodenkombinationen HPV und EBV

5.2 Statistische Auswertung

Im Folgenden werden die Ergebnisse aufgeführt. Zum einen werden die Detektionsmethoden für sich und in Kombination betrachtet. Außerdem wurde eingangs, definiert was als Träger gilt.

Als Virusträger werden Patientenproben bezeichnet, die in mindestens zwei methodisch unabhängigen Analyseverfahren (Immunhistologie, in-situ-Hybridisierung, PCR) positiv sind.

Fälle, bei welchen für die Durchführung mehrerer Methoden nicht genügend Material zur Verfügung stand, mussten exkludiert werden.

Es wurden 475 Fälle sinunasaler Plattenepithelkarzinome betrachtet. Hierbei konnte bei 415 Fällen der HP-Virusträgerstatus und bei 374 Fällen der EBV-Trägerstatus identifiziert werden. 356 (74,9%) Fälle waren HPV-negativ, 59 (12,4%) Fälle waren HPV-positiv. 352 (74,1%) Fälle waren EBV-negativ, 22 (4,6%) Fälle waren EBV-positiv.

Die Ergebnisse wurden Kreuztabellen und Korrelationsanalysen zugeführt, um weitere Rückschlüsse zu ziehen.

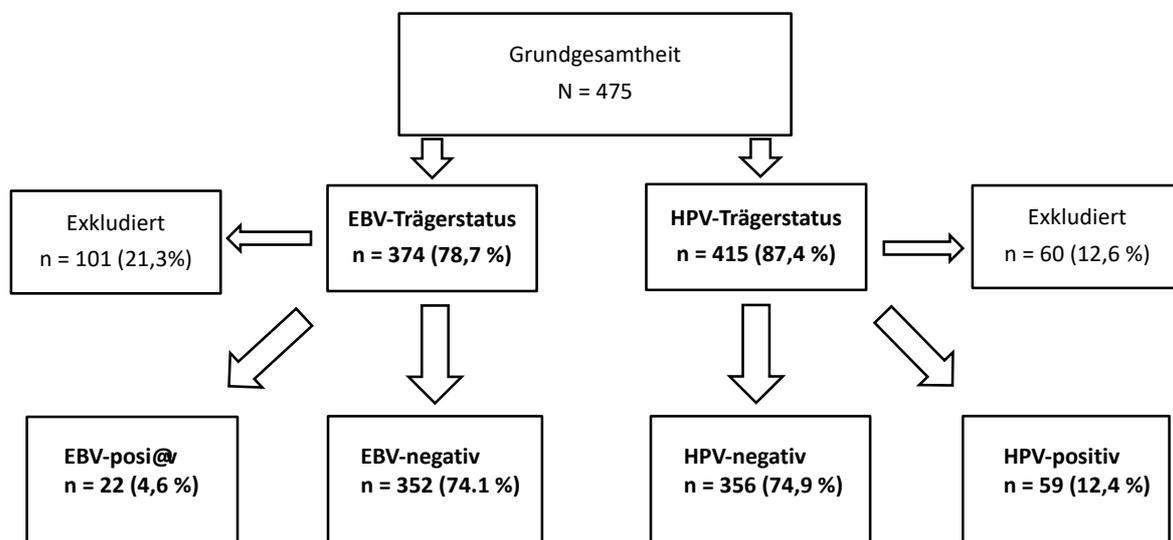


Abbildung 10: EBV- und HPV-Trägerstatus

5.2.1 Kreuztabellen

Um Zusammenhänge zwischen den klinischen, den pathologischen Parametern und einer EBV-/HPV-Infektion bei SNSCC-Patienten herzustellen, wurden Kreuztabellen mit dem Chi-Quadrat-Test (cq) nach Pearson inklusive dem exakten Test nach Fisher (ef) für kleine Fallzahlen ermittelt.

Bei den Kreuztabellen, welche den viralen Status und klinische Parameter in Verbindung setzen, waren folgende klinische Kategorien im Fokus. Der Lymphknotenstatus, die Lymphknoten- und Lokalrezidivrate, das T-Stadium sowie ein Metastasenscore für Patienten, die entweder bereits bei der Diagnose oder im weiteren Verlauf Metastasen aufwiesen (= LK-Status, cN, pN, cM, LK-Rezidiv, Fernmetastasen im Verlauf).

Die jeweiligen Korrelationsanalysen sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Signifikante Ergebnisse werden im weiteren Verlauf genauer beschrieben.

LK-Status vs. Fernmetastasen im Verlauf

Tabelle 28 zeigt, dass bei positivem LK-Status eine hohe Signifikanz für das weitere Auftreten von Fernmetastasen vorliegt ($p=0,007$).

Parameter	Fernmetastasen im Verlauf	
	p-Werte	
LK-Status pos.	<u>0,007</u>	ef

Tabelle 29: Signifikanz der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen LK-Status und Fernmetastasen im Verlauf sowie einer weiteren ND im Verlauf; Berechnung mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher (ef)

Bei insgesamt 32 Patienten (6,7%) von 383 (92 ohne Angaben) traten 43 Fernmetastasen auf. Die mediane Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen betrug 1,49 Jahre.

Lokalisation	Fallzahl
Lunge	22 (51,2%)
Leber	8 (18,6%)
Knochen	5 (11,6%)
Mediastinum	3 (7%)
Niere	1 (2,3%)
Axilla	1 (2,3%)
keine Angabe	3 (7%)

Tabelle 30: Lokalisation der Fernmetastasen

p16^{INK4A} vs. Nikotin- und Alkoholkonsum

Wie bereits bei Material und Methoden erwähnt, wurden Fälle mit <70% p16^{INK4A}-gefärbter Tumorfläche als negativ gewertet. Hierbei wurde versucht nachzuweisen, inwiefern diese Fälle mit Nikotin- oder Alkoholkonsum korrelieren. Hierbei fand sich keine signifikante Korrelation.

Marker	Nikotin		Alkohol	
	p-Werte		p-Werte	
p16^{INK4A}				
negativ	0,531	cq	0,382	cq
positiv	0,590	cq	0,382	cq

Tabelle 31: Signifikanz der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen p16^{INK4A}-Positivität und Nikotin- und Alkoholkonsum; Berechnung mit Hilfe von Chi-Quadrat-Test nach Pearson (cq)

Detektions-Methoden vs. klinische und pathologische Parameter

1 Methode positiv	LK-Status <i>p</i> -Werte	LK-Rezidiv <i>p</i> -Werte	T-Stadium <i>p</i> -Werte	Lokal-Rez. <i>p</i> -Werte	Met-Score <i>p</i> -Werte
IHC-p16	0,152 (ef)	0,502 (cq)	0,693 (cq)	0,226 (cq)	0,819 (cq)
ISH-HPV	1 (ef)	0,585 (cq)	0,009 (cq)	0,322 (cq)	0,923 (cq)
HPV-PCR	0,758 (ef)	0,670 (cq)	0,095 (cq)	0,138 (cq)	0,199 (cq)
ISH-EBV	1 (ef)	0,602 (ef)	0,446 (cq)	0,160 (cq)	0,005 (cq)
EBV-PCR	0,114 (ef)	0,597 (cq)	0,245 (cq)	0,758 (cq)	0,961 (cq)

Tabelle 32: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter

2 Methoden positiv	LK-Status <i>p</i> -Werte	LK-Rezidiv <i>p</i> -Werte	T-Stadium <i>p</i> -Werte	Lokal-Rezidive <i>p</i> -Werte	Met-Score <i>p</i> -Werte
HPV-p16 und ISH	1 (ef)	0,397 (ef)	0.003 (cq)	0,495 (cq)	0,814 (cq)
HPV-p16 und PCR	0,685 (ef)	0,993 (cq)	0,425 (cq)	0,399 (cq)	0,631 (cq)
HPV-ISH und PCR	1 (ef)	1 (ef)	0,062 (cq)	0,865 (cq)	0,793 (cq)
EBV-ISH und PCR	1 (ef)	0,724 (ef)	0,125 (cq)	0,792 (ef)	0,003 (cq)

Tabelle 33: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter

3 Methoden (HPV) positiv	LK- Status <i>p</i> -Werte	LK- Rezidiv <i>p</i> -Werte	T-Stadium <i>p</i> -Werte	Lokal- Rezidive <i>p</i> -Werte	Met- Score <i>p</i> -Werte
HPV-p16 und ISH und PCR	0,582 (ef)	1 (ef)	0,012 (cq)	1 (ef)	1 (ef)

Tabelle 34: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter

HPV und EBV beide positiv	LK- Status <i>p</i> -Werte	LK-Rez. <i>p</i> -Werte	T-Stadium <i>p</i> -Werte	Lokal- Rezidive <i>p</i> -Werte	Met-Score <i>p</i> -Werte
ISH	1 (ef)	0,248 (ef)	1 (ef)	0,682 (ef)	0,686 (ef)
ISH und PCR	*	1 (ef)	0,430 (ef)	0,249 (ef)	1 (ef)

Tabelle 35: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter.

*es werden keine Statistiken berechnet, da EBV u. HPV ISH und PCR eine Konstante ist

Virussträger vs. klinische und pathologische Parameter

mind. 2 Methoden positiv	LK- Status <i>p</i> -Werte	LK- Rezidiv <i>p</i> -Werte	T-Stadium <i>p</i> -Werte		Lokal- Rezidive <i>p</i> -Werte	Met- Score <i>p</i> -Werte
HPV	1 (ef)	0,380 (ef)	T₁₋₂: 0,274 (cq)	T₃₋₄: 0,274 (cq)	0,169 (cq)	0,908 (cq)
EBV	1 (ef)	0,724 (ef)	0,125 (cq)	0,125 (cq)	0,792 (ef)	0,003 (cq)

Tabelle 36: Virussträger vs. klinische und pathologische Parameter

HPV-ISH vs. T-Stadium

Es ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem positiven HPV-Nachweis mittels ISH und dem T-Stadium ($p=0,009$).

Die statistische Signifikanz dieses Zusammenhangs konnte auch mit zusätzlichen Detektionsmethoden bestätigt werden. So ergab sich ein p -Wert von **0,003** bei zusätzlicher IHC/p16-Positivität und ein p -Wert von **0,012** bei gleichzeitiger Positivität von ISH, IHC und PCR.

Die Prozente beziehen sich jeweils auf in den Spalten angegebenen Zahlen.

Methode	T1/T2-Stadium	T3/T4-Stadium	Gesamt
HPV-ISH			
negativ	212	170	382
positiv	26 (10,9%)	7 (3,6%)	33
Gesamt	238	177	415
HPV-p16^{INK4A} und ISH			
negativ	213	172	385
positiv	25 (10,5%)	5 (2,8%)	30
Gesamt	238	177	415
HPV-p16^{INK4A} und ISH und PCR			
negativ	190	157	347
positiv	16 (7,8%)	3 (1,9%)	19
Gesamt	206	160	366

Tabelle 37: HPV-ISH versus T-Stadium

EBV-Methodenstatus vs. Metastasenscore

SNSCC mit einem Nachweis von EBV im Tumorpräparat zeigten ein signifikantes Vorliegen für einen positiven Metastasenscore. Der p -Wert lag hierbei für die alleinige EBV-ISH bei 0,005 und für EBV-ISH mit EBV-PCR bei **0,003**.

EBV-ISH	Metastasenscore		Gesamt
negativ	297	89	386
positiv	22 (6,9%)	17 (16%)	39
Gesamt	319	106	425
EBV-ISH und PCR	Metastasenscore		Gesamt
negativ	275	77	352
positiv	11 (3,8%)	11 (12,5%)	22
Gesamt	286	88	374

Tabelle 38: EBV-Methodenstatus versus Metastasenscore

5.2.2 Überlebenskurven

Es wurden Kaplan-Meier-Kurven mit dem Log-Rank-Test für alle Detektionsmethoden und Virusträger, sowie die beiden klinischen Parameter Gesamtüberleben (overall survival, OS) und krankheitsfreies Überleben (disease free survival, DFS) auf statistische Signifikanz bestimmt. Es wurden mittlere Überlebenszeiten mit einem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Gesamtüberleben (overall survival)

Die zwischen Diagnose und Tod des Patienten vergangene Zeitspanne wird als Gesamtüberleben angegeben.

Virusträger und Gesamtüberleben

Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens (OS) für Virusträger zeigten diese ein signifikant besseres Überleben für HPV-positive Fälle (Nachweis mind. 2 positiver Detektionsmethoden). Hierbei lag die mittlere Überlebenszeit bei 10,347 Jahren im Vergleich zu 9,936 Jahren bei Nicht-Trägern. Für EBV-Träger konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis in Bezug auf das Gesamtüberleben ermittelt werden.

Methodik	negativ	positiv	p-Wert
HPV mind 2 Methoden positiv (n=410)	9,936 (9,004-10,867)	10,347 (9,413-11,281)	0,018
EBV-ISH u. PCR (n=368)	9,875 (9,005-10,744)	8,636 (5,971-11,301)	0,159

Tabelle 39: Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamtüberleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die p-Werte ermittelt.

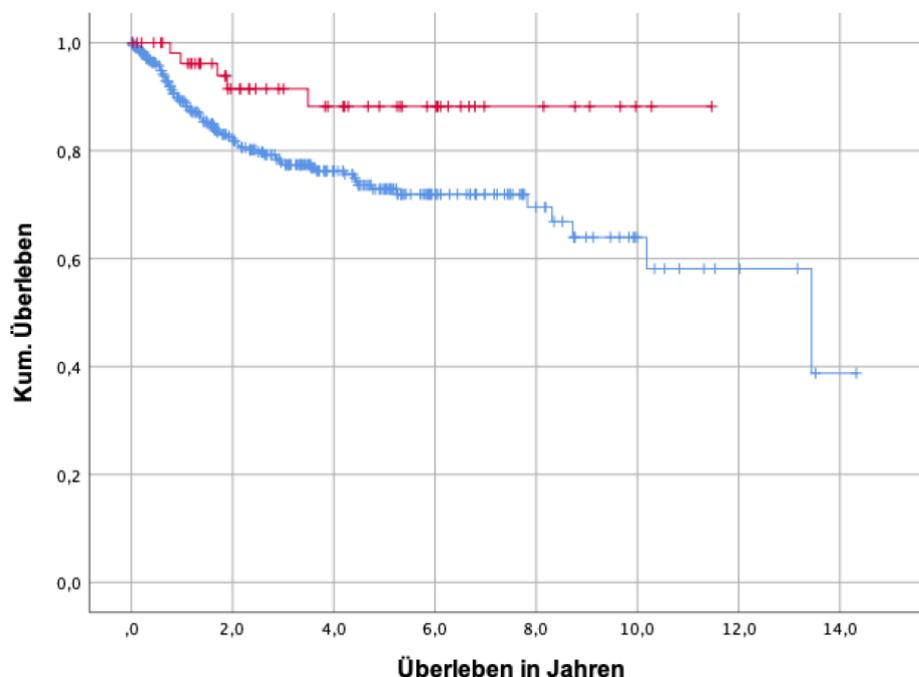


Abbildung 11: Einfluss des HPV-Trägerstatus auf das Gesamtüberleben: HPV-Positivität beeinflusst das Gesamtüberleben signifikant bei SNSCC-Patienten: HPV-positive Patienten (rote Kurve) zeigen ein medianes Überleben von 10,3 Jahren im Vergleich zu HPV-negativen Patienten (blaue Kurve) mit 9,9 Jahren.

Krankheitsfreies Überleben (disease free survival)

Als krankheitsfreies Überleben (engl. disease free survival, DFS) wird der Umstand beschrieben, wenn keine Einträge für ein weiteres Fortschreiten der Krankheit vorliegen.

Hierfür wurde zur Kaplan-Meier-Analyse ein Status erstellt, welcher den ersten Eintrag nach Diagnose beinhaltet

Detektionsmethoden und Disease Free Survival

Bei Betrachtung des disease free survival abhängig von der Detektionsmethode gab es ein statistisch signifikantes Ergebnis. Dort lag die mittlere Überlebensrate bei 7,169 Jahren für die in der PCR HPV-positiven Fälle, wohingegen die negativen Fälle 5,920 Jahren lebten.

Methoden	negativ	positiv	p-Wert
EBV-ISH (n=420)	6,243 (5,366-7,119)	6,473 (4,318-8,627)	0,845
EBV-PCR (n=372)	6,177 (5,196-7,156)	6,505 (4,864-8,145)	0,946
EBV-ISH u. PCR (n=369)	6,385 (5,747-7,297)	5,658 (3,079-8,238)	0,287
HPV-p16 ^{INK4A} (n=421)	5,925 (5,023-6,827)	6,886 (5,647-8,126)	0,162
HPV-ISH (n=416)	6,147 (5,306-6,988)	6,875 (4,841-8,910)	0,286
HPV-PCR (n=368)	5,920 (4,946-6,894)	7,169 (5,881-8,457)	0,030
HPV-p16 und ISH (n=417)	6,159 (5,317-7,001)	6,801 (4,756 – 8,846)	0,350
HPV-p16 und PCR (n=365)	6,190 (5,272-7,104)	6,631 (5,354-7,908)	0,060
HPV-ISH und PCR (n=365)	6,440 (5,545-7,335)	6,103 (4,266-7,941)	0,303
HPV-ISH, p16 u. PCR (n=369)	6,390 (5,503-7,278)	6,327 (4,399-8,255)	0,260

EBV/HPV-ISH (n=418)	6,423 (5,633-7,214)	3,121 (0,254-5,988)	0,176
EBV/HPV-ISH und EBV/HPV-PCR (n=364)	nicht schätzbar	-	-

Tabelle 40: Kaplan-Meier-Analysen zum krankheitsfreien Überleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die p-Werte ermittelt.

Virusträger und krankheitsfreies Überleben

Bei Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens (disease free survival, DFS) abhängig von der Virusträgerschaft gab es kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Methode	negativ	positiv	p-Wert
HPV mind 2 Methoden positiv (n=411)	5,993 (5,143-6,842)	7,244 (5,729-8,760)	0,089
EBV-ISH u. PCR (n=369)	6,385 (5,747-7,297)	5,658 (3,079-8,238)	0,287

Tabelle 41: Kaplan-Meier-Analysen zum krankheitsfreien Überleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die p-Werte ermittelt.

6 Diskussion

Das seltene sinunasale Plattenepithelkarzinom zeichnet sich durch die in den letzten Jahrzehnten konstant gebliebene schlechte Prognose (Turner et al., 2012) und die überschaubare Studienlage aus. Geringe Fallzahlen und die fehlende Unterscheidung der histologischen Subtypen sind bisher charakteristisch (Robbins et al., 2011). Es wird die chirurgische R0-Resektion angestrebt. Aufgrund der erhöhten Lokalrezidivneigung wird die Therapie zum Teil von einer adjuvanten Radio- oder Radiochemotherapie ergänzt (Mast, 2014). Prognostisch-biologische Marker müssen im Gegensatz zum besser charakterisierten Plattenepithelkarzinom von Larynx und Pharynx (HPV-Status, Staging, Nikotin-Status) (Ang et al., 2010) bis auf den Biomarker TP53 und den EGFR-Pfad (Munoz-Cordero et al., 2019; Pickhard et al., 2012; Takahashi et al., 2014), für die gezieltere Therapie eines SNSCC besser untersucht oder erst identifiziert werden (Franchi et al., 2011; Holmila et al., 2010).

Für eine bessere Prognose müssen daher die sinunasalen Plattenepithelkarzinome eingehender charakterisiert werden. Dabei soll vor allem eine sichere Nachweismethodik in der Bestätigung einer viralen Infektion und der Assoziation zu deren Tumorentstehung und Metastasierung identifiziert werden. Wenn möglich sollen von der retrospektiven Studie Empfehlungen für eine prospektive Studie abgeleitet werden, die sich in Therapieempfehlungen wiederfinden sollen.

6.1 Deskriptive Statistik

Alter und Geschlecht

Das bei Diagnose erfasste Durchschnittsalter lag 5 Jahre später (55 Jahre vs. 60 Jahre) und das Geschlechterverhältnis (männlich:weiblich) zeigte sich etwas ausgeglichener (1,62:1 vs. 1,81:1) als in der verglichenen Literatur bei Sanghvi et al., welche die 10-fache Menge an Patienten inkludierte (Sanghvi et al., 2014). Aus den Daten lässt sich jedoch nicht ableiten, woher dieser Unterschied stammt. In einer retrospektiven Studie mit vergleichbaren Fallzahlen (Grundgesamtheit 537 Fälle) aus den USA bei Al-Qurayshi et al., zeigte sich ein ähnliches Durchschnittsalter bei Diagnosestellung mit 62,6 Jahren (Al-Qurayshi et al., 2020).

T-Stadium und Lokalisation

Mit insgesamt 56,6% der Grundgesamtheit von 475 Fällen dominierten vor allem T1/T2 Tumoren. Dies ist deutlich niedriger im Vergleich zu einer vorherigen intern durchgeführten Studie, in der sich eine Häufigkeit von 75% der Grundgesamtheit bei jedoch lediglich 44 Fällen ergab (Doescher et al., 2015).

Bei Al-Qurayshi et al. zeigten sich sogar nur 33,1% der Grundgesamtheit von 537 Fällen als T1/T2 Tumoren (Al-Qurayshi et al., 2020).

In Bezug auf die Lokalisation, zeigten sich vor allem SNSCCs der Nasenhaupthöhle (41%), gefolgt von Nasenvorhof (25%) und der Kieferhöhle (19%). Bei der verglichenen Studie von Al-Qurayshi et al. bildeten hingegen die Kieferhöhlen den Hauptort (52%). Zugleich zeigte sich auch hier die Nasenhaupthöhle zu 41% betroffen (Al-Qurayshi et al., 2020). Die Ursache dieser Unterschiede lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten.

Virusträgerstatus und Rezidivneigung

Die bei SNSCCs vor allem im ersten postoperativen Jahr auftretende Rezidivneigung gilt als hauptursächlich für das Therapieversagen (Kim et al., 2019; Yu et al., 2017). Der untersuchte EBV-/HPV-Trägerstatus hatte keine signifikante Auswirkung auf die Ausbildung von Lokalrezidiven.

HPV-assoziierte SNSCCs scheinen sich ähnlich wie HPV positive HNSCCs eher durch ein indolentes klinisches Verhalten auszuzeichnen und ein insgesamt besseres Überleben zu haben. Bei Nachweis einer EGFR-Mutation gilt dies als Hochrisikofaktor für das Auftreten eines Lokalrezidivs (Nishikawa et al., 2021). Somit stellt die bei einer Vielzahl an ISP-assoziierten SNSCCs vorkommende EGFR-Mutation einen möglichen Therapieansatz mit EGFR-Inhibitoren dar (Cabal et al., 2020). Udager et al. sahen bis zu 15% der SNSCC mit einem ISP assoziiert (Udager et al., 2018; Udager et al., 2015).

Therapie

Bei 85,3% der Patienten (405 der Grundgesamtheit von 475) wurde eine primär chirurgische Therapie durchgeführt. Des Weiteren wurde bei 125 Patienten (26,5%) im Rahmen der initialen chirurgischen Therapie eine Neck Dissection durchgeführt. 5 Patienten (1,1%) konnten bei fehlenden Angaben im Hinblick auf eine adjuvante Radio- bzw. Radiochemotherapie oder primäre Radiochemotherapie nicht betrachtet werden. Eine alleinige chirurgische Therapie wurde bei 227 Patienten von den verbliebenen 470 Patienten (48,3%) durchgeführt. Dabei wurden sowohl offene als auch endoskopisch Tumorsektionen durchgeführt. 135 Patienten (28,7%) wurden adjuvant bestrahlt, 37 Patienten erhielten eine adjuvante Radiochemotherapie (7,9%) und 70 Patienten (14,9%) wurden primär radiochemotherapiert. Hierbei lag das mediane Gray-Level bei 64. Von den insgesamt 74 Patienten, welche einer Chemotherapie zugeführt wurden, bekamen 85,1 % (63 von 74 Patienten) eine platinhaltige Substanz.

Bei Doescher et al. zeigte sich ein deutlich höherer Anteil an rein chirurgisch durchgeführten Therapien (68,2% vs. 48,3%) (bei 30 von 44 SNSCCs) ein ähnlicher Anteil adjuvanten Bestrahlungen (25% vs. 28,7%) und ein deutlich niedrigerer Anteil an primär radiochemotherapierten Patienten (2,3% vs. 7,9%) (Doescher et al., 2015). Die komplette chirurgische Tumorsektion mit einer postoperativen Radiatio ist bei den teilnehmenden Zentren übergreifend, wie auch bereits bei Llorente et al. beschrieben, die Hauptstütze für den Behandlungsplanung von SNSCCs (Llorente et al., 2014).

6.2 Einfluss des Trägerstatus für Onkoviren auf Überleben und Metastasierung

Um einen sicheren Nachweis einer Virus-Infektion zu erhalten, wird empfohlen zwei Methoden zu verwenden (Lajer et al., 2010). Dabei wurden für HPV die p16^{INK4a} immunhistochemische Färbung, die in-situ-Hybridisierung, sowie die HPV-PCR-Methode verwendet. Für EBV wurden die in-situ-Hybridisierung und die PCR verwendet. Wie erwähnt, werden als Virusträger nur die Fälle bezeichnet, bei welchen mindestens zwei Detektionsmethoden (aus Immunhistochemie, in-situ-Hybridisierung und/oder PCR) als positiv gewertet wurden.

Humanes Papillomavirus

Das high-risk humane Papillomavirus gilt als bekannter Verursacher des HNSCC im Bereich des Oropharynx (Bishop et al., 2013; Larque et al., 2014). In Europa werden etwa 40% der HNSCC mit einer vorausgehenden HPV-Infektion assoziiert. Gleichzeitig gilt ein positiver HPV-Status als bester alleiniger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei HNSCCs (Rieke et al., 2017). In unserer Studie zeigten 91 Fälle, 19,2% der Grundgesamtheit von 475 Fällen, eine Infektion mit einem high risk HPV. Dies deckt sich fast mit dem Ergebnis aus einer retrospektiven Studie von Bishop et al., bei welchem 21% der Fälle (bei kleinerer Grundgesamtheit von 161 SNSCCs) eine Infektion mit high-risk HPV aufwiesen. Dort machte HPV16 80,2% der Fälle aus, wohingegen in unserer Studie mit 42 Fällen nur 46,2% eine Infektion mit HPV 16 aufwiesen. Auf HPV18 entfielen mit 9 Fällen 9,9% und auf nicht weiter angegebene high-risk Stämme 40 Fälle (8,4%). Bei Bishop et al. waren 6% der Fälle für HPV18 positiv. (Bishop et al., 2013)

Larque et al. zeigten mit 20% high-risk HPV ein ähnliches Ergebnis, wobei hierbei ein wesentlich kleineres Kollektiv (14 von 70 Fällen) herangezogen wurde (Larque et al., 2014).

Invertierte sinunasale Papillome (ISP) scheinen in etwa 10-15% der Fälle mit SNSCCs assoziiert zu sein. Hierbei konnten 2015 ähnliche aktivierte EGFR-Mutationen sowohl in ISPs als auch in mit ISPs-assoziierten SNSCCs identifiziert werden (Udager et al., 2015). In einem weiteren darauf aufbauenden Ansatz konnte von Udager et al. aufgezeigt werden, dass SNSCCs ohne eine ISP-Assoziation vor allem eine high-risk HPV-Infektion vorausgeht, wohingegen bei SNSCCs mit ISP-Assoziation hauptsächlich eine low-risk HPV-Infektion vorliegt (Udager et al., 2018).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl eine HPV-Infektion als auch EGFR-Mutationen bei den ISPs und den ISP-assoziierten SNSCCs eine Rolle für onkogene Mechanismen zu spielen scheinen (Udager et al., 2018; Udager et al., 2015).

Ob und in wie fern in unserer Studie einem SNSCC ein ISP vorausging, und welcher HPV-Status eventuell vorlag, kann dem Datensatz jedoch nicht entnommen werden.

Die Risikogruppeneinteilung von HNSCC je nach HPV-Status und die Erkenntnis, dass HPV-positive HNSCC ein besseres Überleben aufweisen (Ang et al., 2010) scheint sich auch auf SNSCCs zu erstrecken. Für HPV-Virusträger ergab sich in unserer Studie ein Vorteil für das Gesamtüberleben im Vergleich zu nicht Virusträgern ($p=0,018$). Darauf wiesen auch bereits die Autoren einer 2009 veröffentlichten Arbeit hin (Alos et al., 2009). Auch bei Chowdhury et al. zeigte sich ein Überlebensvorteil für HPV-positive SNSCCs ($p<0,003$) (Chowdhury et al., 2017).

Dieser Überlebensvorteil bei SNSCCs deckt sich mit internationaler Literatur für HPV-positive Oropharynxkarzinome (Al-Qurayshi et al., 2020; Fakhry et al., 2008; Kilic et al., 2017; Rischin et al., 2010).

Bei einzelner Betrachtung der Methoden und deren Kombinationsmöglichkeiten konnte ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben, sowohl für eine reine in-situ-Hybridisierung ($p=0,029$) als auch für eine zusätzlich positive Immunhistochemie (p16^{INK4a}) bei einem HPV-Nachweis gezeigt werden ($p=0,041$).

In Bezug auf krankheitsfreies Überleben ergab sich ein positiver Effekt bei positiver HPV-PCR ($p=0,030$). Bei Larque et al. zeigte sich bei alleinigem PCR-Nachweis von HPV ebenso ein besseres krankheitsfreies Überleben ($p=0,004$) (Larque et al., 2014). Für alle anderen Kombinationen ergaben sich keine statistischen Signifikanzen. Da die Einzelmethoden jedoch nicht miteinander gleichzusetzen sind und der gleichzeitige Nachweis zweier positiver Methoden als Garant für die Stabilität der Ergebnisse gilt, sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten.

In Bezug auf das Metastasierungsverhalten fanden sich für HPV-positive SNSCCs keine statistisch signifikanten Werte. Dies deckt sich mit bisherigen Studien bzgl. einer Metastasierung bei HNSCCs in Assoziation zum HPV-Status, in denen ebenso keine Signifikanz nachgewiesen wurde. (Rieke et al., 2017; Sacks et al., 2020). Anzumerken ist jedoch, dass in einer anderen Studie gezeigt werden konnte, dass nach primärer Radiochemotherapie HPV-positive HNSCCs deutlich später Metastasen ausbildeten als HPV-negative HNSCCs (Trosman et al., 2015).

Epstein-Barr-Virus

Das EBV-Virus war das erste Virus, welchem eine Assoziation zur Entstehung von Tumoren nachgewiesen werden konnte (Epstein et al., 1964). So weiß man heute, dass in südchinesischen Endemiegebieten bis zu 100% der nicht-keratinisierten Nasopharynxkarzinome (NPC) auf eine EBV-Infektion zurückgehen (Tsao et al., 2017). So ist auf molekularer Ebene bekannt, dass bei fortgeschrittenen NPCs zum Beispiel Mutationen von TP53 und RAS zur Ausbildung Rezidiven und von Metastasen führen können. (Li et al., 2017; Tsao et al., 2017)

Während also für HNSCCs die Rolle von EBV insbesondere bei den Nasopharynxkarzinomen gut untersucht ist, ist die Publikations- und Studienlage für SNSCCs spärlich. Bei den nachgewiesenen positiven und negativen EBV-Proben, sowohl bei Betrachtung der Einzeldetektionsmethoden als auch bei Anwendung der Definition eines Virusträgers konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse in Bezug auf Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben beobachtet werden.

Bereits 2015 konnte hausintern der Zusammenhang zwischen EBV-Trägerschaft und der Bildung von Metastasen aufgezeigt werden (Doescher et al., 2015).

Dies konnte nun in dieser wesentlich größer angelegten Studie erneut gezeigt werden. Das heißt, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der EBV-Trägerschaft (In Situ Hybridisierung und PCR positiv) und dem Vorhandensein von Lymphknoten bzw. Fernmetastasen bei Diagnose oder im Verlauf besteht ($p=0,003$). Die zugehörigen Lymphknotenmetastasenpräparate lagen hierbei leider nicht vor und konnten dementsprechend nicht auf den Virusstatus hin untersucht werden. Der vermutete zugrundeliegende Mechanismus einer durch EBV- (und somit LMP2A) vermittelten Notch1-Beeinflussung, führt über mitochondriale Proteine zu einer Zunahme an Zellmigration (Pal et al., 2014). Dieser Mechanismus könnte in weiteren Ansätzen immunhistochemisch überprüft werden.

Somit ist für den EBV-/HPV-Trägerstatus folgendes festzuhalten:

Patienten mit einer EBV-Trägerschaft weisen signifikant häufiger ($p=0,003$) einen positiven Metastasenscore auf. Diese zeigten weder ein besseres Gesamtüberleben ($p=0,159$) noch ein besseres krankheitsfreies Überleben ($p=0,287$). Dies ist der vermutlich insgesamt zu kleinen Patientenzahl mit EBV-Trägerschaft geschuldet.

Patienten mit einer HPV-Trägerschaft zeigten hingegen nicht überdurchschnittlich häufig Metastasen ($p=0,908$). Bei Nachweis einer HPV-Trägerschaft war dies mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ($p=0,018$), während dies gleichzeitig keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben zeigte ($p=0,089$).

Dies zeigt, dass sowohl EBV als auch HPV wichtige onkologische Faktoren bei den SNSCCs darstellen. Dies steht in klarem Widerspruch zu vorhergegangenen Studien, welche vor allem nicht-onkogenetische sowie low-risk HPV-Stämme bei SNSCCs identifizierten. Somit wurde einer HPV-Trägerschaft eine eher untergeordnete Rolle zur Malignomentwicklung beigemessen (Cabal et al., 2020).

6.3 Anwendungsproblematik und kritische Beurteilung der Methoden

Bei der Materialgewinnung per Mikrotom kann es zu folgendem Problem kommen. Je nach Fortschreiten der Schnittebene, können einzelne Methoden positive Ergebnisse fördern, während in anderen Methoden bereits negative Ergebnisse durch eine tumorfreie Schnittebene resultieren. Da sehr viele Leerschnitte benötigt werden, wird für weitere Studien neben Sparsamkeit empfohlen, nach jedem 20. Leerschnitt eine HE-Färbung zur Kontrolle anzufertigen.

Anwendungsproblematik Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung

Bei beiden Methoden handelt es sich um subjektive Methoden. Bei der in-situ-Hybridisierung mit der EBER-Sonde werden auch Lymphozyten, also keine Tumorzellen, angefärbt. Eine Unterscheidung ist zwingend nötig.

Außerdem sind in den Zentren verschiedene Einbettmethoden etabliert und die Proben sind zum Teil über 20 Jahre alt. Bei den Leerschnitten besteht mit zunehmendem Alter die Gefahr der Kontamination und der Oxidierung. Letzteres senkt wiederum die Antigenität der Fälle. So ist auf eine schnellstmögliche Verarbeitung zu achten. Ein einheitliches Protokoll zur Anfertigung der Proben wäre vonnöten, um den angesprochenen Problemen entgegenzuwirken.

Für beide Methoden gegenüber der PCR sprechen die einfachere Technik und geringere Kosten.

Beurteilung der in-situ-Hybridisierung

Die ISH für HPV ist die einzige Methode, die den Nachweis von einer HPV-Infektion selber und auch eine topographische Beziehung zu der daraus entstandenen Pathologie zulässt. Da eine diffuse zytoplasmatische oder eine bereits nukleäre Integrierung des Virus in einer einzigen Zelle aufgezeigt werden kann, detektiert die ISH im Vergleich zu einer PCR vor allem die klinisch relevanten Fälle. (Venuti et al., 2012)

Beurteilung Immunhistochemie

Die für HPV als Surrogatmarker geltende immunhistochemische Färbung stellt p16^{INK4a} dar (Kida et al., 2018). Diese hat den Vorteil, dass es auf FFPE-Material relativ einfach anzuwenden ist und diverse kommerzielle monoklonale Antikörper verfügbar sind (Venuti et al., 2012). Ein Nachteil ist die in der Literatur angegebene hohe Rate an falsch positiven Fällen von 5 bis hin zu 20% (Arsa et al., 2021).

Anwendungsproblematik Polymerase-Chain-Reaction

Die PCR ist durch ihre hohe Sensitivität sehr anfällig für Kontaminationen, weswegen in besonderem Maße auf die Einhaltung von Sauberkeit geachtet werden muss. Eine zu lange Lagerung über +4°Celsius senkt die Viruslast im Patientenmaterial. Außerdem können je nach Zentrum Patientenproben durch eine hohe Konzentration genomischer DNA, die Fixierung in Formaldehyd und die Einbettung in verschiedene Paraffinarten Inhibitoren enthalten. Dadurch kann die Sensitivität vermindert werden. Die interne Kontrolle überprüft das Vorhandensein von Inhibitoren.

Während die auf high-risk HPV getesteten Proben eine vom Hersteller vorgegebene Obergrenze besitzen, existiert etwas adäquates beim als *in house* Verfahren etablierten EBV-Nachweis nicht. Jede nachgewiesene Menge an EBV-DNA wird als positiv gewertet. Durch die Epitheliotropie von high-risk HPV kann bei PCR-Positivität davon ausgegangen werden, dass das Plattenepithelkarzinom HPV-positiv ist. Durch die lymphotrope Natur von EBV, kann hingegen nicht automatisch auf die EBV-Positivität des Tumors geschlossen werden.

Beurteilung Polymerase-Chain-Reaction

Die PCR stellt ein hoch-sensitives und relativ weitverbreitetes diagnostisches Mittel dar. Im Vergleich zur der ISH hat diese Methode jedoch einige Nachteile. Hier wären die geringere Spezifität, das nicht mögliche Unterscheiden des Auftretens von HPV in neoplastischen Zellen entgegen in nicht-neoplastischen Zellen zu nennen. Außerdem kann eine PCR nicht zwischen einer zytoplasmatischen und einer bereits integrierten DNA unterscheiden und sie gilt als technisch aufwändiger (folglich teurer). Dies gilt als

eine signifikante Limitierung die klinisch relevanten Infektionen zu detektieren. (Venuti et al., 2012)

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit dient der weiteren Charakterisierung der sehr seltenen Tumorentität sinunasaler Plattenepithelkarzinome. Das Hauptaugenmerk wurde auf den viralen Trägerstatus (EBV und HPV) gelegt und den möglichen Zusammenhang viraler Onkogenese und Metastasierungneigung aufgrund einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München mit aussagekräftigen Ergebnissen. Deswegen wurde eine europaweite Studie mit letztlich 12 teilnehmenden Zentren und 475 histologisch gesicherten SNSCCs durchgeführt. Hierbei wurden die Karzinome auf das Vorhandensein von EBV und HPV getestet und dies mit den histologischen und pathologischen Parametern verglichen.

Bei der Durchführung der Experimente sprachen für die in-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie vor allem deren in Studien weit verbreitete Nutzung, die relativ einfache Verfügbarkeit, sowie die geringeren Kosten und der geringere Zeitaufwand im Vergleich zu der PCR. Insbesondere das EBV-PCR in-house Protokoll befindet sich in einem dynamischen Prozess und wird weiter angepasst.

Aus den Daten ergab sich, dass vor allem T1/T2-Tumore vorlagen und diese sich hauptsächlich in der Nasenhaupthöhle befanden. In der internationalen Literatur wird dies gegensätzlich beschrieben (v.a. T3/T4 und Sinus maxillaris).

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl EBV als auch HPV wichtige onkologische Faktoren bei den SNSCCs darstellen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der HPV-Status als statistisch signifikanter positiver prognostischer Faktor dient. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen, welche bereits für die wesentlich häufiger vorkommenden und länger erforschten HNSCCs existieren. Somit sollte der HPV-Status routinemäßig bei chirurgisch gewonnenem Material erhoben werden.

Der EBV-Trägerstatus hatte hingegen keinen solchen Effekt auf das Gesamtüberleben. Ferner konnte eine signifikante Assoziation zwischen der EBV-Virusträgerschaft und dem Vorhandensein von Lymphknoten und/oder Fernmetastasen nachgewiesen werden. Damit konnte das Ergebnis einer hausinternen Studie von 2015 auf ein europaweites Gesamtkollektiv bestätigt werden.

Die Studie legt die Grundlage für weitere prospektive Studien zur elektiven Neck Dissection in Abhängigkeit vom EBV-Status.

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ermittlung der zellzahlbezogenen EBV-Last	34
Abbildung 2: Beispielstandardkurve zur Ermittlung der Quantity/Gesamtmenge (x-Achse = Ct-Wert; y-Achse = Quantity)	36
Abbildung 3: HPV-IHC Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall.....	38
Abbildung 4: HPV-IHC Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall	38
Abbildung 5: HPV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall.....	39
Abbildung 6: HPV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall	39
Abbildung 7: EBV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen negativen Fall.....	40
Abbildung 8: EBV-ISH Färbung in 5 und 40-facher Vergrößerung als Beispiel für einen positiven Fall	40
Abbildung 9: ND-Status (Die Prozentangaben ab „ND erhalten“ beziehen sich auf die „Grundgesamtheit ND-Status“ und nicht auf das Gesamtkollektiv).....	45
Abbildung 10: EBV- und HPV-Trägerstatus	52
Abbildung 11: Einfluss des HPV-Trägerstatus auf das Gesamtüberleben: HPV-Positivität beeinflusst das Gesamtüberleben signifikant bei SNSCC-Patienten: HPV-positive Patienten (rote Kurve) zeigen ein medianes Überleben von 10,3 Jahren im Vergleich zu HPV-negativen Patienten (blaue Kurve) mit 9,9 Jahren.	60

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation (Wittekind, 2017)	11
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung (Wittekind, 2017)	11
Tabelle 3: Studienübersicht * operativ: endoskopische und offene chirurgische Ansätze zum Erreichen einer R0-Situation; R(C)Tx: adjuvante und primäre Ansätze v.a. mit platinhaltigen Substanzen.....	22
Tabelle 4: verwendete Kits.....	23
Tabelle 5: verwendete Kits.....	23
Tabelle 6: verwendete Kits.....	23
Tabelle 7: verwendete Reagenzien und Enzyme.....	24
Tabelle 8: Darstellung der zuzubereitenden Puffer und Enzyme	24
Tabelle 9: Antikörper und Hybridisierungssonden	25
Tabelle 10: Primer und Sonden der PCR zur Zellzahlbestimmung.....	25
Tabelle 11: Primer und Sonden für den EBV-Nachweis mittels quantitativer real-time PCR.....	26
Tabelle 12: verwendete Geräte	27
Tabelle 13: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 14: verwendete Computerprogramme.....	28
Tabelle 15: Cycyclerprofil, Temperatur und Dauer des quantitativen EBV-DNA-Nachweises.....	33
Tabelle 16: Score zur Bewertung der p16-IHC Positivität	37
Tabelle 17: Score zur Bewertung der HPV/EBV-ISH Positivität.....	39
Tabelle 18: Übersicht über teilnehmende Zentren. Die zum Teil nicht chronologischen Ziffern stammen aus der ursprünglichen Nummerierung der Zentren.....	43
Tabelle 19: Bei der Studie erhobene klinische und pathologische Parameter	44
Tabelle 20: Charakterisierung der SNSCC-Fälle (N=475) * T _{1-2/3-4} : hierbei wurde primär der pT-Status herangezogen. Sollte es keinen.pT gegeben haben, wurde stattdessen. cT herangezogen.	48
Tabelle 21: Häufigkeiten multiplex RT-PCR zum Nachweis von HR-HPV.....	48
Tabelle 22: Häufigkeiten HPV-Detektionsmethoden.....	49
Tabelle 23: Häufigkeiten HPV-Markerkombinationen	49
Tabelle 24: Häufigkeiten HPV-Träger.....	49
Tabelle 25: Häufigkeiten quantitative rt-PCR zum Nachweis von EBV-DNA.....	50
Tabelle 26: Häufigkeiten EBV-ISH/PCR.....	50
Tabelle 27: Häufigkeiten EBV-Träger.....	50
Tabelle 28: Häufigkeiten Methodenkombinationen HPV und EBV.....	51
Tabelle 29: Signifikanz der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen LK-Status und Fernmetastasen im Verlauf sowie einer weiteren ND im Verlauf; Berechnung mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher (ef).....	53
Tabelle 30: Lokalisation der Fernmetastasen	54
Tabelle 31: Signifikanz der Kreuz-Tabellen zur Korrelation zwischen p16 ^{INK4A} -Positivität und Nikotin- und Alkoholkonsum; Berechnung mit Hilfe von Chi-Quadrat-Test nach Pearson (cq)	54
Tabelle 32: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter.....	55
Tabelle 33: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter.....	55
Tabelle 34: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter.....	56
Tabelle 35: Detektionsmethoden vs. klinische und pathologische Parameter.....	56
Tabelle 36: Virusträger vs. klinische und pathologische Parameter.....	56
Tabelle 37: HPV-ISH versus T-Stadium.....	57

Tabelle 38: EBV-Methodenstatus versus Metastasenscore	58
Tabelle 39: Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamtüberleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die <i>p</i> -Werte ermittelt.	60
Tabelle 40: Kaplan-Meier-Analysen zum krankheitsfreien Überleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die <i>p</i> -Werte ermittelt.	62
Tabelle 41: Kaplan-Meier-Analysen zum krankheitsfreien Überleben. Es wurden die mittlere Überlebenszeiten mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Über den Log-Rank Test wurden die <i>p</i> -Werte ermittelt.	62

8.3 Literaturverzeichnis

- Abdelmeguid, A. S., Teeramawanich, W., Roberts, D. B., Amit, M., Ferraroto, R., Glisson, B. S., . . . Hanna, E. Y. (2021). Neoadjuvant chemotherapy for locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses. *Cancer*, *127*(11), 1788-1795. doi:10.1002/cncr.33452
- Al-Qurayshi, Z., Smith, R., & Walsh, J. E. (2020). Sinonasal Squamous Cell Carcinoma Presentation and Outcome: A National Perspective. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *129*(11), 1049-1055. doi:10.1177/0003489420929048
- Alos, L., Moyano, S., Nadal, A., Alobid, I., Blanch, J. L., Ayala, E., . . . Ordi, J. (2009). Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer*, *115*(12), 2701-2709. doi:10.1002/cncr.24309
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., . . . Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, *363*(1), 24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217
- Arsa, L., Siripoon, T., Trachu, N., Foyhirun, S., Pangpunyakulchai, D., Sanpapant, S., . . . Ngamphaiboon, N. (2021). Discrepancy in p16 expression in patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma in Thailand: clinical characteristics and survival outcomes. *BMC Cancer*, *21*(1), 504. doi:10.1186/s12885-021-08213-9
- Baier, G., Völter, C., Steigerwald, I., Müller, J., & Schwager, K. (2005). [Malignant paranasal sinus tumors. Diagnosis, therapy and results]. *HNO*, *53*(11), 957-965. doi:10.1007/s00106-005-1251-0
- Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, *401*(1), 70-79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002
- Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., . . . van Glabbeke, M. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, *350*(19), 1945-1952. doi:10.1056/NEJMoa032641
- Bishop, J. A., Guo, T. W., Smith, D. F., Wang, H., Ogawa, T., Pai, S. I., & Westra, W. H. (2013). Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*, *37*(2), 185-192. doi:10.1097/PAS.0b013e3182698673
- Cabal, V. N., Menendez, M., Vivanco, B., Potes-Ares, S., Riobello, C., Suarez-Fernandez, L., . . . Hermsen, M. A. (2020). EGFR mutation and HPV infection in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Rhinology*, *58*(4), 368-376. doi:10.4193/Rhin19.371
- Cantu, G., Solero, C. L., Miceli, R., Mattana, F., Riccio, S., Colombo, S., . . . Quattrone, P. (2012). Anterior craniofacial resection for malignant paranasal tumors: a monoinstitutional experience of 366 cases. *Head Neck*, *34*(1), 78-87. doi:10.1002/hed.21685
- Chen, Y. P., Chan, A. T. C., Le, Q. T., Blanchard, P., Sun, Y., & Ma, J. (2019). Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, *394*(10192), 64-80. doi:10.1016/s0140-6736(19)30956-0
- Chowdhury, N., Alvi, S., Kimura, K., Tawfik, O., Manna, P., Beahm, D., . . . Hoover, L. (2017). Outcomes of HPV-related nasal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, *127*(7), 1600-1603. doi:10.1002/lary.26477

- Chua, M. L. K., Wee, J. T. S., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2016). Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 387(10022), 1012-1024. doi:10.1016/s0140-6736(15)00055-0
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- de-The, G., Geser, A., Day, N. E., Tukei, P. M., Williams, E. H., Beri, D. P., . . . Henle, W. (1978). Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature*, 274(5673), 756-761.
- Doescher, J., Piontek, G., Wirth, M., Bettstetter, M., Schlegel, J., Haller, B., . . . Pickhard, A. (2015). Epstein-Barr virus infection is strictly associated with the metastatic spread of sinonasal squamous-cell carcinomas. *Oral Oncol*, 51(10), 929-934. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.07.008
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*, 1(7335), 702-703. doi:10.1016/s0140-6736(64)91524-7
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., . . . Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100(4), 261-269. doi:10.1093/jnci/djn011
- Franchi, A., Miligi, L., Palomba, A., Giovannetti, L., & Santucci, M. (2011). Sinonasal carcinomas: recent advances in molecular and phenotypic characterization and their clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*, 79(3), 265-277. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.08.002
- Ghannam, M., & Varacallo, M. (2018). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). *StatPearls (Internet)*.
- Gordon, I., Boffetta, P., & Demers, P. A. (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.
- Griffin, B. E. (2000). Epstein-Barr virus (EBV) and human disease: facts, opinions and problems. *Mutat Res*, 462(2-3), 395-405. doi:10.1016/s1383-5742(00)00028-4
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 772, 3-12. doi:10.1016/j.mrrev.2016.07.002
- Holmila, R., Bornholdt, J., Heikkila, P., Suijala, T., Fevotte, J., Cyr, D., . . . Husgafvel-Pursiainen, K. (2010). Mutations in TP53 tumor suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer. *Int J Cancer*, 127(3), 578-588. doi:10.1002/ijc.25064
- Johnson, D. E., Burtneiss, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 92. doi:10.1038/s41572-020-00224-3
- Jouhi, L., Hagström, J., Atula, T., & Mäkitie, A. (2017). Is p16 an adequate surrogate for human papillomavirus status determination? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 25(2), 108-112. doi:10.1097/moo.0000000000000341
- Khademi, B., Moradi, A., Hoseini, S., & Mohammadianpanah, M. (2009). Malignant neoplasms of the sinonasal tract: report of 71 patients and literature review and analysis. *Oral Maxillofac Surg*, 13(4), 191-199. doi:10.1007/s10006-009-0170-8

- Kida, K., Terada, T., Uwa, N., Omori, Y., Fujii, T., Tomita, Y., . . . Sakagami, M. (2018). Relationship Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer Undergoing Surgery. *In Vivo*, 32(4), 927-935. doi:10.21873/invivo.11331
- Kilic, S., Kilic, S. S., Kim, E. S., Baredes, S., Mahmoud, O., Gray, S. T., & Eloy, J. A. (2017). Significance of human papillomavirus positivity in sinonasal squamous cell carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol*, 7(10), 980-989. doi:10.1002/alr.21996
- Kim, S. A., Chung, Y. S., & Lee, B. J. (2019). Recurrence patterns of sinonasal cancers after a 5-year disease-free period. *Laryngoscope*, 129(11), 2451-2457. doi:10.1002/lary.27866
- Klemi, P. J., Joensuu, H., Siivonen, L., Virolainen, E., Syrjänen, S., & Syrjänen, K. (1989). Association of DNA aneuploidy with human papillomavirus-induced malignant transformation of sinonasal transitional papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 100(6), 563-567. doi:10.1177/019459988910000607
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(2), 467-475. doi:10.1158/1055-9965.Epi-04-0551
- Lajer, C. B., & von Buchwald, C. (2010). The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *Apmis*, 118(6-7), 510-519. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02624.x
- Lao, T. D., & Le, T. A. H. (2019). Association Between LMP-1, LMP-2, and miR-155 Expression as Potential Biomarker in Nasopharyngeal Carcinoma Patients: A Case/Control Study in Vietnam. *Genet Test Mol Biomarkers*, 23(11), 815-822. doi:10.1089/gtmb.2019.0089
- Larque, A. B., Hakim, S., Ordi, J., Nadal, A., Diaz, A., del Pino, M., . . . Alos, L. (2014). High-risk human papillomavirus is transcriptionally active in a subset of sinonasal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol*, 27(3), 343-351. doi:10.1038/modpathol.2013.155
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331.
- Li, Y. Y., Chung, G. T., Lui, V. W., To, K. F., Ma, B. B., Chow, C., . . . Lo, K. W. (2017). Exome and genome sequencing of nasopharynx cancer identifies NF- κ B pathway activating mutations. *Nat Commun*, 8, 14121. doi:10.1038/ncomms14121
- Licitra, L., Störkel, S., Kerr, K. M., Van Cutsem, E., Pirker, R., Hirsch, F. R., . . . Ciardiello, F. (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. doi:10.1016/j.ejca.2012.11.018
- Llorente, J. L., López, F., Suárez, C., & Hermsen, M. A. (2014). Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(8), 460-472. doi:10.1038/nrclinonc.2014.97
- Mast, G. (2014). *Kopf-Hals-Malignome : [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]* (5. Aufl. ed.). München u.a.: Zuckschwerdt.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262(4), 56-61, 64-55.
- Munoz-Cordero, M. G., Lopez, F., Garcia-Inclan, C., Lopez-Hernandez, A., Potes-Ares, S., Fernandez-Vanes, L., . . . Hermsen, M. (2019). Predictive value of

- EGFR-PI3K-pAKT-mTOR-pS6 pathway in sinonasal squamous cell carcinomas. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 70(1), 16-24. doi:10.1016/j.otorri.2017.10.005
- Myers, L. L., Nussenbaum, B., Bradford, C. R., Teknos, T. N., Esclamado, R. M., & Wolf, G. T. (2002). Paranasal sinus malignancies: an 18-year single institution experience. *Laryngoscope*, 112(11), 1964-1969. doi:10.1097/00005537-200211000-00010
- Nakamaru, Y., Suzuki, M., Kano, S., Mizumachi, T., Tsushima, N., Suzuki, T., . . . Homma, A. (2021). The role of endoscopic resection for selected patients with sinonasal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 48(1), 131-137. doi:10.1016/j.anl.2020.06.014
- Nishikawa, D., Sasaki, E., Suzuki, H., Beppu, S., Sawabe, M., Terada, H., . . . Hanai, N. (2021). Treatment outcome and pattern of recurrence of sinonasal squamous cell carcinoma with EGFR-mutation and human papillomavirus. *J Craniomaxillofac Surg*, 49(6), 494-500. doi:10.1016/j.jcms.2021.02.016
- Pal, A. D., Basak, N. P., Banerjee, A. S., & Banerjee, S. (2014). Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A alters mitochondrial dynamics promoting cellular migration mediated by Notch signaling pathway. *Carcinogenesis*, 35(7), 1592-1601. doi:10.1093/carcin/bgu069
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108. doi:10.3322/canjclin.55.2.74
- Pickhard, A., Durst, F., Staudenmaier, R., & Reiter, R. (2012). [Management and prognosis of patients with squamous cell carcinomas of the nasal cavity and the paranasal sinuses]. *Laryngorhinootologie*, 91(10), 627-632. doi:10.1055/s-0032-1321867
- Qiu, X., & Yang, J. (2018). Clinical study of cetuximab combined with radical radiotherapy in the treatment of locally advanced sinonasal squamous cell carcinoma. *J buon*, 23(4), 1111-1117.
- Rieke, D. T., & Keilholz, U. (2017). Systemic Treatment in HPV-Induced Recurrent or Metastatic HNSCC. *Recent Results Cancer Res*, 206, 149-160. doi:10.1007/978-3-319-43580-0_11
- Rischin, D., Young, R. J., Fisher, R., Fox, S. B., Le, Q. T., Peters, L. J., . . . McArthur, G. A. (2010). Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol*, 28(27), 4142-4148. doi:10.1200/jco.2010.29.2904
- Robbins, K. T., Ferlito, A., Silver, C. E., Takes, R. P., Stojan, P., Snyderman, C. H., . . . Suarez, C. (2011). Contemporary management of sinonasal cancer. *Head Neck*, 33(9), 1352-1365. doi:10.1002/hed.21515
- Sacks, R., Law, J. Y., Zhu, H., Beg, M. S., Gerber, D. E., Sumer, B. D., . . . Khan, S. A. (2020). Unique Patterns of Distant Metastases in HPV-Positive Head and Neck Cancer. *Oncology*, 98(3), 179-185. doi:10.1159/000504651
- Sanghvi, S., Khan, M. N., Patel, N. R., Yeldandi, S., Baredes, S., & Eloy, J. A. (2014). Epidemiology of sinonasal squamous cell carcinoma: a comprehensive analysis of 4994 patients. *Laryngoscope*, 124(1), 76-83. doi:10.1002/lary.24264
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 370(9590), 890-907. doi:10.1016/s0140-6736(07)61416-0
- Scott, R. S. (2017). Epstein-Barr virus: a master epigenetic manipulator. *Current opinion in virology*, 26, 74-80. doi:10.1016/j.coviro.2017.07.017

- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer Metastasis Rev*, 39(4), 1179-1203. doi:10.1007/s10555-020-09925-3
- Sinha, S., & Gajra, A. (2022). Nasopharyngeal Cancer. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Stafford, M., & Kaczmar, J. (2020). The neoadjuvant paradigm reinvigorated: a review of pre-surgical immunotherapy in HNSCC. *Cancers Head Neck*, 5, 4. doi:10.1186/s41199-020-00052-8
- Szutkowski, Z., Kawecki, A., Wasilewska-Tesluk, E., & Kraszewska, E. (2008). [Results of treatment in patients with paranasal sinus carcinoma. Analysis of prognostic factors]. *Otolaryngol Pol*, 62(1), 37-43. doi:10.1016/s0030-6657(08)70206-3
- Takahashi, Y., Bell, D., Agarwal, G., Roberts, D., Xie, T. X., El-Naggar, A., . . . Hanna, E. Y. (2014). Comprehensive assessment of prognostic markers for sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 36(8), 1094-1102. doi:10.1002/hed.23423
- Tomazic, P. V. (2017). *Mechanisms of Molecular Carcinogenesis - Volume 1* (J. Haybäck Ed. Vol. 1). Cham: Springer International Publishing.
- Trosman, S. J., Koyfman, S. A., Ward, M. C., Al-Khudari, S., Nwizu, T., Greskovich, J. F., . . . Burkey, B. B. (2015). Effect of human papillomavirus on patterns of distant metastatic failure in oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 141(5), 457-462. doi:10.1001/jamaoto.2015.136
- Tsao, S. W., Tsang, C. M., & Lo, K. W. (2017). Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1732). doi:10.1098/rstb.2016.0270
- Turner, J. H., & Reh, D. D. (2012). Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck*, 34(6), 877-885. doi:10.1002/hed.21830
- Udager, A. M., McHugh, J. B., Goudsmit, C. M., Weigelin, H. C., Lim, M. S., Elenitoba-Johnson, K. S. J., . . . Brown, N. A. (2018). Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Ann Oncol*, 29(2), 466-471. doi:10.1093/annonc/mdx736
- Udager, A. M., Rolland, D. C. M., McHugh, J. B., Betz, B. L., Murga-Zamalloa, C., Carey, T. E., . . . Brown, N. A. (2015). High-Frequency Targetable EGFR Mutations in Sinonasal Squamous Cell Carcinomas Arising from Inverted Sinonasal Papilloma. *Cancer Res*, 75(13), 2600-2606. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0340
- Venuti, A., & Paolini, F. (2012). HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S63-74. doi:10.1007/s12105-012-0372-5
- Vigneswaran, N., & Williams, M. D. (2014). Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 26(2), 123-141. doi:10.1016/j.coms.2014.01.001
- Westra, W. H., & Lewis, J. S., Jr. (2017). Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol*, 11(1), 41-47. doi:10.1007/s12105-017-0793-2

- Wittekind, C. (2017). *TNM - Klassifikation maligner Tumoren* (Achte Auflage ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Yin, H., Qu, J., Peng, Q., & Gan, R. (2019). Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med Microbiol Immunol*, 208(5), 573-583. doi:10.1007/s00430-018-0570-1
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 757-768. doi:10.1038/nrc1452
- Yu, M. S., Lim, W. S., Lee, B. J., & Chung, Y. S. (2017). Squamous cell carcinoma associated with inverted papilloma of the maxillary sinus: our experience with 21 patients. *Clin Otolaryngol*, 42(5), 1048-1052. doi:10.1111/coa.12804
- Ziegler, A., Lange, S., & Bender, R. (2007). Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr*(S 01), 132. doi:10.1055/s-2007-959038
- Zwiener, I., Blettner, M., & Hommel, G. (2011). Überlebenszeitanalyse. *Dtsch Arztebl International*, 108(10), 163-169.

9 Danksagung

Ich danke meiner Familie, die mir auf meinem bisherigen Werdegang stets unterstützend zur Seite stand.