

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff)**

Vergleich von DNA Kopienzahlveränderungen in oralen Plattenepithelkarzinomen in Bezug auf das Vorliegen typischer Risikofaktoren

Robin Martin Satanovskij

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. Marco R. Kesting
2. Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 06.10.2016 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 14.06.2017 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
A Einleitung	1
B Problemstellung	11
C Material und Methoden	12
C.1 Patientenmaterial	12
C.2 Häufig verwendete Lösungen	14
C.2.1 Ethanol 90%	14
C.2.2 Ethanol 70%	14
C.2.3 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x	14
C.2.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x	14
C.2.5 Natriumacetat 3 M	14
C.2.6 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 20x	15
C.2.7 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 2x	15
C.2.8 20x WASH solution	15
C.2.9 1x WASH solution	15
C.3 Herstellung und Verarbeitung der Tumorgewebeschnitte	16
C.3.1 Herstellung der FFPE-Gewebeschnitte	16
C.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	16
C.3.3 Entparaffinierung der Gewebeschnitte	18
C.3.4 Mikrodissektion der Gewebeschnitte	18
C.3.5 Isolierung der Tumor-DNA	19
C.3.6 Konzentrationsbestimmung der Tumor-DNA	21
C.4 HPV-Analyse	23
C.4.1 LCD-Array	23
C.4.1.1 PCR	24
C.4.1.2 Beschreibung des LCD-Array	25
C.4.1.3 Hybridisierung	26

C.4.1.4 Markierung	27
C.4.1.5 Färbung	28
C.4.1.6 Auswertung	28
C.4.2 p16 ^{INK4a} Immunhistochemie	29
C.4.3 HPV-qRT-PCR	30
C.5 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)	32
C.5.1 Qualitätskontrolle der Tumor-DNA vor der Array-CGH	33
C.5.1.1 Multiplex-PCR	33
C.5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	35
C.5.2 Array-CGH mit BAC-Arrays	37
C.5.2.1 Verwendeter 1 Mb BAC-Array	37
C.5.2.2 Random Prime Labeling	37
C.5.2.3 Aufreinigung der markierten DNA	39
C.5.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und Fluorochrom-Inkorporationsrate	40
C.5.2.5 Fällung und Denaturierung der Sonden	40
C.5.2.6 Hybridisierung	42
C.5.2.7 Scannen und Datenextraktion der BAC-Arrays	44
C.5.2.8 Auswertung der Daten mit MANOR, DNACopy und CGHcall	46
C.6 Statistische Methoden	48
C.6.1 Hierarchische Clusteranalyse	48
C.6.2 Exakter Fisher-Test	48
C.6.3 Multipler Chi-Quadrat-Test und Benjamini-Hochberg FDR	49
D Ergebnisse	50
D.1 Bestimmung des HPV-Status	50
D.2 Array-CGH-Analyse	56
D.2.1 Qualitätskontrolle der Tumor-DNA	56
D.2.2 Chromosomale Aberrationen der untersuchten Kopf-Hals- Tumore	57
D.2.3 Hierarchische Clusteranalyse	63
D.2.4 Korrelation von Kopienzahlveränderungen mit histopathologischen und klinischen Daten	65

D.2.5 Matching männlicher und weiblicher HNSCC-Fälle	67
D.2.6 Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen	69
E Diskussion	72
F Zusammenfassung	82
G Anhang	84
H Literatur	89
Danksagung	99
Curriculum vitae	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Konzentrationsbestimmung einer DNA-Probe im NanoDrop[®] Spektrophotometer

Abbildung 2: LCD-Chip mit vergrößertem Array

Abbildung 3: LCD-Chip mit Vergrößerung eines Arrays sowie der zugehörigen HPV-Stämme

Abbildung 4: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Strangverdrängung (Schock et al., 2005)

Abbildung 5: Gescannter 1 Mb-BAC-Array

Abbildung 6: LCD-Array mit HPV 16 positiver Tumorprobe

Abbildung 7: LCD-Array mit HPV-negativer Tumorprobe

Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von p16^{INK4a} – Beispiel eines p16^{INK4a}-positiven Falles

Abbildung 9: Vergrößerung aus Abbildung 8

Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von p16^{INK4a} – Beispiel eines p16^{INK4a}-negativen Falles

Abbildung 11: Auftrennung der DNA-Amplifikate im Agarosegel nach Multiplex-PCR

Abbildung 12: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen aller 60 untersuchten Kopf-Hals-Tumore

Abbildung 13: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen der Kopf-Hals-Tumore der männlichen Patienten

Abbildung 14: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen der Kopf-Hals-Tumore der weiblichen Patienten

Abbildung 15: Hierarchische Clusteranalyse der Array-CGH-Profile von 60 HNSCC

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der untersuchten 60 HNSCC

Tabelle 2: Wiederkehrende DNA-Verluste (11 Regionen) in mindestens 30% der untersuchten HNSCC (n=60)

Tabelle 3: Wiederkehrende DNA-Zugewinne (13 Regionen) in mindestens 30% der untersuchten HNSCC (n=60)

Tabelle 4: Cluster-Verteilung der HNSCC-Fälle hinsichtlich klinischer Parameter

Tabelle 5: Kopienzahlveränderungen der beiden getesteten Gruppen mit den niedrigsten FDR adjustierten p-Werten

Tabelle 6: Klinische und histopathologische Daten in der Gruppe der Männer (n=29)

Tabelle 7: Klinische und histopathologische Daten in der Gruppe der Frauen (n=31)

Tabelle 8: Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen in Bezug auf das Geschlecht

Tabelle 9: Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen in Bezug auf den Lymphknotenbefall

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ak	autoklaviert
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Chr	Chromosom
Ct	Cycle Threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
etc.	et cetera
e. V.	eingetragener Verein
FA	Formamid
FDR	False Discovery Rate
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded; in Paraffin eingebettet; formalinfixiert
Frequ	Frequenz
fwd	forward

ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	humane Papillomviren
Hrsg.	Herausgeber
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilo-Basenpaare
LK	Lymphknoten
m	männlich
M	molar
M.	Musculus
Mb	Mega-Basenpaare
µg	Mikrogramm
min	Minute
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mM	millimolar
N.	Nervus
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
Nr	Nummer
OT	Objektträger
p. a.	pro analysi
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECA	Plattenepithelkarzinom
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
Reg	Region
rev	reverse
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SSC	Standard Saline-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
u. a.	unter anderem
V	Volt
V.	Vena
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel

A Einleitung

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches stellen weltweit die fünfthäufigste Tumorerkrankung dar (Hayes, Van Waes, & Seiwert, 2015). Die Rate maligner Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich - Ösophagus- und Schilddrüsenmalignome ausgenommen - liegt zum aktuellen Zeitpunkt bei ca. 600.000 - 700.000 Neuerkrankungen mit ca. 380.000 Todesfällen pro Jahr, sodass diese Entität eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität darstellt (Cancer Genome Atlas, 2015; Ferlay et al., 2015; Hayes et al., 2015; Torre, Bray, Siegel, Ferlay, Lortet-Tieulent, & Jemal, 2015). Mehr als 90% aller bösartigen Tumore des Kopf-Hals-Bereiches sind histologisch gesehen Plattenepithelkarzinome, die sich im oberen Aerodigestivtrakt entwickeln (Klein & Grandis, 2010). Unter dem Begriff „Kopf-Hals-Tumore“ wird eine Gruppe histologisch und ätiologisch heterogener Tumore unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen des Kopfes und des Halses zusammengefasst (Burian, Selzer, & Kornek, 2002). Betroffene Lokalisationen dieser malignen Tumore sind: die Lippen, die Mundhöhle, der Mundboden, die Zunge, der Gaumen, das Zahnfleisch, die Speicheldrüsen, der Rachen (Pharynx), der Kehlkopf (Larynx), das Mittelohr sowie die Nasenhöhle und die Nasennebenhöhle – die am häufigsten betroffenen Regionen sind dabei die Mundhöhle, der Pharynx und der Larynx (Klein & Grandis, 2010; Reiche, 2003).

Die Patienten erkranken zum Großteil in der fünften bis sechsten Lebensdekade; ca. 25% erkranken jedoch in einem Alter von mehr als 70 Jahren (Huang et al., 2011; Kruse, Bredell, Luebbers, & Gratz, 2010; Muir, Fraumeni, & Doll, 1994; Pisani, Parkin, Bray, & Ferlay, 1999; Syrigos, Karachalios, Karapanagiotou, Nutting, Manolopoulos, & Harrington, 2009). Die Zunahme an Erkrankungen im höheren Alter wird auf die immer höhere Lebenserwartung zurückgeführt (Syrigos et al., 2009). Insgesamt sind ungefähr 3/4 der betroffenen Patienten Männer, wobei dies je nach Land stark variiert (Torre et al., 2015). Frauen sind insgesamt seltener von dieser Krebsart betroffen und erkranken durchschnittlich ca. 5 Jahre später (Robert Koch-Institut (Hrsg.), und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 2012). Ein Grund, weswegen Frauen seltener an HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) erkranken als Männer ist, dass sie im Mittel weniger die beiden Hauptrisikofaktoren, Rauchen und Alkoholkonsum, aufweisen (Simard, Torre, & Jemal, 2014). Diverse Studien berichten jedoch über

eine sichtbare Angleichung der Inzidenz dieser Tumore bei Frauen und Männern, was am ehesten auf ein immer ähnlicheres Konsumverhalten in Bezug auf die Hauptrisikofaktoren zurückzuführen ist (El-Husseiny et al., 2000; Thun, Peto, Boreham, & Lopez, 2012).

Die Entstehung von HNSCC hat vielfältige Ursachen und ist mit verschiedenen Noxen und Infektionen assoziiert worden. Darunter fallen der Konsum von Tabak und Alkohol, eine ungesunde Ernährung, mangelnde Mundhygiene, das Betelnusskauen sowie Infektionen mit HPV und EBV (Gillison, 2007; Klein & Grandis, 2010; Lopez, Mathers, Ezzati, Jamison, & Murray, 2006; Wen et al., 2010). Als Hauptrisikofaktoren werden vor allem der Konsum von Tabak und Alkohol angesehen, wobei das Risiko bei kombiniertem Konsum mehrfach potenziert wird (Andre, Schraub, Mercier, & Bontemps, 1995; Hashibe et al., 2007; Olsen, Sabroe, & Ipsen, 1985; Pezzuto et al., 2015). In den letzten Jahren sind außerdem Infektionen mit Viren in den Fokus gerückt – hierbei wurde eine Assoziation von Nasopharynx-Karzinomen mit Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektionen gefunden (Yap, Hassan, Chan, Choo, & Ravichandran, 2007). Zusätzlich spielen Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV), insbesondere HPV 16 und 18 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einiger Karzinome (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011; Premoli-De-Percoco, Ramirez, & Galindo, 1998; Ragin, Modugno, & Gollin, 2007). Die Beteiligung von HPV an der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren wurde erstmals vor knapp über 30 Jahren beschrieben (K. Syrjanen, Syrjanen, & Pyrhonen, 1982; K. Syrjanen, Vayrynen, Castren, Mantyjärvi, Pyrhonen, & Yliskoski, 1983). Infektionen mit HPV sind nachgewiesen vor allem bei Oropharynx-Karzinomen relevant (Chaturvedi et al., 2013; D'Souza et al., 2007). Interessant ist hierbei, dass in den USA in den Jahren von 1984-1989 nur 16,3% der Oropharynx-Karzinome HPV-positiv waren, wohingegen es in den Jahren 2000-2004 bereits über 70% waren (Chaturvedi et al., 2013; Pytynia, Dahlstrom, & Sturgis, 2014). Insgesamt konnte in den Industrienationen eine Abnahme von Mundhöhlenkarzinomen verzeichnet werden, analog zur Abnahme des Tabakkonsums (Chaturvedi et al., 2013; Franceschi, Bidoli, Herrero, & Munoz, 2000). Gleichzeitig konnte aber eine Zunahme der Oropharynx-Karzinom Inzidenz beobachtet werden (Chaturvedi et al., 2013; Gollin, 2014). Dies wird vor allem auf die Zunahme der HPV-assoziierten Oropharynx-Karzinome zurückgeführt (Hong et al., 2010; Mehanna, Jones, Gregoire, & Ang, 2010; Nasman et al., 2009; S. Syrjanen, 2004; Tachezy et al., 2005). In einer 2014 veröffentlichten

Metaanalyse wurden insgesamt mehr als 12.000 HNSCC auf ihren HPV-Status hin überprüft. Insgesamt waren 45,8% der Oropharynx-Karzinome HPV-positiv, während bei den Karzinomen der Mundhöhle die Rate deutlich geringer, jedoch immer noch bei 24,2% lag (Ndiaye et al., 2014). Patienten mit HPV-assoziierten Tumorerkrankungen neigen insgesamt dazu deutlich jünger zu sein und weisen nicht die klassischen Risikofaktoren, Alkohol- und Tabakkonsum auf (Chaturvedi et al., 2011; Lajer & von Buchwald, 2010). In den letzten Jahren ist das Interesse an diesen Tumoren stetig gestiegen, was neben der steigenden Inzidenz vor allem damit zusammenhängt, dass die Prognose der Patienten hierdurch beeinflusst wird. Fakhry et al. haben beispielsweise in einer der ersten prospektiven klinischen Studien eine signifikant höhere Überlebensrate von Patienten mit HPV-positiven Tumoren im Gegensatz zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren nachweisen können (Fakhry et al., 2008). Auch andere Studien konnten zeigen, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren eine insgesamt längere Überlebenszeit aufweisen als HPV-negative Tumorpatienten (Pytynia et al., 2014). Dies wird aktuell auf die geringere Rate der chromosomalen Aberrationen von HPV-positiven Tumoren, auf ein besseres Ansprechen auf eine Strahlen- und Chemotherapie sowie eine damit einhergehende bessere lokoregionale Kontrolle zurückgeführt (Ang et al., 2010; Ang & Sturgis, 2012; Gollin, 2014; Posner et al., 2011; Pytynia et al., 2014; Tribius, Ihloff, Rieckmann, Petersen, & Hoffmann, 2011; Westra, 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von HPV-positiven HNO-Tumoren unabhängig von den Risikofaktoren Alkohol und Tabak stattfindet (Applebaum et al., 2007).

Histopathologisch sind Plattenepithelkarzinome, auch bekannt als Spinaliome, spinozelluläre Karzinome oder Stachelzellkrebs, maligne Tumore der Haut und Schleimhaut, welche sich aus den Zellen des Stratum spinosum entwickeln. Die Einteilung erfolgt in verhornende und nicht verhornende Karzinome; der Grad der Verhornung vermindert sich mit dem Grad der Malignität und Entartung. Plattenepithelkarzinome entwickeln sich im Allgemeinen über mehrere Vorstufen, sog. Präkanzerosen: diese beginnen klassischerweise mit einer epithelialen Hyperplasie, entwickeln sich weiter über eine Dysplasie zum *Carcinoma in situ* und schließlich zum invasiven Karzinom. Es handelt sich hierbei um histologisch definierte Veränderungen, die, vergleicht man sie mit normalem Plattenepithel, sich durch ein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung auszeichnen – dabei ist ein Übergang zur nächsten Stufe nicht zwangsläufig erforderlich. Eine Hyperplasie ist

definiert durch eine vermehrte Zellteilung und einer damit zusammenhängenden Erhöhung der Zellanzahl im betroffenen Gewebe. Beim Übergang zur Dysplasie verändert sich die Gewebestruktur und die Zelldifferenzierung nimmt ab. Der Übergang einer Dysplasie zum *Carcinoma in situ* ist fließend: es treten höhere Zellteilungsraten in allen Zellschichten, sowie ein fortschreitender Verlust des Differenzierungsgrades auf. Die maligne Veränderung bis hin zu einem invasiven Karzinom, das definitionsgemäß die Basalmembran durchbricht und benachbarte Gewebestrukturen infiltriert, kann eine Latenzzeit von mehreren Jahren haben (Riede, Werner, & Freudenberg, 2009). Sind im Vorfeld maligne HNO-Tumore entstanden, können sich des Öfteren im übrigen Aerodigestivtrakt weitere Präkanzerosen oder Karzinome entwickeln, was Slaughter et al. (1953) mit dem Begriff der „Feldkanzerisierung“ beschrieben haben. Hier wird ein Zusammenhang hergestellt, zwischen der langjährigen Exposition eines Gewebes mit kanzerogenen Stoffen, im Falle der hier beschriebenen Tumore, Tabak und/oder Alkohol, und der damit verbundenen Entwicklung multipler Tumoren dieser großflächig exponierten Gewebeareale (Slaughter, Southwick, & Smejkal, 1953). Das Ganze wurde durch den Nachweis molekularer Veränderungen von Geweberegionen mit großflächigen Neoplasien im Aerodigestivtrakt verifiziert (Braakhuis, Tabor, Kummer, Leemans, & Brakenhoff, 2003; Ha & Califano, 2003). Eine anderes Modell geht von sog. „expandierenden Feldern“ aus: im Vergleich zu Slaughters Theorie, in welcher Gewebeareale durch Noxen geschädigt und somit verändert werden, wird hier angenommen, dass eine veränderte Vorläuferzelle klonal expandiert und das umliegende Gewebe infiltriert (Scholes et al., 1998; Tabor et al., 2002).

Das Stadium von Kopf-Hals-Tumoren wird an Hand der TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasis) der Union internationale contre le cancer (UICC) eingeteilt – dabei hat jede anatomische Tumor-Lokalisation eine eigene definierte Klassifikation (Wittekind & Meyer, 2010). Die TNM-Klassifikation der Karzinome der Mundhöhle kann Anhang 1 entnommen werden und kann als Anhalt für die Einteilung anderer Kopf-Hals-Tumore verwendet werden.

Kopf-Hals-Tumore werden mittels Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie behandelt. Heutzutage besteht die Therapie vornehmlich aus interdisziplinären und multimodalen Kombinationsbehandlungen (Kessler et al., 2007). Die Therapie sollte bei allen Patienten individuell gestaltet werden und erfolgt in Abhängigkeit der jeweiligen Tumorlokalisierung, histologischer bzw. pathologischer Befunde, von

Befunden bildgebender Verfahren (u. a. Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Positronen-Emissions-Tomographie) sowie des Alters und des Allgemeinzustandes des Patienten. Idealerweise sollte die Planung der Therapie durch ein interdisziplinäres Ärzteteam erfolgen, in welchem Chirurgen, Strahlentherapeuten, Onkologen sowie Pathologen gemeinsam die jeweilige Therapiestrategie festlegen. Dabei stehen der Erhalt der physiologischen Funktion bei gleichzeitiger lokaler Tumorkontrolle und möglichst geringem Rezidivrisiko im Vordergrund (Dimery & Hong, 1993). Die Chirurgie ist weiterhin die Methode der Wahl in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren; das vornehmliche Ziel ist dabei die vollständige Entfernung des Tumors (R0-Resektion) sowie ggf. vorhandener Lymphknotenmetastasen (Burian et al., 2002). Eine Operation, bei der zusätzlich zur kompletten Resektion des Tumors auch alle regionalen Lymphknoten entfernt werden, wird als „Neck Dissection“ bezeichnet. Eine radikale „Neck Dissection“ liegt vor, wenn zusätzlich zu den Lymphknoten folgende anatomische Strukturen entfernt werden: V. jugularis interna, M. sternocleidomastoideus sowie der N. accessorius (Robbins et al., 2002). Wenn es die Lokalisation sowie die Ausdehnung des Tumors gestatten, wird versucht die Funktion so weit es geht zu erhalten (funktionelle „Neck Dissection“). Heutzutage wird zwischen elektiver, selektiver und (modifiziert) radikaler „Neck Dissection“ unterschieden (Burian et al., 2002). Teilweise ist auf Grund der Lage bzw. der Ausdehnung des Tumors nicht immer eine Resektion möglich, sodass neben der Chirurgie vor allem die Strahlentherapie Anwendung bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren findet. Die Strahlentherapie wird vornehmlich als perkutane Therapie mit sog. Linearbeschleunigern durchgeführt. Die Strahlentherapie kann einerseits als alleinige Behandlungsmethode bei inoperablen Tumoren, zu hohem Operationsrisiko des Patienten (hohes Alter, Begleiterkrankungen, etc.) oder auch in Kombination mit einer Chemotherapie erfolgen. Des Weiteren wird sie als zusätzliche Maßnahme zur Verkleinerung von Tumoren vor (neoadjuvant) oder, um verbliebene Tumorreste zu behandeln, nach (adjuvant) einer Operation angewendet (Burian et al., 2002; Eich et al., 2008). Solche Konzepte, bei denen Chirurgie, Strahlentherapie und/oder Chemotherapie simultan eingesetzt werden, zeigen gute Erfolge in der Behandlung vor allem fortgeschrittener Tumore. Hierbei wurden positive Resultate mit neoadjuvanten Radio-Chemotherapien erbracht (Eich et al., 2008). Patienten, die auf diese Art und Weise behandelt wurden, zeigten ein signifikant längeres, rezidivfreies Überleben, wenn

man diese mit adjuvant behandelten Patienten vergleicht (Kessler et al., 2007; Kessler, Grabenbauer, Leher, Bloch-Birkholz, Vairaktaris, & Neukam, 2008; Mohr et al., 1994). Tumore von Patienten, die initial auf Grund der Größe und/oder Lokalisation des Tumors nicht operabel sind, können mittels neoadjuvanter Therapie verkleinert und damit resektabel werden. Dennoch ist die neoadjuvante Strahlentherapie nicht bei allen HNSCC als Standardtherapie zu werten. Aktuell besteht die Standardtherapie lokal fortgeschrittener aber resektabler HNSCC aus einer primären chirurgischen Resektion, gefolgt von einer, je nach den individuellen Umständen, Radio- oder Radiochemotherapie (Vishak, Rangarajan, & Kekatpure, 2015). Die Chemotherapie ist bei bestimmten Patienten und lokal fortgeschrittenen Tumoren vorzuziehen (Georges et al., 2014). Letztendlich hängt die Behandlung immer von verschiedenen Faktoren ab (u. a. vom Alter, Begleiterkrankungen des Patienten, der Tumorausdehnung und -lokalisierung). Das Ziel jeder Therapie ist die Tumorerkrankung so gut es geht zu behandeln und gleichzeitig die Lebensqualität soweit wie möglich zu erhalten. In den letzten 20 bis 30 Jahren konnten einige Fortschritte in den Gebieten der Krebsforschung von Kopf-Hals-Tumoren erreicht werden, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in Bezug auf neue Therapieansätze. Die 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Zeitraum hat sich erstaunlicherweise jedoch nicht wesentlich verändert: diese liegt immer noch bei nur 40-50% (Cancer Genome Atlas, 2015; Leemans et al., 2011; Wolff et al., 2012). Die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle spielen hier jedoch lokale Rezidive, Metastasierung, die Entwicklung weiterer lokaler Primärtumore sowie Resistenzen gegenüber der Strahlen- und Chemotherapie (Leemans et al., 2011). Neue Therapiestrategien mit Antikörpern oder Inhibitoren zielen auf molekulare, therapeutische Zielmoleküle („targeted therapy“) in deregulierten Signalwegen und damit auf eine zielgerichtete Behandlung von Tumorerkrankungen ab (Leemans et al., 2011). Die Überexpression des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) tritt in fast allen HNSCC auf und korreliert mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, einer vermehrten Lymphknotenmetastasierung sowie einem schlechteren Überleben (Dassonville et al., 1993; Georges et al., 2014; Xia et al., 1999). Ein wichtiger Schritt in der Behandlung von HNSCC war die Einführung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, welcher gegen den EGFR gerichtet ist (Georges et al., 2014). In Kombination mit einer Radiotherapie zeigte sich ein besseres Überleben als in der Kontrollgruppe, die nur die Radiotherapie

erhielt (Bonner et al., 2006). Als weiteres Beispiel der „targeted therapy“ kann der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) herangezogen werden. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese und damit bei der Metastasierung und der Tumorprogression (Vassilakopoulou, Psyrri, & Argiris, 2015). In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des VEGF mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Zang et al., 2013). Auch hier konnte mit dem gegen VEGF gerichteten monoklonalen Antikörper Bevacizumab eine verbesserte Tumorthherapie in Kombination mit einer Radiotherapie erreicht werden (Hoang, Huang, Armstrong, Eickhoff, & Harari, 2012; Nyflot et al., 2015).

Diese neuen Therapien sowie deren Erfolge zeigen, wie wichtig ein besseres vor allem molekulares Verständnis der Tumorbilogie sowie eine damit einhergehende individualisierte Therapie sind.

Insgesamt wird die Entstehung und Progression von HNSCC durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen, wobei z. B. Tumorsuppressorgene herunterreguliert werden oder Protoonkogene aktiviert werden, beeinflusst (Cancer Genome Atlas, 2015; Gollin, 2014). Schon in den 1990er Jahren konnten beispielsweise Heterozygotie-Verluste (loss of heterozygosity) (LOH) auf den Chromosomen 9p21, 3p21 und 17p13 als frühe Veränderungen bei der Transformation von normalem zu dysplastischem Gewebe beobachtet werden. Bei der Entwicklung eines *Carcinoma in situ* und dem Übergang zu einem invasiven Karzinom, wurden weitere LOH gefunden, beispielsweise auf den Chromosomen 4q26-28, 6p, 8p, 8q, 11q13, 13q21, 14q31 (Califano et al., 1996). In den folgenden Jahren konnten weitere Aberrationen detektiert werden. So ist bei Gollin zu lesen, dass DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q26-qter, 5p15, 8q11-21 und 8q24.1-qter sowie DNA-Verluste auf 18q22-qter mit einer Transition von milder zu moderater Dysplasie auftreten. Zugewinne auf 11q13, 14q, 17q11-22 und 20q sowie Verluste auf 9p sind involviert im Übergang von moderater zu schwerer Dysplasie. Verluste auf 3p14-21 und 5q12-22 werden häufig in Zusammenhang mit einer Progression von schwerer Dysplasie hinzu einem invasiven Karzinom beobachtet (Gollin, 2014). Die häufigsten zytogenetischen Aberrationen in HNSCC sind DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q26, 5p14-15, 7p11, 8q11-12, 8q24, 11q13, 20q12-13 sowie DNA-Verluste auf 3p, 4q35, 5q12, 8p23, 9p21-24, 11q14-23, 13q12-14, 18q23 und 21q22 (Gollin, 2014). Abgesehen hiervon sind in Tumoren häufig die Expressionsmuster einzelner Gene verändert: dazu gehören z. B. Proteine der epidermalen

Differenzierung, der Zelladhäsion, des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix sowie Entzündungsmediatoren (Choi & Chen, 2005). Zu den häufigsten Veränderungen zählen bei den HPV-positiven Tumoren Mutationen von *PIK3CA*, der Verlust von *TRAF3* sowie Amplifikationen von *E2F1*. Fast alle mit Tabakkonsum assoziierten Tumore zeigen den Verlust von *TP53* sowie Mutationen von *CDKN2A*. *EGFR* Überexpression tritt vornehmlich in HPV-negativen Tumoren auf (Cancer Genome Atlas, 2015).

Wie eingangs erwähnt, entwickelt der Großteil der Patienten HNSCC in der fünften bis sechsten Lebensdekade; dies wird unter anderem auf den demographischen Wandel und die damit einhergehende immer höhere Lebenserwartung zurückgeführt (Huang et al., 2011; Kruse et al., 2010; Muir et al., 1994; Pisani et al., 1999; Pritzkeleit, Beske, & Katalinic, 2010; Syrigos, Karachalios, Karapanagiotou, Nutting, Manolopoulos, & Harrington, 2009). Dies macht sich auch dadurch bemerkbar, dass ältere Frauen, die nicht die klassischen Risikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum aufweisen, ebenfalls Kopf-Hals-Tumore entwickeln. Auch wenn diese Frauen ohne die genannten Risikofaktoren deutlich seltener Plattenepithelkarzinome des Aerodigestivtraktes entwickeln, ist es bisher ungeklärt weswegen insbesondere in höherem Alter die Inzidenz dieser Tumore in dieser seltenen Patientengruppe ansteigt. Ein Teil dieser Tumore könnte vor allem im Oropharynx mit HPV-Infektionen assoziiert sein – wie bereits oben erwähnt sind laut einer Metaanalyse 45,8% der Oropharynx-Karzinome HPV-positiv, während bei den Karzinomen der Mundhöhle die Rate deutlich geringer, jedoch immer noch bei 24,2% liegt (Ndiaye et al., 2014).

Klinisch ist diese Gruppe der älteren, eher untypischen Patienten vor allem interessant, da es sich häufig um multimorbide Patienten handelt, bei welchen größere, radikale Tumoroperationen mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Sollten sich Unterschiede in der Tumorbilogie ergeben, kann unter Umständen in Zukunft eine individualisierte, weniger invasive und somit für die Patienten risikoärmere Therapie entwickelt werden. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob Tumore von Frauen, die den Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum nicht ausgesetzt waren, andere genomische Aberrationen aufweisen als Tumore von Männern mit den genannten Risikofaktoren.

Studien an Tumorgewebe erfolgen aus praktischen Gründen meistens an formalinfixiertem Paraffingewebe (FFPE-Gewebe), welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Eine Herausforderung bei Analysen an FFPE-Gewebe sind die

durch die Formalinfixierung entwickelten Quervernetzungen von Molekülen sowie die DNA-Degradierung (Ferrer et al., 2007). Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) kann DNA aus FFPE-Gewebe analysiert werden. Bei dieser Methode werden DNA-Zugewinne und DNA-Verluste in Tumorgewebe detektiert (Kallioniemi et al., 1992). Bei der CGH werden die Tumor-DNA und eine Referenz-DNA mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf Metaphasechromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzunterschiede lassen sich die chromosomalen Unterschiede in Form von DNA-Verlusten und DNA-Zugewinnen identifizieren. Wenn in einer Region mehr Fluoreszenz-markierte Tumor-DNA als die zugehörige Referenz-DNA bindet, überwiegt somit die Fluoreszenz der Tumor-DNA und impliziert einen DNA-Zugewinn im Tumor. Das Prinzip entspricht demjenigen bei DNA-Verlusten, nur umgekehrt. Wie bereits weiter oben beschrieben sind derartige DNA-Verluste und -Zugewinne bei der Entstehung von Tumoren außerordentlich wichtig; es kann zum Verlust von Tumorsuppressorgenen oder zur Amplifikation von Protoonkogenen kommen. Bei der CGH liegt die Auflösung bei lediglich ca. 10 Mb (Petersen, Schwendel, Bockmuhl, & Dietel, 1996). Eine Weiterentwicklung ist die Array-CGH (Pinkel et al., 1998): hierbei werden die Metaphasechromosomen durch Ziel-DNA-Fragmente, beispielsweise BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) auf einem Objektträger ersetzt. Dadurch kann das Auflösungsvermögen von 10 Mb auf 100 Kb erhöht werden (de Ravel, Devriendt, Fryns, & Vermeesch, 2007; Pinkel & Albertson, 2005); veränderte chromosomale Regionen können somit besser eingegrenzt und dort lokalisierte Kandidatengene identifiziert werden (Liu, Lin, Chen, Chang, & Chang, 2006; Nakaya et al., 2007). Neben chromosomalen Aberrationen spielen in der Tumorgenese noch viele weitere Faktoren eine Rolle: so konnte gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung von Promoterbereichen verschiedener Tumorsuppressorgene (Gronbaek, Hother, & Jones, 2007; Worsham et al., 2006), eine genomweite Hypomethylierung, die zu Instabilitäten führt (Ehrlich, 2002) oder auch Translokationen mit Bildung von Fusionsproteinen maßgeblich an der Tumorgenese beteiligt sind (Singh et al., 2001). Für derartige Untersuchungen ist FFPE-Gewebe nicht geeignet, da Metaphasepräparate hierfür notwendig sind.

Insgesamt ist es wichtig die ursächlichen molekularen Mechanismen der Tumorgenese und daraus resultierende Prognosefaktoren besser zu verstehen. Insbesondere Tumoreigenschaften wie z. B. das Potential zur Metastasierung oder

die Resistenz gegenüber Therapien sind hierbei von Bedeutung. Dadurch kann in Zukunft die Therapie individualisiert und maßgeblich beeinflusst werden. Interessant ist hierbei, ob sich Tumore von Patienten, welche die klassischen Risikofaktoren (Alkohol- und Tabakkonsum) aufweisen, von Tumoren älterer Patienten, die diese klassischen Risikofaktoren nicht aufweisen, unterscheiden. Insbesondere diese älteren Patienten, welche häufig multiple Begleiterkrankungen aufweisen, könnten somit von einer individualisierten Therapie profitieren.

B Problemstellung

Obwohl es bereits eine Reihe von Studien zu Kopienzahlveränderungen in HNSCC gibt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, inwieweit sich Tumore von Patienten mit klassischen Risikofaktoren (v. a. Tabak- und Alkoholkonsum) von solchen unterscheiden, die diesen Risikofaktoren nicht ausgesetzt waren. Ziel dieser Arbeit war es somit Kopienzahlveränderungen in Tumoren von Männern, die einen ausgeprägten Alkohol- und Tabakkonsum aufwiesen, mit den Aberrationen in Tumoren von älteren Frauen, die diese klassischen Risikofaktoren nicht aufwiesen, zu analysieren und zu vergleichen. Es wurden initial Gewebeschnitte aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumoren hergestellt und daraus die Tumor-DNA isoliert. Im Anschluss erfolgte eine Qualitätskontrolle der DNA mittels Multiplex-PCR sowie die Untersuchung der extrahierten Tumor-DNA auf genomweite Kopienzahlveränderungen mit Hilfe der Array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (Array-CGH). In statistischen Analysen wurden die ermittelten Veränderungsregionen auf Assoziationen mit klinischen Daten und bezüglich Unterschieden zwischen den beiden Gruppen untersucht. Des Weiteren wurden die Veränderungsprofile der in dieser Arbeit untersuchten HNSCC mit bereits publizierten Kopienzahlveränderungen in Kopf-Hals-Tumoren verglichen.

C Material und Methoden

C.1 Patientenmaterial

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorproben handelt es sich zum Großteil (n=54) um Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und in geringem Maße des Oropharynx (n=4) - bei zwei Tumoren konnte die exakte Lokalisation innerhalb des Mund-/Rachenraumes rückblickend nicht eindeutig identifiziert werden. Die Gewebeproben stammen aus dem Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar in München und wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Höfler und Frau Dr. Drecoll zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden anhand der klinischen Daten aus den Patientenakten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar ausgewählt. Dabei wurden zwei Gruppen gebildet: zum einen Männer mittleren Alters mit den bekannten Risikofaktoren Nikotinabusus in Kombination mit Alkoholkonsum und zum anderen Frauen ab einem Lebensalter von 70 Jahren, welche die beiden zuvor genannten Risikofaktoren nicht aufwiesen. Dabei wurden die Frauen intensiv befragt, ob sie in ihrem Leben geraucht oder regelmäßig höher prozentigen Alkohol konsumiert haben; war dies der Fall, wurden diese Patientinnen ausgeschlossen. Initial gab es die Idee als Vergleichsgruppe zu den Männern mit den klassischen Risikofaktoren, männliche Kontrollpatienten einzuschließen, die diese Risikofaktoren nicht aufwiesen. Es konnten jedoch nicht ausreichend männliche Patienten ohne diese Risikofaktoren identifiziert werden. Dies liegt am ehesten daran, dass in den letzten Jahrzehnten ein großer Teil der männlichen Bevölkerung Tabak regelmäßig konsumiert hat, während der Anteil bei den Frauen geringer war (Cummings & Proctor, 2014). Die klinischen Daten der letztendlich untersuchten Patienten sind anhand der Patientenakten gut dokumentiert und in Tabelle 1 wiedergegeben. Das Projekt wurde von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar genehmigt (Projektnummer: 2633/09).

Tabelle 1: klinische Daten der untersuchten 60 HNSCC

	Gesamt [%]
Anzahl	60 [100]
männlich	29 [48,3]
weiblich	31 [51,7]
Tumorlokalisation	
Mundhöhle	54 [90]
Oropharynx	4 [6,7]
Nicht angegeben	2 [3,3]
Größe des Primärtumors T	
T1	8 [13,3]
T2	22 [36,7]
T3	10 [16,7]
T4	18 [30]
TX	2 [3,3]
Lymphknotenbefall N	
N0	24 [40]
N1	9 [15]
N2	20 [33,3]
N3	0 [0]
NX	7 [11,7]
Histologische Differenzierung G	
G1	4 [6,7]
G2	37 [61,6]
G3	19 [31,7]
Metastasierung M	
M0	5 [8,3]
M1	1 [1,7]
MX	54 [90]
Resektionsstatus R	
R0	43 [71,7]
R1	6 [10]
RX	11 [18,3]

C.2 Häufig verwendete Lösungen

C.2.1 Ethanol 90%

Ethanol absolut p. a. (Merck)	90 ml
H ₂ O _{bidest.}	10 ml

C.2.2 Ethanol 70%

Ethanol absolut p. a. (Merck)	70 ml
H ₂ O _{bidest.}	30 ml

C.2.3 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x

Natriumchlorid (Merck)	80 g
Kaliumchlorid (Merck)	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O (Merck)	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)	15 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 800 ml
pH 7 mit 1 M HCl (Merck)	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
ak	

C.2.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x

PBS 10x (C.2.3)	100 ml
H ₂ O _{bidest}	900 ml

C.2.5 Natriumacetat 3 M

Natriumacetat (Merck)	246 g
H ₂ O _{bidest}	ad 800 ml
pH 4,8 mit Eisessig (Merck)	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

ak

C.2.6 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 20x

NaCl (Merck)	175,3 g
Natrium-Citrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H ₂ O _{bidest}	ad 800 ml
pH 7 mit 1 M HCl (Merck)	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

ak

C.2.7 Standard Saline-Citrat-Puffer (SSC) 2x

SSC 20x (C.2.6)	40 ml
H ₂ O _{bidest}	360 ml

C.2.8 20x WASH solution

WASH powder (Chipron)	
H ₂ O _{bidest}	1000 ml

C.2.9 1x WASH solution

20x WASH solution (C.2.8)	50 ml
H ₂ O _{bidest}	950 ml

C.3 Herstellung und Verarbeitung der Tumorgewebeschnitte

C.3.1 Herstellung der FFPE-Gewebeschnitte

Material

- Paraffinblöcke
- Menzel-Gläser SuperFrost Plus[®] (für 3 µm Schnitte)
 - o SuperFrost Plus Artikel-Nummer: J1800AMNZ/geschliffen 90°
Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, 38116 Braunschweig
- Menzel-Gläser SuperFrost Ultra Plus[®] (für 10 µm Schnitte)
 - o SuperFrost Ultra Plus Art.-Nr.: J3800AMNZ/geschliffen 90°/J4800AMNZ/geschliffen 45°
Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, 38116 Braunschweig
- Mikrotom HM 355 (Microm)
- Paraffin-Streckbad TFB 35 (Medite)

Durchführung

Das zu untersuchende Tumorgewebe lag in Form von formalin-fixierten Paraffinblöcken vor. Für die DNA-Isolation wurden pro Fall je nach Größe des Tumorblocks 10-20 Schnitte à 10 µm Dicke hergestellt. Für die HE-Färbung wurden 1-2 Schnitte à 3 µm Dicke hergestellt. Die mittels Mikrotom hergestellten Schnitte wurden zur weiteren Verwendung auf Objektträgern platziert.

C.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um später die Mikrodissektion des Tumorgewebes vornehmen zu können und somit das zu untersuchende Tumorgewebe von Bindegewebe und ähnlichen Strukturen zu trennen, mussten die Schnitte mikroskopisch beurteilt werden. Hierzu eignen sich Gewebeschnitte, die mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt werden. Alle sauren Strukturen des Gewebes, u. a. die Zellkerne und das raue endoplasmatische

Retikulum werden mittels Hämatoxylin blau-violett angefärbt. Basische Strukturen, wie beispielsweise Zellplasmaproteine werden mittels Eosin rot angefärbt (Welsch, Sobotta, & Deller, 2010). Es bestanden bereits für einen Teil der Gewebeproben HE-Schnitte aus der Pathologie des Klinikums rechts der Isar, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Für alle weiteren Tumorproben wurden HE-Schnitte angefertigt.

Material

- Xylol
- Isopropanol
- 100% Ethanol (Merck)
- 90% Ethanol (C.2.1)
- 70% Ethanol (C.2.2)
- Hämatoxylin nach Mayer
- Eosin
- Deckgläser

Durchführung

Bevor die Tumorgewebeschnitte gefärbt werden können, müssen diese bei 60°C für zwei Stunden fixiert werden. Im Anschluss werden diese entparaffiniert. Hierzu werden die FFPE-Schnitte für 20 min in Xylol gestellt. Daran folgt eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 5 min in Isopropanol, 100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol). Die Schnitte werden dann mit Hämatoxylin 1 min gefärbt und 5 min unter Leitungswasser gebläut. Vor der Färbung mit Eosin werden die Proben noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol für je 15 sec dehydratisiert. Im Anschluss werden die Schnitte mit Eosin für 1 min gefärbt und dann mit einem Deckglas eingedeckt (Welsch et al., 2010). Von Herrn Prof. Axel Walch von der Abteilung für analytische Pathologie am Helmholtz Zentrum München wurden die Schnitte mikroskopisch begutachtet. Hierbei wurde das Zieltumorgewebe von Normalgewebe und Bindegewebe optisch abgegrenzt und markiert. Dies war für die nachfolgende Mikrodisektion der Tumorschnitte vor der DNA-Isolation wichtig, um einen möglichst hohen Anteil an Tumorzellen im DNA-Isolat gewährleisten zu können.

C.3.3 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Material

- Formalinfixierte Paraffin-Tumorgewebeschnitte von 10 µm Dicke auf Objektträgern (OT)
- HE-gefärbte Gewebeschnitte
- Xylol
- Isopropanol
- Ethanol 100%
- Ethanol 70% (C.2.2)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x (C.2.4)

Durchführung

Zuerst werden die OT 2 x 20 min in Xylol, danach 5 min in Isopropanol gestellt; daraufhin werden sie für jeweils 5 min zuerst in 100% Ethanol und dann in 70% Ethanol inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS werden die OT entweder getrocknet und in Stickstoff tiefgefroren oder gleich weiterverarbeitet.

C.3.4 Mikrodissektion der Gewebeschnitte

Material

- Mikroskop
- Chirurgisches Einmal-Skalpell
- Injektionsnadel Sterican[®]
- HE-gefärbte Gewebeschnitte
- entparaffinierte Tumorgewebeschnitte
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG)
- ATL-Puffer des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen)

Durchführung

Anfangs werden Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG) mit jeweils 180 µl ATL-Puffer befüllt. Anhand der Einzeichnung der HE-Schnitte wird nur der Teil des Gewebeschnittes verwendet, in dem sich angereichert die Tumorzellen befinden; somit wird verhindert, dass für die weitere Untersuchung nicht benötigtes Gewebe wie z. B. gesundes Epithel, Narbengewebe oder anderes Bindegewebe in den weiteren Untersuchungsansatz gelangt.

Mit Hilfe einiger Tropfen ATL-Puffer, des Skalpell und der Injektionsnadel wird der Tumor tragende Teil des Schnittes vom OT abgelöst und in das mit ATL-Puffer befüllte Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben.

C.3.5 Isolierung der Tumor-DNA

Material

- Mikrodissesektierte Tumorschnitte in 180 µl ATL-Puffer
- Heizblock
- Heizblock/Schüttler: „Thermomixer Compact“ (Eppendorf)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
 - Proteinase K
 - RNase A
 - AL-Puffer
 - AW1-Puffer
 - AW2-Puffer
- H₂O_{bidest}
- Ethanol 100%
- Zentrifuge
- ERGs
- Extraktionssäulen

Durchführung

Zu Anfang werden die Heizblöcke auf 56°C aufgeheizt. Danach wird zu den Tumorschnitten in ATL-Puffer 20 µl Proteinase K gegeben, dann das Ganze gut per

Vortex gemischt und bei 56°C inkubiert bis sich das komplette Gewebe gelöst hat. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wird das Eppendorf-Reaktionsgefäß im „Thermomixer Compact“ inkubiert, da hier neben der Inkubationstemperatur gleichzeitig eine Schüttelbewegung ausgeführt wird. Um das Ganze weiter zu beschleunigen, wird der Probenansatz regelmäßig gut durchgemischt. Sobald sich das Gewebe komplett gelöst hat, wird das ERG kurz zentrifugiert, um Tropfen, die am Deckel des Gefäßes durch die Wärme entstanden sind, wieder in Lösung zu bringen. Jetzt werden 4 µl RNase A hinzugefügt, das Ganze per pulse-vortexen 15 sec gut gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren werden 200 µl AL-Puffer hinzugegeben, die Probe 15 sec per pulse-vortexen gemischt und danach bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren werden 200 µl 100% Ethanol hinzugefügt und per pulse-vortexen wieder 15 sec gemischt, danach zentrifugiert um wiederum Tropfen von den Rändern und dem Deckel zu lösen. Jetzt werden die Proben auf die Extraktionssäulen übertragen, die in Auffang-ERGs platziert werden. Die Säulen werden 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert und das resultierende Filtrat verworfen. Danach werden die Säulen in neue Auffang-ERGs platziert. Jetzt wird 500 µl AW1-Puffer auf die Membran der Extraktionssäulen pipettiert und wiederum für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wird AW2-Puffer zugegeben und die Probe für 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Um sicher zu gehen, dass sich kein Waschpuffer mehr auf der Membran befindet, werden die Säulen ein weiteres Mal diesmal ohne weitere Flüssigkeitszugabe bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird jeweils verworfen.

Bei der jetzt folgenden Elution der DNA werden 50 µl H₂O_{bidest} auf die Membran pipettiert und das Ganze dann bei Raumtemperatur für 5-10 min inkubiert, um die DNA aus der Membran zu lösen; anschließend wird die Extraktionssäule in ein frisches 1,5 ml ERG gestellt und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit weiteren 50 µl H₂O_{bidest} wiederholt, sodass am Ende die DNA in insgesamt zwei ERGs à 50 µl vorliegt.

C.3.6 Konzentrationsbestimmung der Tumor-DNA

Material

- NanoDrop® Spektrophotometer
- H₂O_{bidest}

Durchführung

Mit Hilfe des NanoDrop® Spektrophotometers kann die Konzentration der im vorhergehenden Schritt isolierten Tumor-DNA bestimmt werden. Dabei wird nur eine sehr geringe Menge der DNA benötigt (1-2 µl), was den Vorteil hat, dass nur wenig Material verloren geht. Das Prinzip besteht darin, dass zwischen dem oberen und unteren Säulenfuß des Geräts eine Flüssigkeitssäule entsteht, durch die ein Lichtstrahl einer Xenonlichtquelle geschickt und dabei die Absorption bei 260 nm gemessen wird. Um einen Referenzwert zu erhalten, wird vor der eigentlichen Extinktionsmessung das Gerät mit 1-2 µl H₂O_{bidest} geeicht. Die Konzentration der DNA wird in ng/µl angegeben. Die Reinheit der DNA wird anhand von zwei Werten ermittelt: aus den Verhältnissen der Absorptionen bei 260/280 nm sowie bei 260/230 nm. Der Wert des Quotienten aus 260/280 nm sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen – ist das nicht der Fall, weist das auf eine Kontamination mit Proteinen hin. Der zweite Wert sollte >2 sein. Ist dieser Wert <2 ist das ein Hinweis, dass bei der vorhergehenden Isolierung der Tumor-DNA Verunreinigungen in Form von z. B. Wasch-Puffer oder Ethanol entstanden sind. Ein charakteristisches Spektrum einer gemessenen DNA-Probe ist in Abbildung 1 dargestellt.

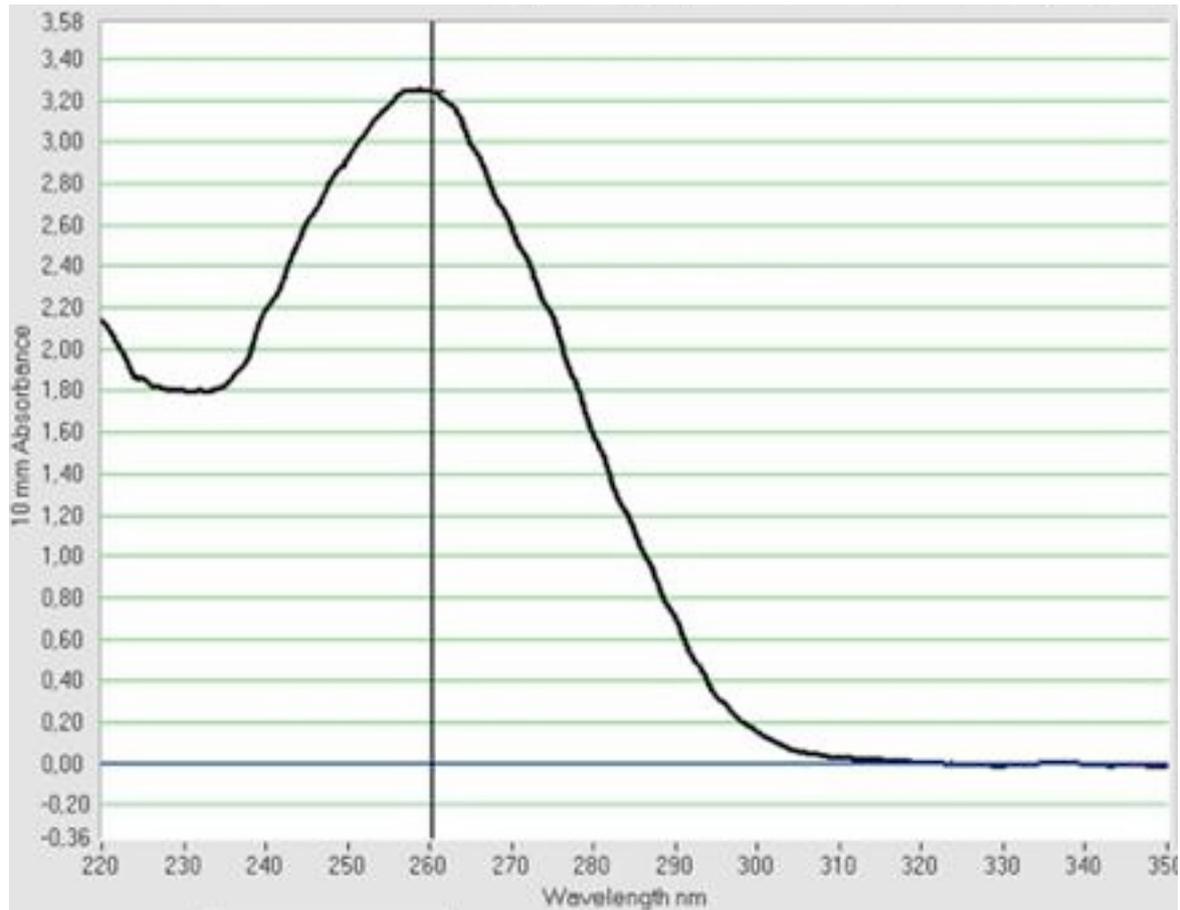


Abbildung 1: Darstellung der Konzentrationsbestimmung einer DNA-Probe im NanoDrop® Spektrophotometer.

Die Konzentrationskurve (Absorption bei verschiedenen Wellenlängen) zeigt in der Messung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

C.4 HPV-Analyse

Da analog zu einer 2014 veröffentlichten Metaanalyse mit mehr als 12.000 HNSCC insgesamt 45,8% der Oropharynx-Karzinome und 24,2% der Karzinome der Mundhöhle HPV-positiv waren, wurde bei dem vorliegenden Patientenkollektiv eine HPV-Analyse durchgeführt (Ndiaye et al., 2014). Ziel war es initial die HNSCC der Männer und Frauen zu untersuchen und hinsichtlich möglicher Unterschiede in Bezug auf den HPV-Status zu überprüfen.

Hierzu wurden drei verschiedene Testverfahren verwendet: LCD-Arrays, p16^{INK4a} Immunhistochemie und HPV-qRT-PCR. Mit Hilfe des LCD-Arrays soll die HPV-DNA, nach einer PCR-Reaktion, direkt mittels Farbumschlag nachgewiesen werden. Da bei dieser Methode ausreichend Tumor-DNA benötigt wird und nicht von allen Patienten ausreichend Tumormaterial, jedoch noch einzelne FFPE-Gewebeschnitte vorhanden waren, wurde neben dem LCD-Array zur weiteren Testung auf HPV-Infektion der Tumore eine p16^{INK4a} Immunhistochemie durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Surrogatmarker. Ein Problem bei dem immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a} ist, dass in HNSCC häufig eine heterozygote oder homozygote Deletion der chromosomalen Bande 9p21 vorliegt. In diesem Bereich liegt das Gen *CDKN2A*, das für das Protein p16 kodiert, sodass bei einer alleinig durchgeführten IHC die Möglichkeit einer falsch negativen Testung besteht. Aus diesem Grund sollte zusätzlich eine PCR zum Nachweis von HPV-DNA durchgeführt werden (Gollin, 2014).

HPV-positive Tumore wurden im Anschluss von weiteren Analysen ausgeschlossen, nachdem diese insgesamt weniger genetische Alterationen aufweisen als HPV-negative Tumore (Gollin, 2014).

C.4.1 LCD-Array

Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Chipbasierten Detektionsmethode (HPV^{Type} 3.5 LCD-Array-Kit, Chipron GmbH, Berlin) können 32 HPV-Subtypen gleichzeitig identifiziert werden. Hierbei werden HPV-spezifische DNA-Segmente (L1-Region) mittels zweier Primerpaare, HPV MY 11/09 und HPV '125', amplifiziert. Die erste PCR-Reaktion wird mit den Primer-Sequenzen My 11/09 durchgeführt, wodurch ein DNA-Fragment von ~450 bp generiert wird. Mit diesem Primer-Mix

werden jedoch nicht alle HPV-Varianten detektiert, sodass ein zweiter Primer-Mix (Mix '125') verwendet wird. Hier wird ein kürzeres Fragment von 125 bp generiert, sodass vor allem mit Tumorgewebe gearbeitet werden kann, welches degradiert und von schlechterer Qualität ist. Beide PCR-Produkte werden unabhängig voneinander hergestellt und werden vor der eigentlichen Hybridisierung vereint. Dieses vereinte biotinylierte PCR-Produkt wird dann auf den LCD-Chip, der HPV-Subtyp-spezifische Sonden enthält, hybridisiert. Im Anschluss daran folgt ein stringenter Waschschrift um ungebundene Komponenten zu entfernen. Mit Hilfe einer Enzymreaktion mit einem chromogenen Substrat werden die gebundenen Amplikons sichtbar gemacht. Insgesamt sind 32 HPV-Stämme auf dem Chip vertreten, darunter die am häufigsten für Karzinome verantwortlichen high-risk Stämme HPV 16 und 18.

C.4.1.1 PCR

Material:

- Master-Mix
 - o AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase 5 U/μl (Applied Biosystems) 1,5 μl
 - o AmpliTaq[®] Gold PCR-Puffer 12,5 μl
 - o dNTPs 1 mM (Fermentas) 5 μl
 - o Primer-Mix A My 11/09 (Chipron) 5 μl
 - o oder Primer-Mix '125' (Chipron) 10 μl
 - o H₂O_{bidest.} ad 115 μl
- Master-Mix 23 μl
- isolierte Tumor-DNA 2 μl
- PCR-Maschine GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Sterilbank (BDK)
- ERGs

Durchführung:

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt werden. Initial werden für die beiden PCR-Reaktionen zwei Master-Mixe mit den beiden Primer-Mixen A: My 11/09 und B: '125'

hergestellt. Hierfür werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß folgende Komponenten gemischt: 12,5 µl Puffer, 5 µl dNTP-Mix, entweder 5 µl Primer-Mix A: My 11/09 oder 10 µl des Primer-Mix B: '125', 1,5 µl AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase; schließlich wird der Ansatz auf ein finales Volumen von 115 µl mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Von diesen beiden Master-Mixen werden Aliquots zu je 23 µl hergestellt. Hierzu werden 2 µl der zu untersuchenden DNA gegeben. Diese Mischungen werden vorsichtig vermengt und kurz abzentrifugiert, bevor die Proben in den PCR-Block gestellt werden. Hier wird unter den folgenden Bedingungen inkubiert: 3 min bei 96°C, (1 min bei 94°C, 1 min 30 sec bei 45°C, 1 min 30 sec bei 72°C) x 42 Zyklen, 3 min bei 72°C. Im Anschluss an die PCR wird ein 1,5%iges Agarosegel wie unter C.5.1.2 beschrieben verwendet um die Amplifikate aufzutrennen und somit die Qualität der PCR-Produkte beurteilen zu können. Dabei wird beim Primer-Mix A: My 11/09 eine Fragmentgröße von ca. 450 bp und beim Primer-Mix B: '125' eine Fragmentgröße von ca. 125-155 bp erwartet.

C.4.1.2 Beschreibung des LCD-Array

Jeder LCD-Chip enthält acht identische Arrays in rechteckigen Reaktionskammern. Die HPV-Subtyp-spezifischen Sonden liegen immobilisiert als vertikale Duplikate vor. Funktionelle Kontrollpunkte, um die Hybridisierung und Anfärbung zu monitoren, sind in drei Ecken lokalisiert. Der Array an sich besteht aus einem 9 x 9 Raster, wobei jeder Spot einen durchschnittlichen Durchmesser von 300 µm besitzt (Abb. 2).

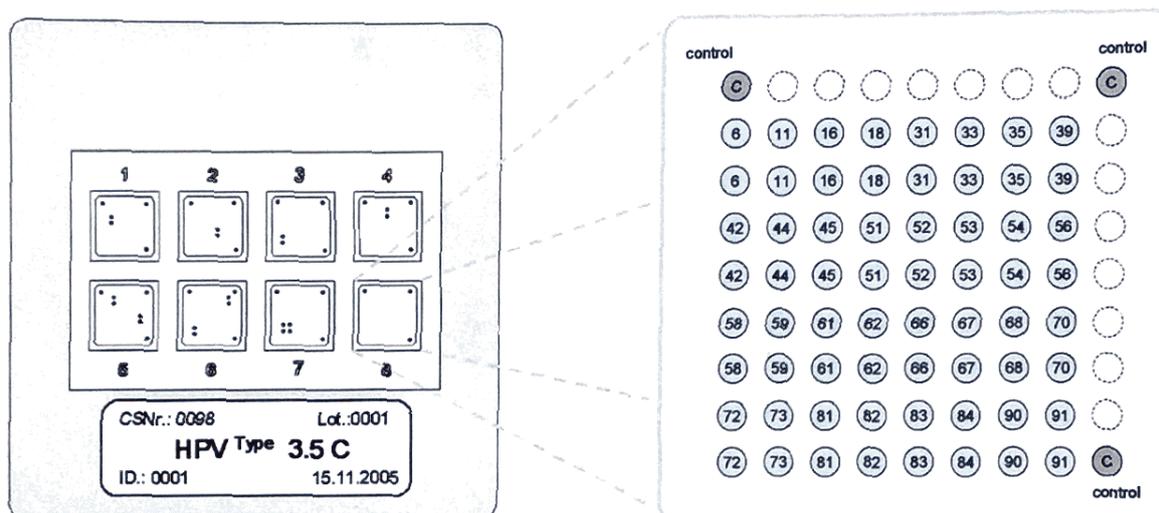


Abbildung 2: LCD-Chip mit vergrößertem Array

Zu sehen ist linksseitig ein LCD-Chip mit 8 Arrays; rechts im Bilde ist ein Array vergrößert. Die Zahlen zeigen den jeweiligen HPV-Stamm an. „c“ steht für die Kontrollen (Data Sheet Chipron HPV^{Type} 3.5 LCD-Array Kit).

C.4.1.3 Hybridisierung

Material:

- Wasserbad
- Hybridisierungskammer
- LCD-Chip
- Hybridisierungspuffer A 22 µl
- MODULATOR 2 µl
- PCR-Reaktionsprodukt A 5 µl
- PCR-Reaktionsprodukt B 5 µl
- 1x WASH solution (C.2.9)
- CHIP^{Spin} FVL2400N

Durchführung:

Zu Beginn wird ein Wasserbad auf 35°C aufgewärmt. Ein Tropfen Wasser wird in jede Ecke der Hybridisierungskammer gegeben. Dann wird der Hybridisierungsmix bestehend aus 22 µl Hybridisierungspuffer, 2 µl MODULATOR und 10 µl PCR-Reaktionsprodukt (5 µl PCR-A und 5 µl PCR-B) hergestellt und gut gemischt. Bis zu

acht Proben können auf einem Chip hybridisiert werden. Die Platte wird in die Hybridisierungskammer gegeben und 30 µl des PCR-Hybridisierungsmixes auf die jeweiligen Felder gegeben. Die Kammer wird dann in das vorbereitete Wasserbad gelegt. Die Platte wird daraufhin für 30 min bei 35°C inkubiert. Es werden drei Waschbäder mit 1x WASH solution (wie unter C.2.9 beschrieben) vorbereitet. Die Platte wird zuerst in Waschbad 1 komplett eingetaucht und dann dreimal hin und her geschwenkt. Das Gleiche wird in Waschbad 2 durchgeführt. In Waschbad 3 wird die Platte dann für 1 min inkubiert. Im Anschluss daran wird die Platte für 15 sec mit Hilfe der Zentrifuge CHIP^{Spin} FVL2400N getrocknet.

C.4.1.4 Markierung

Material:

- LCD-Chip
- DILUTION Puffer 270 µl
- MODULATOR 30 µl
- LABEL 2 µl
- 1x WASH solution
- CHIP^{Spin} FVL2400N

Durchführung:

Initial wird der Label-Mix hergestellt. Für acht Felder werden 270 µl DILUTION Puffer, 30 µl MODULATOR und 2 µl LABEL per Vortex gut gemischt. 30 µl dieses Label-Mixes werden auf jedes der acht Felder gegeben und die Platte dann bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die 1x WASH solution aus C.4.1.3 wird in den drei Waschbädern ersetzt und analog dazu wird die Platte in diesen erneut gewaschen. Die Platte wird im Anschluss daran ebenfalls wie unter C.4.1.3 beschrieben per Zentrifuge getrocknet.

C.4.1.5 Färbung

Material:

- LCD-Chip
- STAIN Solution 30 µl
- 1x WASH solution
- CHIP^{Spin} FVL2400N

Durchführung:

30 µl der STAIN Solution werden auf jedes Feld gegeben und dann für 1-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es ist dringend darauf zu achten, die STAIN Solution nicht zu kontaminieren. Das Färben wird gestoppt, indem die Platte in der letzten Waschlösung aus C.4.1.4 für 11-15 Sekunden gewaschen wird. Die Platte wird wiederum per Zentrifuge getrocknet.

C.4.1.6 Auswertung

Die Auswertung kann rein optisch erfolgen, da sich die Felder bei HPV-positiven Proben blau verfärben, während die anderen Felder farblos bleiben. Das jeweils verfärbte Feld zeigt den HPV-Stamm an. Die Auswertung kann auch mit der zugehörigen Computersoftware erfolgen. In Abbildung 3 sind ein LCD-Chip mit Vergrößerung eines Arrays sowie die Lokalisation der vertretenen HPV-Stämme zu sehen.

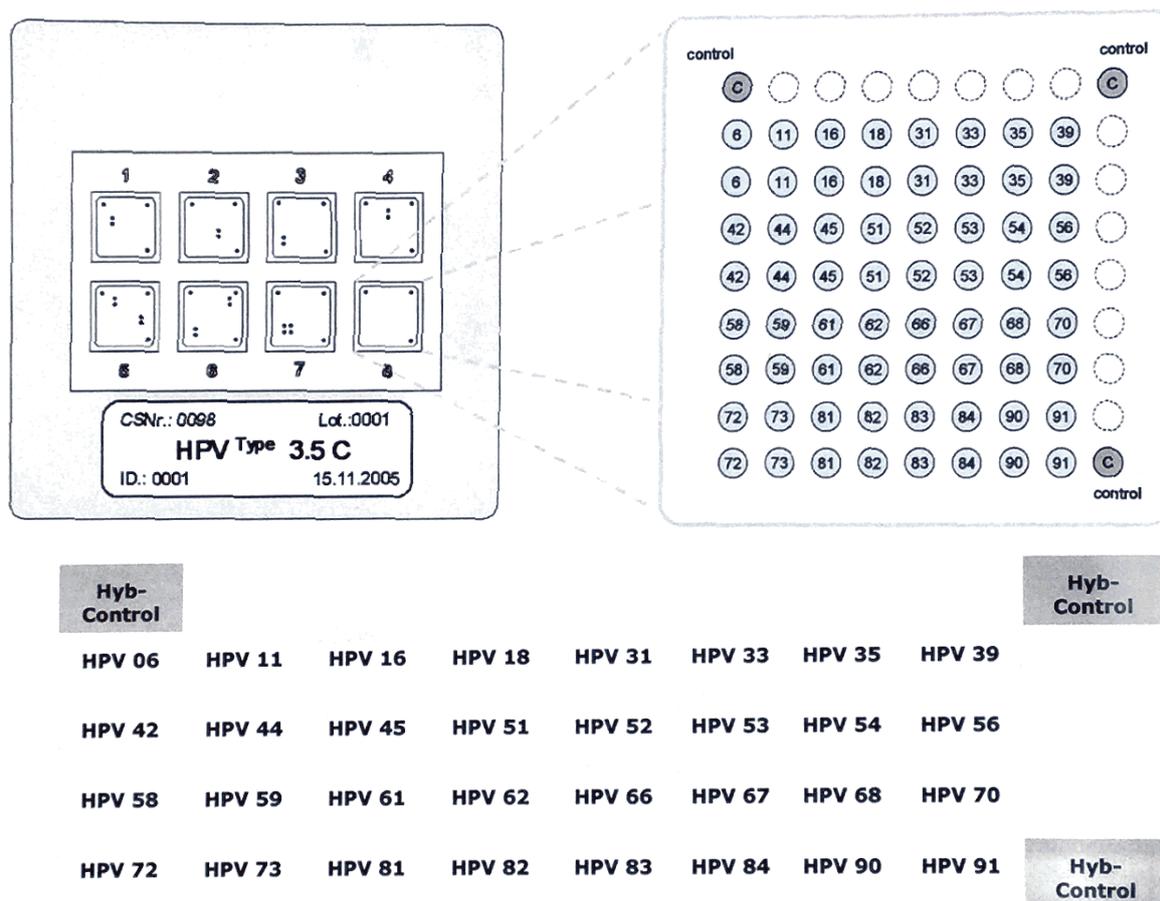


Abbildung 3: LCD-Chip mit Vergrößerung eines Arrays sowie der zugehörigen HPV-Stämme

Jedes der 64 Felder entspricht einer Bindungsstelle für die PCR-Produkte. Diese sind mit hochkonservierten Regionen im Genom der zu erkennenden HPV-Typen versehen (Data Sheet Chipron HPV^{Type} 3.5 LCD-Array Kit).

C.4.2 p16^{INK4a} Immunhistochemie

Da nicht mehr von allen Tumorproben genug DNA, jedoch noch FFPE-Gewebeschnitte vorhanden waren, wurde neben dem LCD-Array zur weiteren Testung auf HPV-Infektion der Tumore eine p16^{INK4a} Immunhistochemie mit Hilfe des CINtec[®] Histology Kit durchgeführt. Bei Zellen von Eukaryoten wird der Zyklus der Mitose durch eine Reihe von verschiedenen Proteinen reguliert. Dabei spielt das Protein p16^{INK4a} eine entscheidende Rolle. Es ist Teil der Kontrolle der G₁-S-Phase durch das Retinoblastom-Protein. Bei ausdifferenzierten Epithelzellen ist die Expression von p16^{INK4a} so weit herunterreguliert, dass es normalerweise im Rahmen einer Immunhistochemie nicht nachweisbar ist. Bei Tumoren, die durch humane Papillomviren infiziert sind, wird p16^{INK4a} jedoch stark hochreguliert und ist

somit stark überexprimiert (Gronhoj Larsen et al., 2014). Bei der Immunhistochemie wird p16^{INK4a} in zwei Schritten lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Initial wird ein monoklonaler Mausantikörper, der direkt gegen p16^{INK4a} gerichtet ist, verwendet. In einem zweiten Schritt wird Peroxidase aus Meerrettich sowie ein Antikörper der Ziege, der gegen den FAB Teil des Mausantikörpers gerichtet ist, verwendet. Die Peroxidase wandelt ein Diaminobenzidin (DAB) Chromogen in einen unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Farbumschlag um, sodass letztendlich Zellen, die p16^{INK4a} überexprimieren sichtbar gemacht werden können. Die p16^{INK4a} Immunhistochemie wurde freundlicherweise von Frau Ludmilla Schneider aus der Abteilung für Strahlenzytogenetik des Helmholtzzentrum München durchgeführt.

Ein Problem bei dem immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a} ist, dass in HNSCC häufig eine heterozygote oder homozygote Deletion der chromosomalen Bande 9p21 vorliegt. In diesem Bereich liegt das Gen *CDKN2A*, das für das Protein p16 kodiert, sodass bei einer alleinig durchgeführten IHC die Möglichkeit einer falsch-negativen Testung besteht. Aus diesem Grund sollte zusätzlich eine PCR zum Nachweis von HPV-DNA durchgeführt werden (Gollin, 2014).

C.4.3 HPV-qRT-PCR

Material:

- Tumor-DNA 50 ng
- Primer β -Globin (Metabion) 25 μ M 0,08 μ l
 β -Globin Forward Primer: 5'- CAGGTACGGCTGTCATCACTTAGA- 3'
 β -Globin Reverse Primer: 5'- CATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTA- 3'
- Primer GP5+/6+ (Eurofins) 0,08 μ l
 GP5+/6+ Forward Primer: 5'- TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC- 3'
 GP5+/6+ Reverse Primer: 5'- GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC- 3'
- 2x SYBR Advantage qPCR-Premix 5 μ l
 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, USA)
- ROX Reference DYE LMP (50x) 0,2 μ l
- H₂O_{bidest.} ad 9 μ l
- Positivkontrolle
 HPV-positive Zelllinien: UPCI SCC2 und UPCI SCC154

- Negativkontrolle
negative Zelllinien: Cal27 und Cal33
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- Sterilbank (BDK)

Durchführung:

Der HPV-Status wurde neben dem LCD-Array und der IHC zur Verifizierung durch eine L1-spezifische qRT-PCR unter Verwendung von GP5+/6+ Primern ermittelt (van den Brule, Pol, Fransen-Daalmeijer, Schouls, Meijer, & Snijders, 2002). Zur Sicherung der Qualität werden Positivkontrollen (HPV-positive Zelllinien UPCI SCC2 und UPCI SCC154) und Negativkontrollen (HPV-negative Zelllinien Cal27 und Cal33) in jeden Test eingeschlossen. Das humane β -Globin Gen dient als Kontrolle für eine hinreichende Menge des Materials. Es werden 50 ng extrahierte Tumor-DNA zu 5 μ l 2x SYBR Advantage qPCR-Premix, 0,2 μ l ROX Reference DYE LMP sowie den beiden Primern gegeben und schließlich auf ein finales Volumen von 9 μ l mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Nach der initialen Denaturierung bei 95°C für 10 min, enthält das Programm des Applied Biosystems® ViiA™ 7 Instruments 45 Zyklen (15 sec bei 95°C, 30 sec bei 54°C, 15 sec bei 72°C) zur Detektion der amplifizierten HPV-DNA. Dabei werden die Threshold Cycle (Ct) Werte für jede Reaktion erfasst und nur Proben mit einem β -Globin Ct-Wert unter 35 für weitere Analysen verwendet.

C.5 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH, *comparative genomic hybridization*) ist eine molekularzytogenetische Methode, mit der man Kopienzahlveränderungen (DNA-Zugewinne und DNA-Verluste) in Zellen nachweisen kann, was in der Tumorforschung relevant ist und somit häufig eingesetzt wird (Barrett et al., 2004; Kallioniemi et al., 1992). Das Prinzip besteht darin gesamtgenomische Tumor- und gepoolte Referenz-DNA verschiedener gesunder Spender mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren (Tumor-DNA: Cy3 - grün, Referenz-DNA: Cy5 - rot) und diese dann auf Metaphasenpräparate eines gesunden Spenders zu hybridisieren. Um eine Bindung an hochrepetitive Sequenzen im Zentromerbereich zu verhindern, wird nicht markierte Cot-1 DNA zugegeben (Inazawa, Inoue, & Imoto, 2004). Mit Hilfe einer computerbasierten Bildverarbeitung werden die Fluoreszenzsignale entlang der Chromosomen erfasst und können bildlich dargestellt werden. Bei einem DNA-Verlust überwiegt die Fluoreszenzintensität der Referenz-DNA. Im Verhältnis bindet mehr Referenz- als Tumor-DNA an die Metaphasenchromosomen. Analog hierzu überwiegt bei einem DNA-Zugewinn die Fluoreszenzintensität der Tumor-DNA (Inazawa et al., 2004). Die so ermittelten Verhältnisse werden als Quotienten (Ratios) angegeben. Basierend auf t-Statistik werden Schwellenwerte für jedes Chromosom definiert, die bei einer Überschreitung eine chromosomale Veränderung anzeigen.

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Array-CGH handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen CGH. Das Genom wird bei der Array-CGH in hunderte oder tausende kleine DNA-Fragmente immobilisiert auf Objektträgern dargestellt. Das hat den Vorteil, dass eine erhebliche Verbesserung der molekularen Auflösung erzielt werden kann. Bei der chromosomalen CGH können Veränderungen ab einer Größe von ca. 10 Mb detektiert werden (Petersen et al., 1996); bei der Array-CGH dagegen schon ab 100 Kb (de Ravel et al., 2007; Pinkel & Albertson, 2005). Die Auflösung wird gegenüber der chromosomalen CGH damit um das 100-fache erhöht. Insgesamt kann jede Veränderung einer Position auf dem Genom zugeordnet werden (Coe, Ylstra, Carvalho, Meijer, Macaulay, & Lam, 2007). Es gibt verschiedene Formen der Array-CGH, die sich anhand der DNA-Elemente auf den

Arrays unterscheiden: darunter fallen z. B. BAC- (Bacterial Artificial Chromosomes) Arrays, Cosmid-Arrays, SNP- (Single Nucleotide polymorphism) Arrays, cDNA-Arrays und Oligonukleotid-Arrays (Bejjani & Shaffer, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden BAC-Arrays verwendet.

C.5.1 Qualitätskontrolle der Tumor-DNA vor der Array-CGH

C.5.1.1 Multiplex-PCR

Mit Hilfe der Multiplex-PCR kann die Qualität der aus FFPE-Gewebe isolierten DNA in Bezug auf die weitere Verwendbarkeit in der Array-CGH beurteilt werden (van Beers et al., 2006). Der Nachteil an DNA aus fixierten Paraffinblöcken ist, dass relativ häufig Proben vorliegen, die sich auf Grund ihrer schlechten Qualität nur unzureichend analysieren lassen. Das liegt vor allem daran, dass es durch die Fixierung der DNA durch Formalin zu Molekülvernetzungen kommt und, dass die DNA dazu in unterschiedlichem Maße fragmentiert wird (van Beers et al., 2006). Vor preislich und zeitlich aufwendigen Projekten ist es darum notwendig bereits zuvor herauszufinden, ob die Qualität ausreichend ist und die DNA somit für das jeweilige Experiment geeignet ist.

Um dies beurteilen zu können, wurden in dieser Arbeit Primer-Sets verwendet, durch die in einer Multiplex-PCR 100 bp-, 200 bp-, 300 bp- und 400 bp-Fragmente von sich nicht überschneidenden Sequenzen innerhalb des Haushaltsgens *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) auf Chromosom 12 amplifiziert wurden (van Beers et al., 2006). DNA-Proben, von denen sich, aufgrund von Molekülvernetzungen oder einem zu hohen Fragmentierungsgrad, kein oder nur ein 100 bp-Fragment amplifizieren ließ, waren qualitativ ungenügend und wurden somit nicht für eine Array-CGH-Analyse verwendet. Proben, bei denen sich zwei bp- (100 bp, 200 bp), drei bp- (100 bp, 200 bp, 300 bp) bzw. vier bp-Fragmente (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp) amplifizieren ließen, wurden für die weitere Analyse mittels Array-CGH eingesetzt.

Material

- DNA-Probe 100 ng
- AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase 5 U/μl (Applied Biosystems)
- AmpliTaq[®] Gold PCR-Puffer
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 1 mM
- dNTPs 10 mM (Fermentas) 10 μl
- H₂O_{bidest.} 90 μl
- Primer-Mix (100-400 bp) 0,133 μM/Primer
- 100 bp fwd 5'- GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 100 bp rev 5'- CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 200 bp fwd 5'- AGG TGG AGC GAG GCT AGC -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 200 bp rev 5'- TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 300 bp fwd 5'- AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 300 bp rev 5'- TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 400 bp fwd 5'- ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC-3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- 400 bp rev 5'- GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG -3' 100 mM (Metabion) 10 μl
- H₂O_{bidest.} 720 μl
- H₂O_{bidest.}
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)
- PCR-Maschine GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Sterilbank (BDK)

Durchführung

Die komplette Durchführung inkl. des Pipettierens erfolgt auf Eis unter der Sterilbank. Folgende Reagenzien werden zusammen in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben: 3 μl AmpliTaq[®] PCR-Puffer, 3,2 μl Primer-Mix (100-400 bp), 1,8 μl MgCl₂, 6 μl dNTPs (1mM), 0,2 μl AmpliTaq[®] Gold DNA-Polymerase, 100 ng DNA und H₂O_{bidest} ad 30 μl. Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und danach abzentrifugiert bevor die PCR-Reaktionsgefäße mit dem Template in den PCR-Block eingesetzt werden. Im PCR-Block werden die Proben unter den folgenden Bedingungen inkubiert: 10 min bei 95°C, 4 min bei 94°C, 1 min bei 94°C, 35 Zyklen x (1 min bei 56°C, 3 min bei 72°C),

7 min bei 72°C und 4°C für ∞. Im Anschluss an die Multiplex-PCR wird die amplifizierte DNA auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen.

C.5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine sehr häufig verwendete Methode in der Molekularbiologie, mit der geladene Moleküle entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Ostling & Johanson, 1984). DNA ist auf Grund ihrer Phosphatreste negativ geladen – dies macht man sich zunutze indem durch Anlegen einer Spannung, z. B. in einem Agarosegel, die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Anode wandert. Je nach Konzentration der Agarose bilden sich unterschiedlich große Poren im Gel, sodass dieses als eine Art Netzwerk für die Moleküle fungiert. Die kleineren Fragmente können das Gel schneller durchdringen und legen somit in der gleichen Zeit eine größere Strecke zurück als größere DNA-Fragmente. Um die Größe der jeweiligen DNA vergleichen zu können, wird ein 100 bp DNA-Marker gleichzeitig aufgetragen. Um die DNA sichtbar werden zu lassen, wird Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid) verwendet; dabei handelt es sich um eine Substanz, die zwischen die Basen der DNA interkaliert (Einlagerung im Abstand von 10 Basenpaaren). Dadurch verändert sich gleichzeitig das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid, wodurch wiederum die Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird.

Material

- Elektrophoreseapparatur 3000xl (Biorad)
- Agarose (Seakem[®] LE Agarose, Cambrex)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50x konzentriert

2 M Tris (Merck)	243,0 g/l
0,25 M Natriumacetat (Merck)	20,5 g/l
0,05 M EDTA (Ethylendiaminotetraacetat Merck)	18,6 g/l
H ₂ O _{bidest.}	ad 600 ml
mit Eisessig (Merck) auf pH 8,0 einstellen	
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

ak

- TAE-Puffer, 1x
- TAE-Puffer, 50x 3 ml
- H₂O_{bidest.} 147 ml
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- Größenstandard (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Sigma)

Durchführung

Initial muss der 1x TAE-Puffer hergestellt werden; daraufhin werden 300 ml 1x TAE-Puffer mit 4,5 g Agarose vermischt – dadurch erhält man ein 1,5%iges Agarosegel. Nach dem Vermischen wird das Ganze in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose komplett aufgelöst hat und sich keine Schlieren mehr zeigen. Der flüssigen Agarose wird daraufhin noch 25 µl Ethidiumbromid zugesetzt; diese wird dann in die Elektrophoresekammer, in die zuvor der Kamm eingesetzt wurde, gegossen. Nachdem die Agarose komplett erkaltet und fest geworden ist, wird diese mit Elektrophoresepuffer begossen bis sie vollständig davon bedeckt ist – der Elektrophoresepuffer besteht aus 100 ml 1x TAE-Puffer + 50 µl Ethidiumbromid. Zusammen mit dem Auftragspuffer und dem Größenstandard werden die PCR-Produkte aus C.5.1.1 in die vorgegebenen Bereiche der erkalteten Agarose eingesetzt. Dann wird die Kammer an eine Spannung angeschlossen; die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 65-100 V. Durch die Spannung werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt – dies geschieht so lange, bis der Farbmarker des Auftragspuffers ca. 2/3 des Agarosegels durchdrungen hat. Danach wird das Gel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entfernt und unter einen Transilluminator mit UV-Bestrahlung (360 nm) gelegt. Dadurch werden schließlich die DNA-Fragmente mit Hilfe des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und können im Anschluss mit einer Kamera aufgenommen werden.

C.5.2 Array-CGH mit BAC-Arrays

C.5.2.1 Verwendeter 1 Mb BAC-Array

In der vorliegenden Arbeit wird ein 1 Mb BAC-Array (CMR Hs 1 Mb BAC-Array vom Centre for Microarray Resources des Instituts für Pathologie der Universität Cambridge) verwendet, auf dem das gesamte humane Genom durch ca. 3.400 BAC-Klone (Bacterial Artificial Chromosome) in einem Abstand von 1 Mb abgedeckt ist (Fiegler et al., 2003). Jeder BAC-Klon (Insertgröße 100-150 Kb) ist auf diesem Array viermal (sog. Quadruplets) vertreten. Um die Hybridisierungsspezifität zusätzlich zu kontrollieren, sind Drosophila-Klone auf den Arrays aufgebracht; somit befinden sich auf jedem Microarray ca. 15.400 Spots. Die Herstellung der Arrays erfolgte wie bei Fiegler et al. beschrieben (Fiegler, Redon, & Carter, 2007).

Um die Arrays langfristig vor Feuchtigkeit zu schützen, werden sie in einem speziellen Schrank mit Trockenperlen gelagert.

C.5.2.2 Random Prime Labeling

Zu Beginn muss die Tumor- sowie die Referenz-DNA markiert werden – dies geschieht mittels des sogenannten „Random Prime Labeling“; dabei wird die DNA mit Fluorochromen markiert (Abb. 4). Bei diesem Prozess werden degenerierte, zufällig an die Test-DNA bindende Primer verwendet, die mit Hilfe der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I aus dem Bakterium *E. coli* (sog. Klenow-Fragment) elongiert werden. Des Weiteren werden dCTPs, die an ein Fluorochrom gekoppelt sind, hinzugefügt – diese werden daraufhin in die DNA eingebaut, wodurch diese um ein 40-faches amplifiziert wird. Die Grundlage hierbei ist das sog. „strand displacement“, eine kontinuierliche Strangverdrängung: Initial lagert sich ein Primer an die DNA an; die Polymerase wandert daraufhin im Rahmen der DNA-Synthese am Template entlang und trifft dabei auf einen anderen, durch einen weiteren Primer synthetisierten, komplementären Strang, der daraufhin verdrängt wird. Dieser verdrängte, einzelsträngige Strang kann selbst als neue Matrize für eine Strangsynthese dienen (Schock, Lubenow, Löffert, & Korfhage, 2005).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Strangverdrängung (Schock et al., 2005)

Initial lagert sich ein Primer an die DNA an; die Polymerase wandert daraufhin im Rahmen der DNA-Synthese am Template entlang und trifft dabei auf einen anderen, durch einen weiteren Primer synthetisierten, komplementären Strang, der daraufhin verdrängt wird. Dieser jetzt verdrängte, einzelsträngige Strang kann selbst als neue Matrize für eine Strangsynthese dienen.

Material

- Tumor-DNA (Test-DNA)
- humane Referenz, männlich oder weiblich, gepoolt, von mehreren gesunden anonymen Spendern (Promega)
- Random Primer Solution 2,5x (BioPrime-Kit[®] DNA Labeling System, Invitrogen)
- NaCl 1M
NaCl (Merck) 29,22 g
H₂O_{bidest.} ad 500 ml
- H₂O_{bidest.}
- dNTP-Mix (1 µM dCTP, 2 µM dGTP, 2 µM dATP, 2 µM dTTP)

dCTP 100 mM (MBI Fermentas)	10 µl
dGTP100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
dATP100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
dTTP100 mM (MBI Fermentas)	20 µl
H ₂ O _{bidest.}	930 µl
- Cyanine 5-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- Cyanine 3-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)
- Heizblock (Haep Labor Consult, HBT 130)

- Klenow-Fragment 40 U/µl (BioPrime® DNA Labelling System, Invitrogen) auf Eis!
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Tube 0,2 ml (Abgene)

Durchführung

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Initial werden jeweils 450 ng der zu markierenden Referenz-DNA sowie der Tumor-DNA (jeweils Sex-mismatching) in jeweils ein 1,5 ml ERG gegeben. Danach werden 60 µl Random Primer Solution, 3 µl 1M NaCl und H₂O_{bidest} ad 130 µl hinzugefügt. Im Anschluss daran wird der Einsatz gemischt, danach abzentrifugiert und 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert. Nach dem Denaturieren wird der Ansatz nochmals kurz abzentrifugiert und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt. Danach werden 15 µl des dNTP-Mixes, 2 µl Cy3-dCTP (für die Tumor-DNA) bzw. 2 µl Cy5-dCTP (für die Referenz-DNA) und 3 µl vom Klenow-Fragment zum Ansatz gegeben; danach wird gemischt und abzentrifugiert. Im Anschluss werden die Proben in PCR-Reaktionsgefäße überführt – es folgt eine Inkubation bei 37°C für 17-20 Stunden. Werden die Proben nicht gleich im Anschluss weiterverarbeitet, können diese bei -20°C gelagert werden – dabei ist auch weiterhin auf einen konsequenten Lichtschutz zu achten.

C.5.2.3 Aufreinigung der markierten DNA

Material

- ERGs 1,5 ml (Eppendorf)
- Cy3-markierte Tumor-DNA und Cy5-markierte Referenz-DNA (C.5.2.2)
- MicroSpin™ G-50 Sephadex™-Säulchen (GE Healthcare)
- Zentrifuge 5415 C (Eppendorf)

Durchführung

Zu Beginn werden drei Sephadex™-Säulchen pro Probe durchmischt und für 1 min bei 2.800 rpm (735 x g) zentrifugiert – das ist nötig damit sich die Aufreinigungssäule

aus Sephadex™ aufbauen kann. Das Zentrifugat wird verworfen. Auf jede Säule werden vorsichtig 50 µl der jeweiligen Probe zentral aufgetragen, wobei darauf geachtet werden muss, dass das Granulat nicht mit der Pipettenspitze berührt wird. Alle Säulen werden daraufhin für 2 min bei 2.800 rpm (735 x g) zentrifugiert – durch diesen Vorgang verbleiben letztendlich in der Säule u. a. überschüssige Primer, Nukleotide und Enzyme. Die drei aufgereinigten DNA-Proben werden im Anschluss vereinigt, gemischt und nochmals abzentrifugiert – somit erhält man jeweils 150 µl pro Probe.

C.5.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und Fluorochrom-Inkorporationsrate

Am NanoDrop® Spektrophotometer wird die Fluorochrom-Inkorporationsrate der markierten DNA analog zu der Beschreibung unter C.3.6 durchgeführt. Zusätzlich zur Messung der DNA (Extinktion bei 260 nm) wird auch die Extinktion bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) gemessen – durch diese Messung wird vor der eigentlichen Hybridisierung ermittelt wie effizient die Markierung der DNA erfolgt ist. Die DNA-Konzentration sollte bei ~100 ng/µl und die Inkorporationsrate bei >3 pmol/µl liegen.

C.5.2.5 Fällung und Denaturierung der Sonden

Material

- Cy3-markierte Tumor-DNA und Cy5-markierte Referenz-DNA
- Humane Cot-1 DNA 1 µg/µl (Invitrogen)
- Natriumacetat 3 M pH 4,8 (C.2.5)
- Ethanol 100% p. a. (Merck) (-20°C)
- Ethanol 70% (-20°C) (C.2.2)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- Yeast-tRNA (100 µg/µl) (Invitrogen)
- Hybridisierungspuffer (50% FA, 7% Dextransulfat, 0,1% Tween 20, 2x SSC, 25 mM EDTA)
- Formamid deionisiert (Sigma) 50 ml
- Dextransulfat 25% (Sigma) 28 ml

Tween [®] 20 (Sigma)	0,1 ml
- 20x SSC (C.2.6)	20 ml
Tris 10mM pH 7,4	1 ml
EDTA 0,5 M pH 8	5 ml
H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert	ad 100 ml
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)	
- Prähybridisierungsmix	
Hering Sperma DNA ultraschall-fragmentiert (Invitrogen)	50 µl
Natriumacetat 3 M pH 4,8 (C.2.5)	5 µl
Ethanol 100% p. a. (Merck)	110 µl
Inhalte mischen, 30 min bei -80°C fällen, 30 min bei 16.000 x g zentrifugieren, mit 70%igem Ethanol waschen, nochmals für 5 min zentrifugieren, danach Pellet trocknen und in 6 µl Yeast-tRNA sowie 68 µl Hybridisierungsmix für ca. 2 Stunden lösen (Pellet muss vollständig gelöst sein) (analog zu C.5.2.5). Der Mix kann danach bei -20°C gelagert werden.	

Durchführung

Initial werden 150 µl der Tumor-DNA (Cy3-markiert) sowie 150 µl der Referenz-DNA (Cy5-markiert) miteinander vermengt. Im Anschluss werden 135 µl Cot-1 DNA, 46,8 µl Natriumacetat (3 M) sowie 1000 µl 100%iger Ethanol (-20°C) hinzugefügt. Der Ansatz wird gut vermengt und anschließend entweder über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -80°C gefällt. Nach der Fällung wird die Probe bei 4°C 30 min zentrifugiert (13.000 rpm bzw. 15.000 x g). Der Überstand wird vorsichtig vom violett-farbenen Pellet abpipettiert. Dieses wird mit 500 µl 70%igem Ethanol (-20°C) versetzt und bei 13.000 rpm bei einer Temperatur von 4°C 15 min gewaschen – dies dient der Entfernung überschüssiger Salze. Der Überstand wird abermals verworfen, der Ansatz nochmals zentrifugiert und der Rest vorsichtig abpipettiert. Danach wird das Pellet für ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird die DNA in 6 µl Yeast-tRNA (RNA der Hefe) gelöst – es werden 68 µl Hybridisierungsmix hinzugegeben. Der Ansatz wird dann für mindestens 2 h bei 37°C im Schüttelblock gelöst, dabei muss gelegentlich gevortext werden, damit das Pellet am Ende komplett gelöst ist. Der Prähybridisierungsmix kann bereits im Voraus hergestellt und bei -20°C gelagert werden – vor Gebrauch muss dieser ebenfalls bei 37°C

geschüttelt und gelöst werden. Sobald sich das Pellet vollständig gelöst hat, werden der Prähybridisierungsmix sowie die DNA-Sonde bei 70°C für 10 min denaturiert.

C.5.2.6 Hybridisierung

Die Hybridisierung sowie die sich anschließenden Waschschrte werden automatisiert mit der Tecan-Hybridisierungsstation HS 400 durchgeführt – die Station wird mit Hilfe eines Computerprogramms, dem sog. „HS Control Manager“, bedient.

Material

- BAC-Arrays
- Prähybridisierungsmix (denaturiert) (C.5.2.5)
- Sonde (denaturiert) (C.5.2.5)
- H₂O_{bidest.}
- Hybridisierungsstation HS 400 (Tecan)
- 20x SSC (C.2.6)
- Waschlösung 1: 50% Formamid / 2x SSC, pH 7,0
 - o H₂O_{bidest.} 40 ml
 - o 20x SSC 10 ml
 - o Formamid (Fluka) 50 ml
 - o Mit 1 M HCl auf pH 7.0 einstellen
- Waschlösung 2: 40% Formamid / 2x SSC, pH 7.0
 - o H₂O_{bidest.} 100 ml
 - o 20x SSC 20 ml
 - o Formamid (Fluka) 80 ml
 - o Mit 1 M HCl auf pH 7.0 einstellen
- Waschlösung 3: 2x SSC / 0,1% SDS
 - o 20xSSC 40 ml
 - o 25% SDS 1,6 ml
 - o H₂O_{bidest.} 358,4 ml
- Waschlösung 4: 0,1x SSC
 - o 20x SSC 2 ml
 - o H₂O_{bidest.} 398 ml

Durchführung

Während die Sonden sowie der Prähybridisierungsmix wie oben beschrieben lösen, werden die einzelnen Waschlösungen 1 – 4 hergestellt. Die Lösungen sind nötig, um unspezifisch gebundene Sonden nach der Hybridisierung zu entfernen. Bevor die eigentliche Hybridisierung beginnen kann, müssen die Injektionsventile sowie das Leitungssystem der Tecan-Hybridisierungsstation mit Hilfe des Reinigungsprogramms „Rinse“ gereinigt werden. Nach der Reinigung werden die Schläuche und Injektionsventile mit Stickstoff-Druckluft getrocknet. Nach Anschließen der Waschlösungen an die Hybridisierungsstation und Einschalten der Heizplatte, werden die Arrays in die Hybridisierungskammern eingelegt. Mit Hilfe des Programmschritts „Prime“ wird die Waschlösung 1 luftblasenfrei in das Leitungssystem der HS 400 gefüllt. Sollten nicht alle Positionen der Hybridisierungskammern benötigt werden, ist es unabdingbar, dass in die leeren Positionen Glas-Objektträger eingesetzt werden. Ungefähr fünf Minuten vor dem Ende der Denaturierungszeit der Sonden sowie des Hybridisierungsmixes wird das eigentliche Hybridisierungsprogramm der Tecan-Hybridisierungsstation gestartet - dieses sieht wie folgt aus:

1. Waschen: 37°C, 15 sec (Waschlösung 1), Bewegung der Waschlösung
2. Injektion von 70 µl Prähybridisierungsmix: 37°C
3. Hybridisierung: 37°C, 45 min
4. Injektion von 70 µl Sonde: 37°C
5. Hybridisierung: 37°C, 40 h
6. Waschen: 47°C, 1,5 min (Waschlösung 2), zweimal, 1 min Einweichen
7. Waschen: 47°C, 1,5 min (Waschlösung 3), viermal, 1 min Einweichen
8. Waschen: 30°C, 30 sec (Waschlösung 4), Bewegung der Waschlösung
9. Trocknen der Objektträger: 30°C, 2 min

Ist der erste Schritt (Waschen bei 37°C) erfolgt, werden 70 µl des Prähybridisierungsmixes in die Hybridisierungskammer zum Vorpuffern des Arrays gegeben. Durch diesen Schritt kann sich die Sonde im Anschluss recht gleichmäßig über die Oberfläche des Objektträgers verteilen - somit reduziert man die Entstehung von Hybridisierungsartefakten. In dieser Zeit inkubiert die bereits denaturierte Sonde bei 37°C. Sind 45 Minuten vergangen, wird die eigentliche Probe in die Hybridisierungskammer gegeben: die Hybridisierung geschieht dann bei 37°C für

insgesamt 40 Stunden. Während der Hybridisierung wird die Sonde in der Kammer gleichmäßig bewegt, um die Effizienz der Hybridisierung zu steigern. Nach der Hybridisierung und den sich anschließenden Waschschrritten werden die Arrays mit Hilfe von Stickstoff getrocknet, verbleiben in der mit Stickstoff versetzten Atmosphäre und sind somit vor der oxidierenden Wirkung von Sauerstoff geschützt. Nach Entnahme der hybridisierten Arrays aus der Hybridisierungsstation, werden diese gescannt.

C.5.2.7 Scannen und Datenextraktion der BAC-Arrays

Um die hybridisierten Arrays zu scannen, wird der Microarray-Scanner GenePix™ Personal 4100A (Axon Instruments, Molecular Devices) verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass der Array gleichzeitig von zwei Lasern verschiedener Wellenlänge abgetastet wird und hierbei die Fluorochrome Cy3 und Cy5 bei 532 nm bzw. 635 nm angeregt werden. Das Licht, welches von den beiden Fluorochromen ausgesendet wird, wird durch Emissionsfilter mit Hilfe von sog. Photomultipliern (PMT) detektiert. Im Anschluss daran wird ein zuvor ausgesuchter Bereich gescannt; dies wird als TIF-Datei gespeichert. Mit Hilfe der Software GenePix™ Pro 6.1 (Axon Instruments, Molecular Devices) werden die so entstandenen Bilder analysiert. Zu Beginn lädt man das sog. *Array List File*, eine Datei, welche Informationen über den Aufbau der Arrays enthält. Hierzu zählen der Abstand, der Durchmesser und die genaue Position der einzelnen Spots. Hierbei wird jedem Spot mit genauer Position ein BAC-Klon und somit ein Abschnitt im Genom exakt zugeordnet. Mit Hilfe dessen wird von dem Programm ein Positionsgitter (sog. *Grid*) erstellt. Dieses entspricht dem theoretischen Aussehen eines Arrays und wird im Anschluss über diesen gelegt. Das Programm nutzt dann die Funktion *Find Array, Align Features*, wodurch das theoretische Gitter des *Array List Files* auf die Form, Größe und Position des einzelnen Spots angepasst und dadurch mit dem vollständig gescannten Bild zur Deckung gebracht wird. Jeder einzelne Kreis des so angepassten Gitters um einen Spot, entspricht einem sog. *Feature*. Im Anschluss wird der Median aller Pixel innerhalb eines solchen *Features* in die Analyse der Fluoreszenzintensitäten einbezogen. Es wird dann die *Analyze*-Funktion genutzt um die Mediane der Vordergrund- Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines Spots ebenso wie die Mediane der Hintergrund-Fluoreszenzintensitäten in einem ringförmigen Bereich um jeden

einzelnen Spot herum zu ermitteln. Die Fluoreszenzintensitäten werden für Cy3 und Cy5 einzeln ermittelt. Ob ein Spot in die Analyse einbezogen wird oder nicht, wird mit Hilfe der sog. *Flag Features* ermittelt: hierin sind Kriterien festgelegt, mit Hilfe derer entschieden wird, ob ein Spot als negativ eingestuft (*geflaggt*) wird. Die resultierenden Ergebnisse werden im GenePix-Result-File (.gpr) Format gespeichert. In Abbildung 5 ist ein gescannter BAC-Array als Beispiel dargestellt.

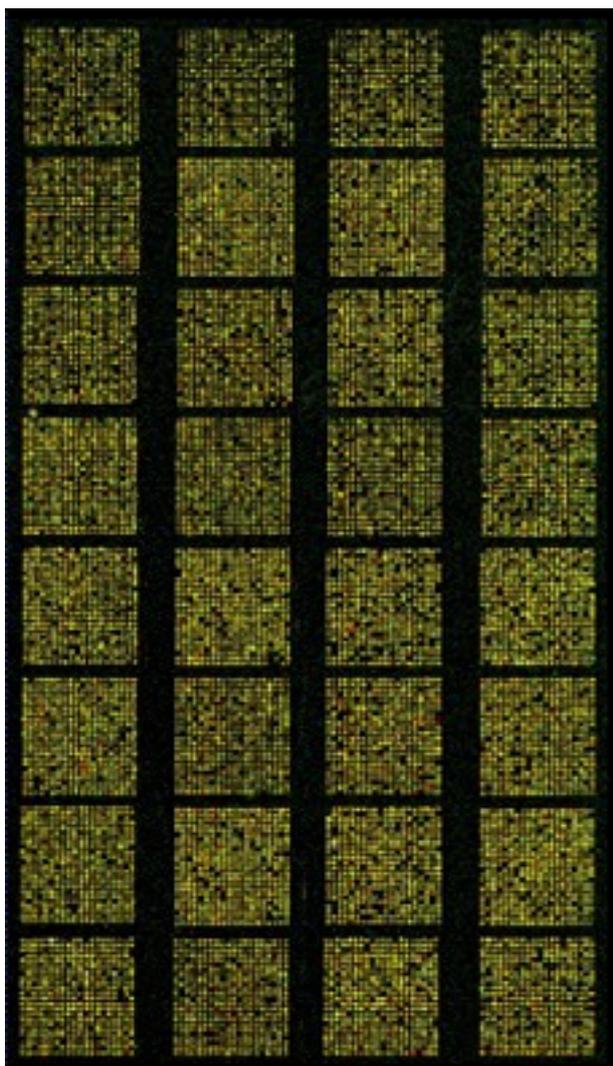


Abbildung 5: Gescannter 1 Mb-BAC-Array

Zu sehen ist ein gescannter BAC-Array, bei dem die grünen (Cy3) und roten (Cy5) Fluoreszenzsignale überlagert sind – so entsteht die gelbe Mischfarbe der Spots. Insgesamt besteht der Array aus 32 (4 x 8) Blöcken; jeder Block besteht aus 20 Spalten und 24 Reihen.

C.5.2.8 Auswertung der Daten mit MANOR, DNACopy und CGHcall

Die weitere Datenauswertung geschieht mit dem Ziel DNA-Verluste und -Zugewinne der untersuchten Tumor-DNA zu ermitteln. Mittels GenePix™ Pro 6.1 erstellte gpr-Dateien werden mit den R-Paketen MANOR, DNACopy und CGHcall ausgewertet (Neuvial et al., 2006; Olshen, Venkatraman, Lucito, & Wigler, 2004; van de Wiel, Kim, Vosse, van Wieringen, Wilting, & Ylstra, 2007). Bei der Datenauswertung werden insgesamt drei Schritte durchgeführt: die Normalisierung des Datensatzes, die darauf folgende Segmentierung und das sog. *Calling*.

Zu Beginn wird die mit GenePix™ Pro 6.1 generierte Ergebnisdatei (**result file**) zusammen mit der **Clone list** Datei geladen, welche entscheidende Informationen über die benutzten BAC-Klone wie z. B. Name, Lokalisation im Genom und physikalische Position enthält. Um Artefakte aus den Experimenten auszuschließen, werden diejenigen Klone aus dem Datensatz gefiltert, welche nicht den festgelegten Qualitätskriterien entsprechen (**Flagging**) - so werden ausschließlich biologische Veränderungen in die Auswertung einbezogen. Klone, deren Quotient aus Vordergrund- sowie Hintergrundfluoreszenzsignal einen Wert kleiner 3 aufweisen, werden aus dem Datensatz entfernt (**background threshold**). Des Weiteren werden diejenigen Klone ausgeschlossen, bei denen ein Schwellenwert der Standardabweichung (**standard deviation threshold**) $\geq 10\%$ überschritten wird.

Mit Hilfe des Algorithmus MANOR (**Microarray Normalization**) werden die nach dem Flagging verbliebenen Werte räumlich normalisiert (Neuvial et al., 2006). Bezüglich des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Referenz-DNA, wird dieses als zur Basis 2 logarithmierter Quotient ($\text{Log}_2\text{-Ratio}$) angegeben. Diese Normalisierung führt dazu, dass der Gesamtmedian der Daten auf die Nulllinie verschoben wird.

Der räumliche Normalisierungsalgorithmus (**spatial normalization**) erfolgt in drei Schritten. Zuerst wird ein räumlicher Trend der Fluoreszenzintensitäten der Fluorochrome Cy3 und Cy5 auf dem Array abgeschätzt. Danach wird der Array in Bereiche mit ähnlichen Trend-Werten unterteilt. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Median-Normalisierung der Datenuntermengen der jeweiligen Segmente. Hierbei erfolgt eine zweidimensionale Aufteilung des Arrays in eine bestimmte Anzahl an Bereiche, die in Bezug auf das Mittel der Fluoreszenzintensitäten einheitlich sind. Nachdem die BAC-Klone auf dem Array zufällig verteilt sind, kann eine vermehrte

Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes in einem bestimmten Bereich in Bezug auf biologische Ursachen ausgeschlossen werden. Durch diese Form der Normalisierung können Artefakte, entstanden z. B. im Rahmen des Waschens oder auf Grund von Verunreinigungen auf dem Array, ausgeglichen werden. Im Anschluss daran werden den Log_2 -Ratios mittels der **Clone list** Datei die physikalischen Positionen im Genom zugeordnet. Sollte der Tumoranteil einer Probe nicht 100% betragen, wird das Profil mittels des Algorithmus **cellularity correction** bzgl. des tatsächlichen Tumorgehalts korrigiert (van de Wiel et al., 2007).

Die so ermittelten normalisierten Daten werden dann anhand des R-Pakets DNACopy segmentiert (Olshen et al., 2004). Um Start- und Endpunkte von veränderten Regionen (**breakpoints**) im Genom aufzudecken, werden die Log_2 -Ratios entlang der genomischen Skala in einzelne Abschnitte eingeteilt - dies geschieht mit Hilfe des in DNACopy implementierten CBS (**Circular Binary Segmentation**)-Algorithmus. Hierbei wird allen BAC-Klonen innerhalb eines Segments derselbe geglättete Log_2 -Ratio Wert zugeordnet (Median der Log_2 -Ratios).

Der jetzt folgende Schritt der weiteren Auswertung erfolgt anhand des R-Pakets CGHcall (van de Wiel et al., 2007). Hierbei werden den einzelnen Segmenten einer von sechs Zuständen (einfacher DNA-Zugewinn, doppelter DNA-Zugewinn, Amplifikation, einfacher DNA-Verlust, doppelter DNA-Verlust, unverändert) zugeordnet. Mittels mathematischer Berechnungen wird dann allen sechs Klassen ein Wahrscheinlichkeitswert (**call probability**) zugeordnet. Überschreitet dieser 0,5, kann dem Segment statistisch signifikant einer der oben genannten Zustände zugeordnet werden (**call**). Letztendlich werden die zwei Zugewinn- und Deletionszustände zu jeweils einer Klasse vereint, sodass sich drei Erwartungszustände ergeben (Zugewinn, Verlust, Normal).

Zum Ende werden die einzelnen Klonwerte des Tumorkollektives mittels des R-Pakets CGHregions (van de Wiel & Wieringen, 2007) zu gemeinsamen Veränderungsregionen zusammengefasst. Damit kann bei maximal 1% Informationsverlust eine deutliche Reduktion der Datenkomplexität erreicht werden. Wegen der gleichzeitig geringen Testanzahl entsteht eine höhere statistische Power in den nachfolgenden statistischen Tests.

C.6 Statistische Methoden

Die mittels Array-CGH ermittelten genomischen Aberrationen wurden mittels verschiedener statistischer Verfahren auf signifikante Assoziationen mit pathologischen und klinischen Daten sowie auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, bestehend aus den Männern mit der Kombination der Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum sowie den Frauen > 70 Jahre ohne diese beiden Risikofaktoren, überprüft.

C.6.1 Hierarchische Clusteranalyse

Bei der hierarchischen Clusteranalyse handelt es sich um ein multivariates Analyseverfahren, um Gruppen (so genannte Cluster) mit ähnlichen Eigenschaften zu ermitteln. Im Falle von Array-CGH-Daten werden Kopienzahlprofile mit ähnlichen Veränderungen einander zugeordnet. Für die hier durchgeführte Clusteranalyse wurde die R-Statistik-Software (<http://www.r-project.org>) verwendet. Man verwendet für die Berechnungen die über die Segmente (DNA-Verlust/-Zugewinn/Normal) gemittelten \log_2 -Ratios. Man geht hierbei von der obersten Hierarchiestufe aus und ordnet die Profile in Bezug auf ihre Korrelationsdistanz (Pearson-Korrelationskoeffizient). Die Berechnung der entstehenden Distanz zwischen zwei Clustern erfolgt an Hand der Ward-Methode (ward linkage). Letztendlich entsteht eine Art Stammbaum, das so genannte Dendrogramm, wodurch die Profile zu Gruppen, den Clustern, optisch zugeordnet werden können.

C.6.2 Exakter Fisher-Test

Der exakte Fisher-Test wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die beiden im Rahmen der Clusteranalyse definierten Gruppen mit den pathologischen bzw. klinischen Daten zu testen. Es handelt sich hierbei um einen statistischen Test, welcher bei kleinen Merkmalshäufigkeiten p-Werte liefert, die im Allgemeinen zuverlässiger sind als der Chi-Quadrat-Test. Die hiermit ermittelten p-Werte wurden als signifikant gewertet, wenn diese < 0,05 liegen.

C.6.3 Multipler Chi-Quadrat-Test und Benjamini-Hochberg FDR

Der Chi-Quadrat-Test wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die chromosomalen Aberrationen mit den folgenden klinischen Parametern zu vergleichen: Tumorgröße (T), Lymphknotenstatus (N), Differenzierungsgrad (G), Geschlecht und Alter. Im Rahmen dieses Tests werden nicht-zufällige Häufungen von Kopienzahlveränderungen in definierten Gruppen getestet. Die Einteilung in diese Gruppen erfolgt durch die verschiedenen pathologischen und klinischen Parameter. Bei einer hohen Anzahl an Tests kommt es zu p-Werten, die zufällig unter der gesetzten Grenze für Signifikanz von 0,05 liegen. Damit diese falsch-positive Rate so niedrig wie möglich gehalten werden kann, werden die zuvor ermittelten p-Werte mittels des FDR-Verfahrens (False Discovery Rate: auch als q-Wert bekannt) adjustiert. Die FDR wurde erstmals von Benjamini und Hochberg 1995 als Fehlerkontrollkriterium bei multiplen Tests und den damit einhergehenden Problemen beschrieben (Benjamini & Hochberg, 1995).

Die Berechnung der adjustierten p-Werte erfolgt unter Zuhilfenahme des R-Skripts CGHtest (van de Wiel, Smeets, Brakenhoff, & Ylstra, 2005). Hierbei werden die adjustierten p-Werte mit einem Permutationsverfahren bestimmt, wobei in der vorliegenden Arbeit 10.000 Permutationen durchgeführt wurden. Die so korrigierten p-Werte wurden als signifikant gewertet, wenn diese $< 0,05$ liegen.

D Ergebnisse

D.1 Bestimmung des HPV-Status

Da analog zu einer 2014 veröffentlichten Metaanalyse mit mehr als 12.000 HNSCC insgesamt 45,8% der Oropharynx-Karzinome und 24,2% der Karzinome der Mundhöhle HPV-positiv waren, wurde bei dem vorliegenden Patientenkollektiv eine HPV-Analyse durchgeführt (Ndiaye et al., 2014). Dies geschah vornehmlich mit dem Ziel, Unterschiede in der Häufigkeit HPV-assoziiertes HNSCC zwischen den untersuchten Gruppen der männlichen Patienten mit typischen Risikofaktoren und den älteren Frauen ohne diese typischen Risikofaktoren zu detektieren. Hierzu wurden drei verschiedene Testverfahren verwendet: Hybridisierung von PCR-amplifizierter Tumor-DNA auf LCD-Arrays, p16^{INK4a} Immunhistochemie und eine qRT-PCR zum Nachweis von HPV-DNA. Mit Hilfe des LCD-Arrays sollte die HPV-DNA direkt mittels Farbumschlag nachgewiesen werden. Da hierfür nicht von allen Tumorproben genug DNA, jedoch noch einzelne FFPE-Gewebeschnitte vorhanden waren, wurde neben dem LCD-Array zur weiteren Testung auf HPV-Infektion der Tumore eine p16^{INK4a} Immunhistochemie durchgeführt. p16 ist ein Surrogatmarker für HPV-Infektionen (Leemans et al., 2011). Es wird somit nicht die HPV-DNA direkt nachgewiesen. Bei Zellen von Eukaryoten ist das Protein p16^{INK4a} Teil der Kontrolle der G₁-S-Phase durch das Retinoblastom-Protein. Bei ausdifferenzierten Epithelzellen ist die Expression von p16^{INK4a} so weit herunterreguliert, dass es normalerweise im Rahmen einer Immunhistochemie nicht nachweisbar ist. Bei Tumoren, die durch humane Papillomviren infiziert sind, wird p16^{INK4a} jedoch stark hochreguliert und ist somit stark überexprimiert (Klaes et al., 2001). Ein Problem bei dem immunhistochemischen Nachweis von p16^{INK4a} ist, dass in HNSCC häufig eine heterozygote oder homozygote Deletion der chromosomalen Bande 9p21 vorliegt. In diesem Bereich liegt das Gen *CDKN2A*, das für das Protein p16 kodiert, sodass bei einer alleinig durchgeführten IHC die Möglichkeit einer falsch-negativen Testung besteht (Gollin, 2014). Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine PCR zum Nachweis der HPV-DNA durchgeführt.

Insgesamt konnten bei zwei Männern eine Infektion mit humanen Papillomviren nachgewiesen werden. Bei beiden Männern handelt es sich um eine Infektion mit HPV 16. In Abbildung 6 ist exemplarisch ein eingescannter LCD-Array mit positivem

HPV 16 Befund zu sehen. In Abbildung 7 ist exemplarisch ein HPV-negativer Tumor zu sehen. In den drei Ecken des LCD-Arrays mit positivem Farbumschlag befinden sich die Positivkontrollen. Des Weiteren ist beispielhaft in den Abbildungen 8 und 9 der immunhistochemische Nachweis einer Überregulierung von p16^{INK4a} und somit die Annahme einer HPV-Infektion zu sehen. In Abbildung 10 ist analog hierzu das Ergebnis der immunhistochemischen p16-Färbung einer negativen Probe dargestellt, welche folglich auch als p16 negativ gewertet wurde.

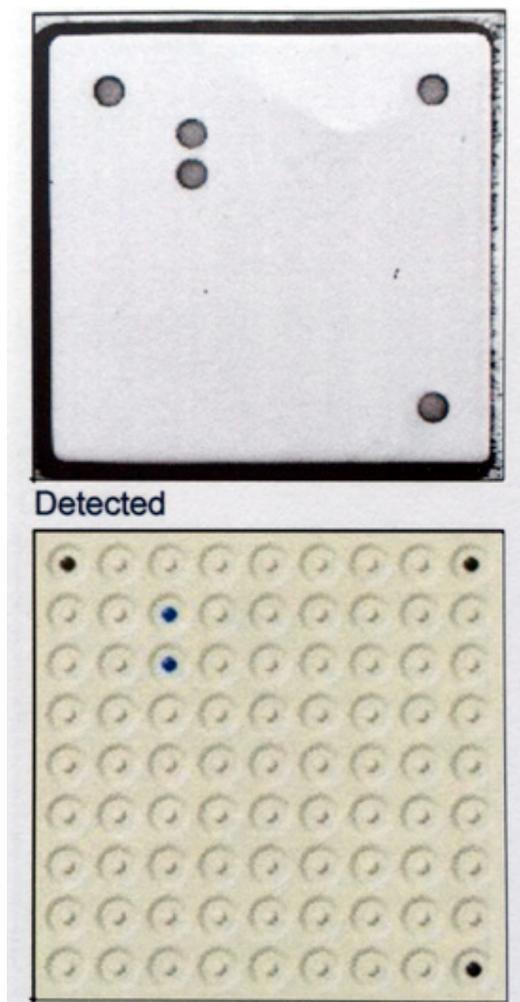


Abbildung 6: LCD-Array mit HPV 16 positiver Tumorprobe

Zu sehen ist ein Array mit 9 x 9 Feldern. Jeder HPV-Stamm ist als vertikales Duplikat angelegt. Zu sehen ist eine HPV 16 positive Tumorprobe.

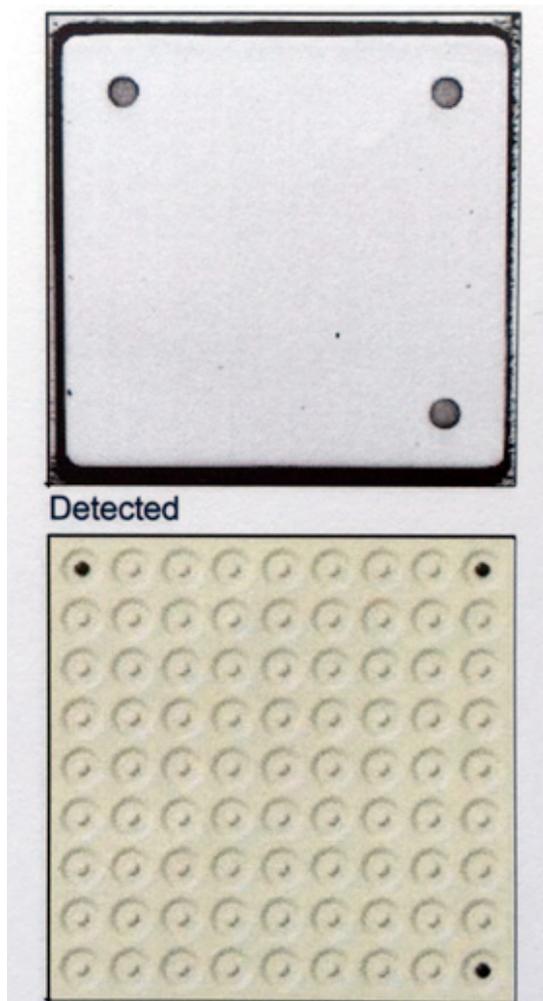


Abbildung 7: LCD-Array mit HPV-negativer Tumorprobe

Zu sehen ist ein Array mit 9 x 9 Feldern. Jeder HPV-Stamm ist als vertikales Duplikat angelegt. Hier konnte keine HPV-Positivität nachgewiesen werden.

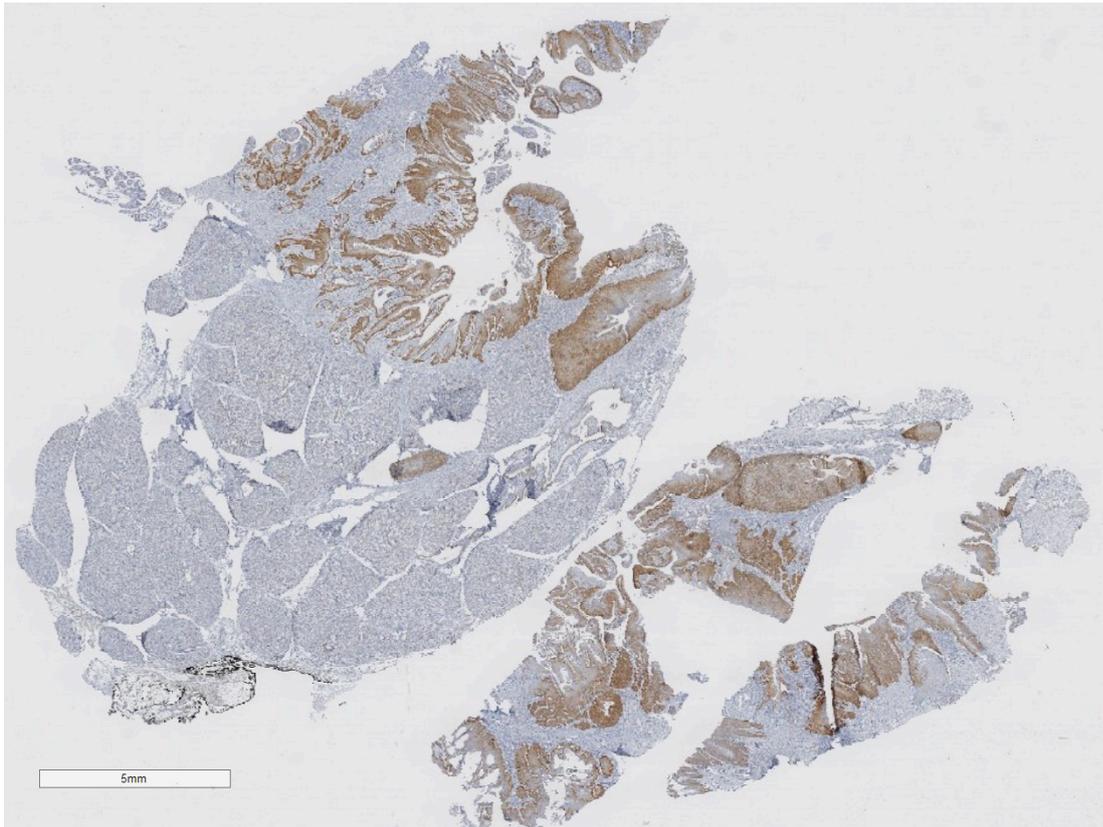


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von p16^{INK4a} – Beispiel eines p16^{INK4a}-positiven Falles

Zu sehen ist eine starke Färbung von p16^{INK4a}. Dies gilt als Surrogatmarker einer Infektion mit HPV.

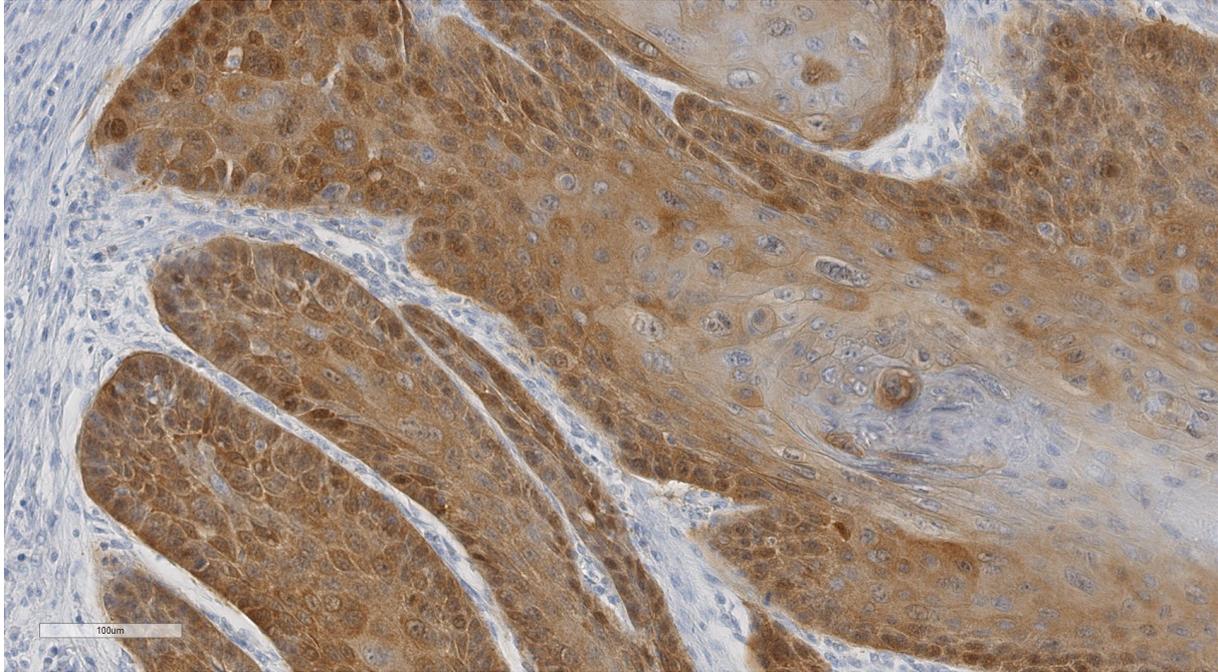


Abbildung 9: Vergrößerung aus Abbildung 8

Zu sehen ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 8. Wie auch oben zu sehen, ist eine starke immunohistochemische Färbung von p16^{INK4a} zu erkennen. Dies gilt als Surrogatmarker einer Infektion mit HPV.

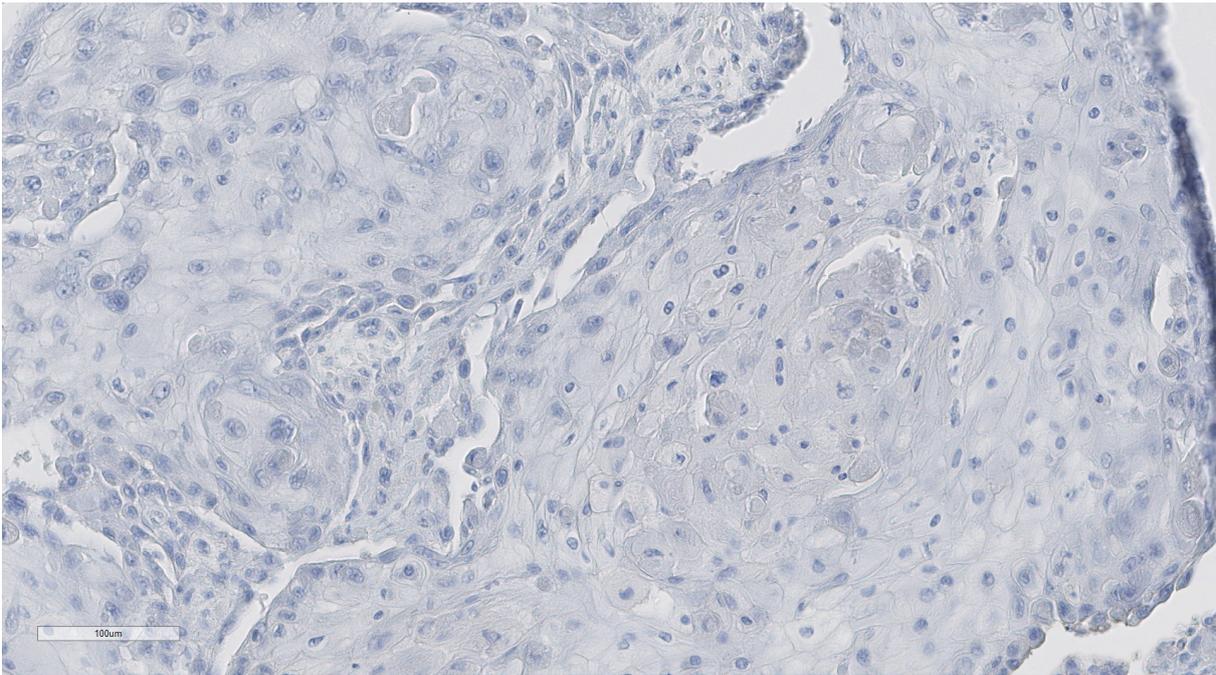


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von p16^{INK4a} – Beispiel eines p16^{INK4a}-negativen Falles

In der Immunhistochemie ist kein Nachweis von p16^{INK4a} zu erkennen. Es ergibt sich somit kein Anhalt für eine Infektion des Tumors mit HPV.

Bei den 31 untersuchten Kopf-Hals-Tumorproben der Frauen, konnte keine HPV-Infektion nachgewiesen werden. Somit zeigten sich nach Untersuchung des HPV-Status von beiden Gruppen keine wesentlichen Unterschiede. Die Tumore der Frauen sind hiernach nicht durch HPV-Infektionen bedingt, sodass die Ursache bei diesen unklar bleibt. Zwei HPV-positive Tumorproben von männlichen Patienten wurden aus der Auswertung auf Grund des Einflusses von HPV-Infektionen auf genetische Veränderungen in HNSCC ausgeschlossen (Gollin, 2014).

D.2 Array-CGH-Analyse

D.2.1 Qualitätskontrolle der Tumor-DNA

Bei Proben, die in Paraffin eingebettet wurden, ist die DNA manchmal degradiert und von der Qualität nicht für Array-CGH Experimente geeignet (Ferrer et al., 2007). Vor den Array-CGH-Analysen wurden die Tumor-DNA-Proben daher einer Qualitätskontrolle mit Hilfe einer Multiplex-PCR unterzogen. Mit Hilfe dieser Methode werden vier sich nicht überlappende Bereiche des Haushaltsgens Gens *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifiziert; die Bereiche umfassen dabei Fragmentlängen von 100, 200, 300 oder 400 bp. Die Klassifikation der Qualität reicht dabei von *sehr gut* bei Amplifikation aller vier Bereiche, über *gut* bei drei Amplifikaten bis zu *ausreichend* bei zwei Amplifikaten. Proben, deren DNA nur eine oder sogar keine Bande aufzeigt, wurden bezogen auf die Qualität als unzureichend eingestuft – demnach sollten die Proben mindestens eine Größe von 200 bp vorweisen (van Beers et al., 2006). In dem vorliegenden untersuchten Kollektiv von insgesamt 60 Patienten zeigten vier Proben zwei Banden, sechs Proben drei Banden und die restlichen 50 Proben vier Banden – somit erreichten alle Proben die mindestens notwendige Klassifikation *ausreichend* und konnten in die Array-CGH-Analyse eingeschlossen werden. In Abbildung 11 sind beispielhaft die Ergebnisse für sechs DNA-Proben gezeigt.

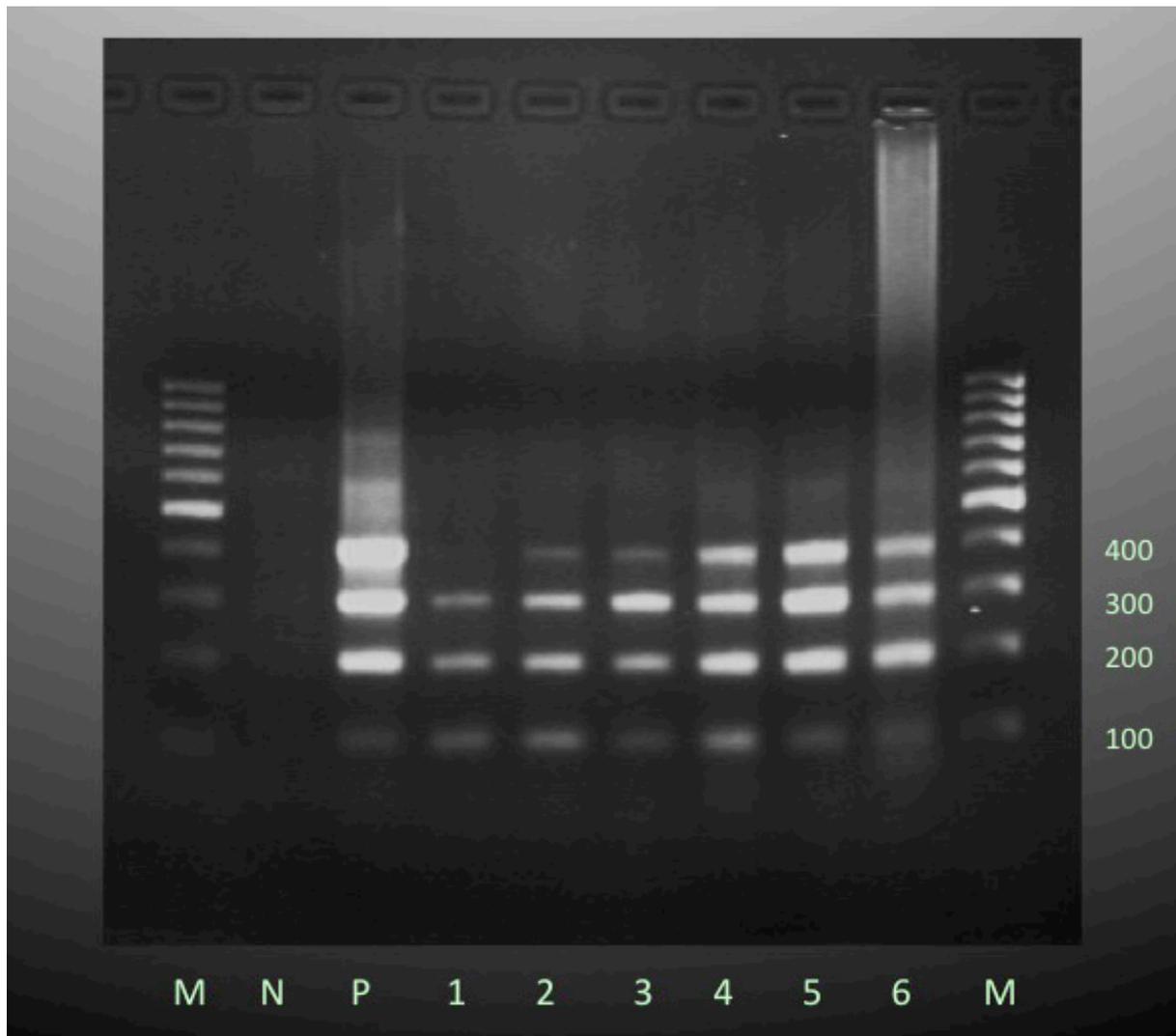


Abbildung 11: Auftrennung der DNA-Amplifikate im Agarosegel nach Multiplex-PCR

Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung von sechs amplifizierten DNA-Tumorproben (1-6), Negativkontrolle (N), Positivkontrolle (P). Links und rechts der PCR-Amplifikate sind 100 bp Marker (M) aufgetragen. Probe 1 weist drei (100, 200 und 300 bp) Amplifikate auf; bei Proben 2-6 konnten dagegen alle vier Bereiche (100, 200, 300 und 400 bp) amplifiziert werden.

D.2.2 Chromosomale Aberrationen der untersuchten Kopf-Hals-Tumore

Nach Ausschluss der HPV-positiven Tumore wurden die verbliebenen 29 Tumore von Männern, die einen ausgeprägten Alkohol- und Tabakkonsum aufwiesen, mit 31 Tumoren von älteren Frauen, die diese klassischen Risikofaktoren nicht aufwiesen,

hinsichtlich genomweiter Kopienzahlveränderungen (DNA-Zugewinne und -Verluste) verglichen.

Insgesamt konnte in den 60 untersuchten Primärtumoren eine große Anzahl Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden. In Abbildung 12 ist das Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen für alle untersuchten Tumorproben dargestellt. Insgesamt wurden 158 chromosomale Regionen mit Kopienzahlveränderungen nachgewiesen, wobei 94 Regionen von DNA-Zugewinnen und 64 Regionen von DNA-Verlusten betroffen waren. Die identifizierten Veränderungsregionen sind in Anhang 2 für DNA-Zugewinne und in Anhang 3 für DNA-Verluste dargestellt.

Das Häufigkeitsprofil der chromosomalen Aberrationen in den untersuchten HNSCC der männlichen Patienten ist in Abbildung 13 dargestellt, das der weiblichen Patienten in Abbildung 14. Visuell ist zu erkennen, dass sich die Häufigkeitsprofile der beiden Vergleichsgruppen in Bezug auf die veränderten chromosomalen Bereiche ähneln. Zu sehen ist des Weiteren, dass die Frequenz der Veränderungen bei den Frauen geringer ist. Die häufigsten DNA-Zugewinne (>30%) in allen untersuchten Kopf-Hals-Tumoren betrafen die Chromosomen 1q, 3q, 7q, 8p, 8q, 9q, 11p, 12q, 13q, 17q und 20q; die häufigsten DNA-Verluste traten auf den Chromosomen 3p, 4p, 9p, 9q, 19p und 19q auf. Die exakten chromosomalen Lokalisationen der Kopienzahlveränderungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 ersichtlich.

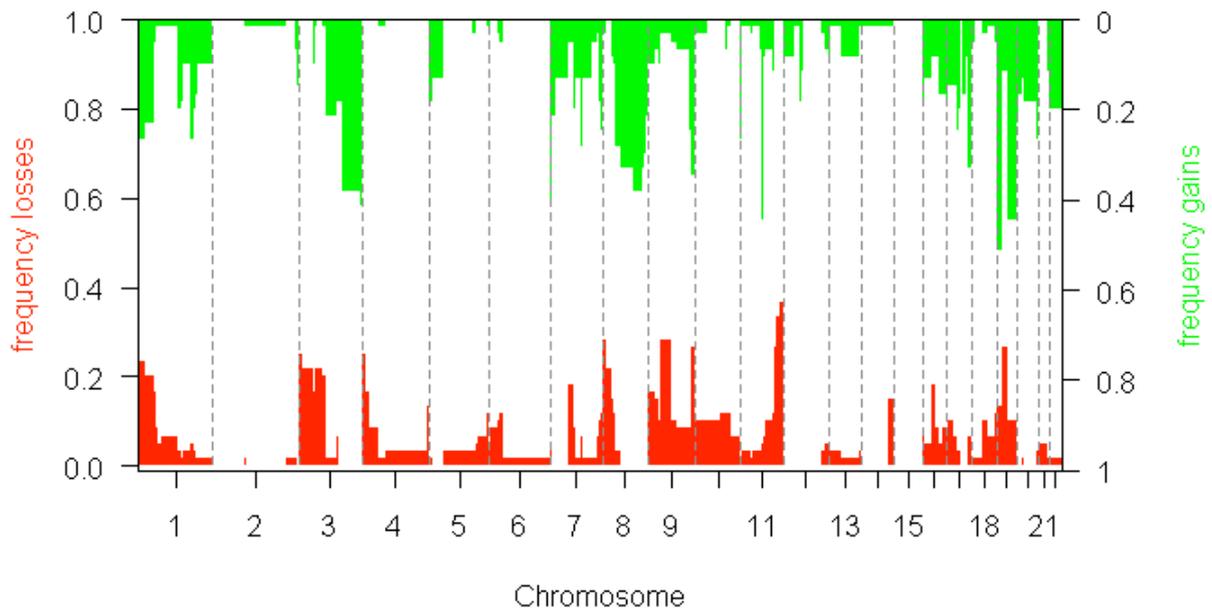


Abbildung 12: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen aller 60 untersuchten Kopf-Hals-Tumore

Dargestellt ist das Häufigkeitsprofil aller 60 untersuchten Kopf-Hals-Tumore. Die ermittelten Veränderungen sind entlang der Chromosomen 1-22 von pter nach qter im Rahmen ihrer Häufigkeiten aufgetragen. Deletionen (losses) sind als rote Balken (von unten nach oben) dargestellt, Amplifikationen (gains) analog als grüne Balken (von oben nach unten).

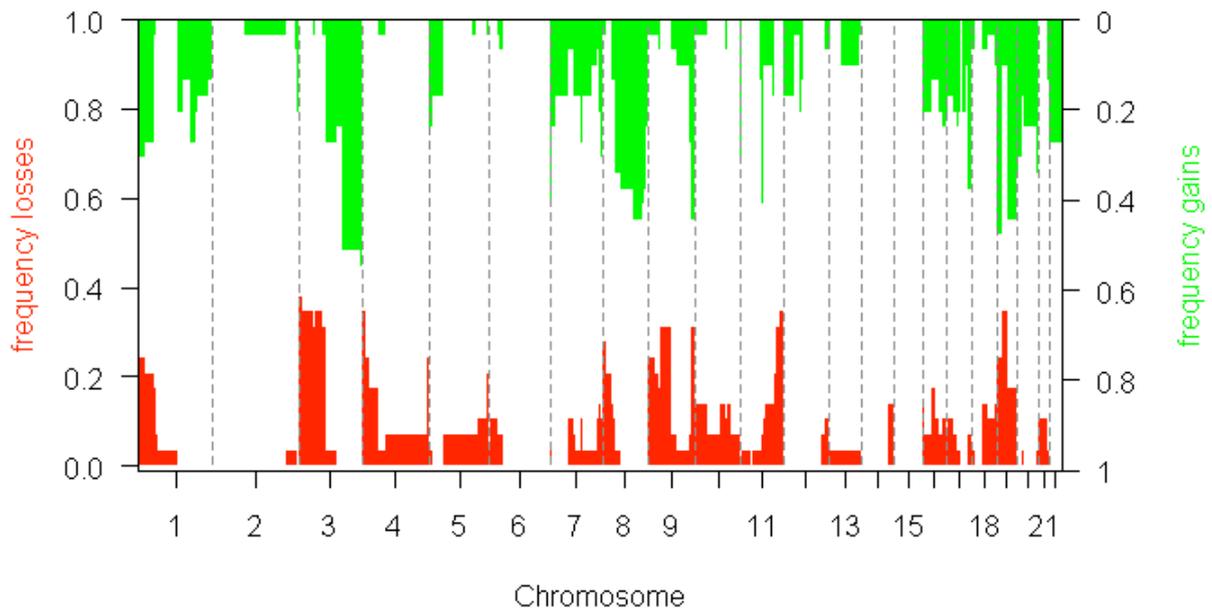


Abbildung 13: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen der Kopf-Hals-Tumore der männlichen Patienten

Dargestellt ist das Häufigkeitsprofil der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen in den 29 untersuchten Tumorproben der Männer. Die ermittelten Veränderungen sind entlang der Chromosomen 1-22 von pter nach qter entsprechend ihrer Häufigkeiten aufgetragen. Deletionen (losses) sind als rote Balken (von unten nach oben) dargestellt, Amplifikationen (gains) analog als grüne Balken (von oben nach unten).

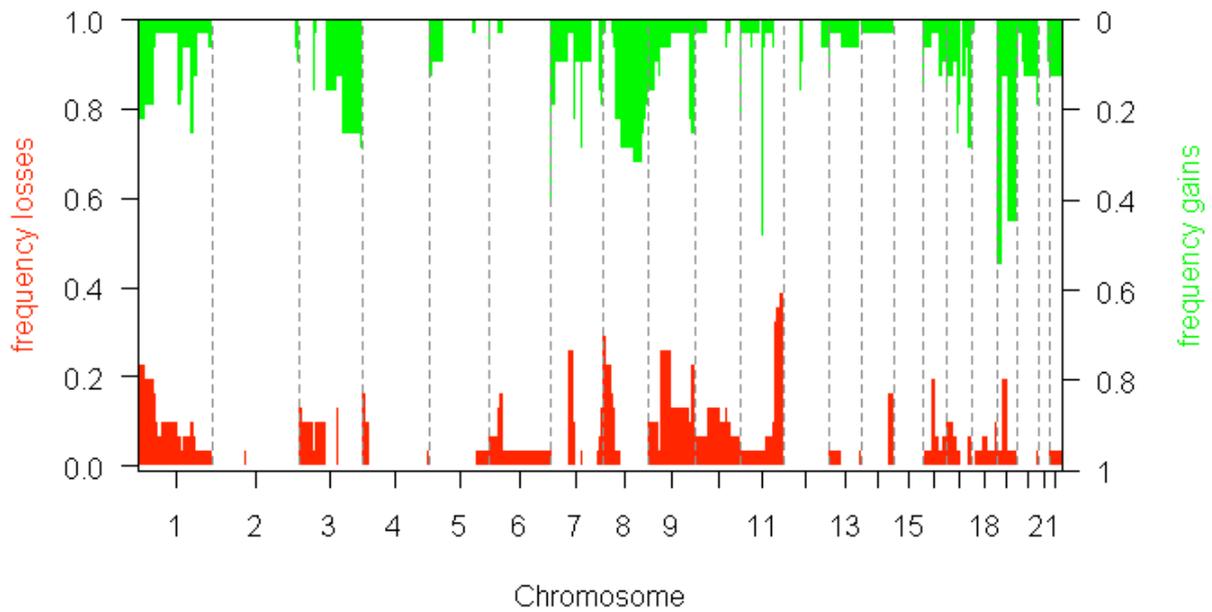


Abbildung 14: Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen der Kopf-Hals-Tumore der weiblichen Patienten

Dargestellt ist das Häufigkeitsprofil der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen in den 31 untersuchten Tumorproben der Frauen. Die ermittelten Veränderungen sind entlang der Chromosomen 1-22 von pter nach qter entsprechend ihrer Häufigkeiten aufgetragen. Deletionen (losses) sind als rote Balken (von unten nach oben) dargestellt, Amplifikationen (gains) analog als grüne Balken (von oben nach unten).

Tabelle 2: Wiederkehrende DNA-Verluste (11 Regionen) in mindestens 30% der untersuchten HNSCC (n=60)

Chr	Banden	Beginn (BAC)	Beginn (bp)	Ende (BAC)	Ende (bp)
3	p26.3-25.3	PAC1186B18	212817	RP11-105K13	8895825
3	p25.3-25.1	RP11-439F4	9829852	RP11-165B2	13823746
3	p25.1-22.1	RP11-305L22	15654041	RP11-527M19	41198083
3	p21.31-21.1	RP4-544D10	47409080	RP11-447A21	52684410
3	p21.1-14.3	RP11-122D19	54033354	RP11-80H18	58175201
3	p14.2-13	RP11-170K19	59727302	RP11-11L10	74152406
3	p12.3-11.2	RP11-220O14	77503140	RP11-312H1	87488189
4	p16.3-16.1	CTC-36P21	66628	RP11-117J13	8103624
9	p13.1-q21.11	RP11-133G22	40514338	RP11-250H24	69444194
9	q34.12-34.3	RP11-143H20	133852943	GS1-135I17	140893506
19	p12-q12	CTD-2332E11	20667611	CTC-416D1	32203740

Tabelle 3: Wiederkehrende DNA-Zugewinne (13 Regionen) in mindestens 30% der untersuchten HNSCC (n=60)

Chr	Banden	Beginn (BAC)	Beginn (bp)	Ende (BAC)	Ende (bp)
1	q21.3-22	RP11-98D18	153689068	RP11-172I6	155949960
3	q23-29	RP11-235I18	141596725	RP11-56C4	192381817
3	q29	RP11-279P10	194057113	RP11-23M2	197493977
7	q36.3	RP11-69O3	155501974	CTB-3K23	158804231
8	p23.3	RP11-338B22	488653	RP4-605G11	1624128
8	q24.3	RP5-1118A7	144333827	RP5-1056B24	146033936
9	q33.3-34.12	RP11-205K6	129217477	RP11-83J21	133642444
9	q34.12-34.3	RP11-143H20	133852943	GS1-135I17	140893506
11	p15.5	CTC-908H22	189227	RP11-113A6	2306063
12	q24.23-24.31	RP11-144B2	120578976	RP11-32O4	123250202
13	q34	RP11-310D8	112591157	CTB-163C9	114909379
17	q25.1-25.3	RP11-196E5	73552570	RP11-567O16	80780814
20	q13.33	RP5-1107C24	60462266	CTB-81F12	62922066

D.2.3 Hierarchische Clusteranalyse

Es wurde eine *unsupervised* hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, um in dem hier untersuchten Kollektiv Tumor-Fälle mit ähnlichen chromosomalen Kopienzahlveränderungsprofilen zu identifizieren. Die Clusteranalyse erfolgte mit Hilfe der segmentierten und geglätteten Log_2 -Ratios der BAC-Klone der Arrays. Im Rahmen dieser Clusteranalyse zeigte sich eine Aufteilung der Fälle in zwei Cluster (Cluster 1 und Cluster 2 (Abb. 15)). Cluster 1 enthielt 17 Fälle, Cluster 2 enthielt 43 Fälle. Um eine Korrelation der Cluster mit klinischen und pathologischen Daten zu testen, wurde der exakte Fisher-Test verwendet. Die beiden Cluster wurden auf Assoziationen mit den folgenden klinischen Parametern überprüft: Tumorgröße (pT), Lymphknotenstatus (pN), Differenzierungsgrad (pG) und Geschlecht (s. Tab. 4). Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Assoziationen der Cluster mit den getesteten pathologischen und klinischen Parametern: Tumorgröße (pT) (p-Wert = 1), Lymphknotenstatus (pN) (p-Wert = 1), Differenzierungsgrad (pG) (p-Wert = 0,06) und Geschlecht (p-Wert = 0,78). Während die Fälle in beiden Clustern in Bezug auf die Tumorgröße (pT), den Lymphknotenstatus (pN) und das Geschlecht sehr homogen verteilt waren, zeigte sich, auch wenn nicht statistisch signifikant (p-Wert = 0,06) in Cluster 1 eine Anreicherung mit besser differenzierten Tumoren (G 1/2 = 15); es befanden sich gleichzeitig nur sehr wenige schlecht differenzierte Tumore (G 3 = 2) in Cluster 1 (in Tabelle 4 gelb markiert). Die exakte Auftrennung der Fälle in beiden Clustern in Bezug auf die getesteten klinischen Parameter kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Cluster-Verteilung der HNSCC-Fälle hinsichtlich klinischer Parameter

	Tumorgröße	
	T1/2	T3/4
Cluster 1	9	8
Cluster 2	21	20
	Lymphknotenstatus	
	N0	N+
Cluster 1	7	8
Cluster 2	17	21
	Differenzierung	
	G1/2	G3
Cluster 1	15	2
Cluster 2	26	17
	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Cluster 1	8	9
Cluster 2	23	20

D.2.4 Korrelation von Kopienzahlveränderungen mit histopathologischen und klinischen Daten

Um die Korrelation einzelner Kopienzahlveränderungen mit histopathologischen und klinischen Daten zu beurteilen, wurden diese mittels Chi-Quadrat-Test auf signifikante Assoziationen geprüft. Da immer mehrere Tests durchgeführt werden, können auf Grund der erhöhten Anzahl zufällige p-Werte entstehen, die unter der Grenze für Signifikanz von 0,05 liegen. Um diese falsch positiven p-Werte so niedrig wie möglich zu halten, werden die ermittelten p-Werte mittels des FDR-Verfahrens adjustiert (FDR p-Wert < 0,05) (Manduchi, Grant, McKenzie, Overton, Surrey, & Stoeckert, 2000; van de Wiel et al., 2005). Alle 158 Veränderungsregionen wurden auf Korrelationen mit histopathologischen und klinischen Parametern getestet. Im Detail wurden Korrelationen der Regionen mit der Tumorgröße (T1/2 gegen T3/4), dem Lymphknotenbefall (N0 gegen N+), dem Differenzierungsgrad (G1/2 gegen G3), dem Geschlecht (männlich gegen weiblich) und dem Alter (älteste 30 Patienten gegen die 30 jüngsten Patienten) getestet.

Nimmt man als cut-off einen FDR p-Wert $< 0,05$, zeigten sich hierbei keine signifikanten Korrelationen der Kopienzahlveränderungen mit den getesteten histopathologischen und klinischen Parametern.

Schaut man sich jedoch die einzelnen Regionen in Bezug auf die beiden getesteten Gruppen (Männer mit der Kombination der Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholabusus sowie Frauen älter als 70 Jahre ohne die genannten Risikofaktoren) genauer an, fallen folgende Punkte auf. In Hinblick auf DNA-Zugewinne wies die Region auf Chromosom 20p12.3-12.1 den niedrigsten FDR adjustierten p-Wert von 0,26 auf. In Hinblick auf DNA-Verluste wiesen die folgenden 12 Regionen die niedrigsten FDR adjustierten p-Werte (0,13-0,2) auf: Chromosom 3p26.3-25.3, 3p25.3-25.1, 3p25.1-22.1, 3p21.31-21.1, 3p21.1-14.3, 3p14.2-13, 3p12.3-11.2, 4q35.1-35.2, 5q35.1-35.2, 5q35.2-35.3, 19p13.3-13.2, 19p13.2-13.11. Interessant ist des Weiteren, dass diese Regionen teilweise unmittelbar zueinander benachbart liegen und somit fünf übergeordnete Regionen entstehen. Diese liegen auf den Chromosomen 3p26.3-22.1, 3p21.31-11.2, 4q35.1-35.2, 5q35.1-35.3, 19p13.3-13.11. Die detaillierten Informationen zu den beschriebenen Regionen können Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Kopienzahlveränderungen der beiden getesteten Gruppen mit den niedrigsten FDR adjustierten p-Werten

Chr	Banden	Beginn (BAC_start)/bp	Ende (BAC_end)/bp	Status Array-CGH	Frequenz bei Männern	Frequenz bei Frauen	FDR
3	3p26.3-25.3	PAC1186B18/212817	RP11-105K13/8895825	Verlust	0,38	0	0,170
3	3p25.3-25.1	RP11-439F4/9829852	RP11-165B2/13823746	Verlust	0,38	0,13	0,165
3	3p25.1-22.1	RP11-305L22/15654041	RP11-527M19/41198083	Verlust	0,35	0,1	0,165
3	3p21.31-21.1	RP4-544D10/47409080	RP11-447A21/52684410	Verlust	0,31	0,03	0,129
3	3p21.1-14.3	RP11-122D19/54033354	RP11-80H18/58175201	Verlust	0,35	0,1	0,165
3	3p14.2-13	RP11-170K19/59727302	RP11-11L10/74152406	Verlust	0,35	0,1	0,165
3	3p12.3-11.2	RP11-220O14/77503140	RP11-312H1/87488189	Verlust	0,31	0,1	0,195
4	4q35.1-35.2	RP11-301L8/186414188	CTC-963K6/190702613	Verlust	0,24	0,03	0,165
5	5q35.1-35.2	RP11-20O22/171064773	CTC-355H1/175208164	Verlust	0,21	0,03	0,195
5	5q35.2-35.3	CTB-87L24/175904373	CTC-240G13/180580792	Verlust	0,21	0,03	0,195
19	19p13.3-13.2	CTC-546C11/259784	CTD-2659N19/12767174	Verlust	0,24	0,03	0,165
19	19p13.2-13.11	CTC-250I14/13240938	CTD-3149D2/17701434	Verlust	0,21	0,03	0,195
20	20p12.3-12.1	RP5-959I16/6262827	RP3-348M17/16641770	Zugewinn	0,31	0,03	0,256

D.2.5 Matching männlicher und weiblicher HNSCC-Fälle

Wie in Abschnitt D.2.4 angeführt, konnten zwar Unterschiede in den Veränderungshäufigkeiten 13 chromosomaler Regionen in den HNSCC der verglichenen Gruppen „Männer mit typischen Risikofaktoren“ und „ältere Frauen ohne typische Risikofaktoren“ beobachtet werden, jedoch konnten keine Kopienzahlveränderungen identifiziert werden, die statistisch signifikante Assoziationen mit den verglichenen Gruppen aufwiesen. Die beiden Gruppen männlicher und weiblicher HNSCC-Patienten waren hinsichtlich klinischer und histopathologischer Parameter nicht angeglichen. Die detaillierten klinischen und histopathologischen Daten der beiden Gruppen sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen. Rot markiert sind die Parameter, in welchen sich die beiden Gruppen deutlich unterschieden. Insgesamt waren nur vier Tumore mit Differenzierungsgrad

G1 vertreten, die allesamt von Frauen stammten. Des Weiteren waren in der Gruppe der Männer doppelt so viele T4 Tumore vertreten wie in der Gruppe der Frauen; umgekehrt verhielt es sich mit T1 Tumoren: in der Gruppe der Frauen waren dreimal so viele vertreten wie in der Gruppe der Männer. Ähnliches galt für den Lymphknotenbefall: in der männlichen Gruppe waren doppelt so viele N1 Tumore zu finden, wie in der Gruppe der Frauen. Bei deutlich mehr weiblichen Patienten war außerdem der Lymphknotenstatus nicht exakt klassifiziert, was auf das hohe Alter und die daraus resultierende Inoperabilität der Patientinnen zurückgeführt werden kann. Da nicht angegliche klinische und histopathologische Parameter als Störfaktoren Einfluss auf die statistischen Ergebnisse nehmen können, wurden die Gruppen „Männer mit typischen Risikofaktoren“ und „ältere Frauen ohne typische Risikofaktoren“ hinsichtlich klinischer und histopathologischer Parameter angeglichen. In den angeglichenen Gruppen verblieben 21 HNSCC-Fälle männlicher und 21 HNSCC-Fälle weiblicher Patienten.

Tabelle 6: Klinische und histopathologische Daten in der Gruppe der Männer (n=29)

		Anzahl	Prozent
Grading	G1	0	0,00
	G2	18	62,07
	G3	11	37,93
	Gesamt	29	
Resektionsstatus	R0	22	75,86
	R1	2	6,90
	nicht klassifiziert	5	17,24
	Gesamt	29	
Tumorgröße	T1	2	6,90
	T2	11	37,93
	T3	4	13,79
	T4	12	41,38
	Gesamt	29	
Lymphknotenstatus	N0	12	41,38
	N1	6	20,69
	N2	10	34,48
	nicht klassifiziert	1	3,45
	Gesamt	29	

**Tabelle 7: Klinische und histopathologische Daten in der Gruppe der Frauen
(n=31)**

		Anzahl	Prozent
Grading	G1	4	12,90
	G2	19	61,29
	G3	8	25,81
	Gesamt	31	
Resektionsstatus	R0	21	67,74
	R1	4	12,90
	nicht klassifiziert	6	19,35
	Gesamt	31	
Tumorgröße	T1	6	19,35
	T2	11	35,50
	T3	6	19,35
	T4	6	19,35
	nicht klassifiziert	2	6,45
	Gesamt	31	
Lymphknotenstatus	N0	12	38,71
	N1	3	9,68
	N2	10	32,26
	nicht klassifiziert	6	19,35
	Gesamt	31	

D.2.6 Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen

Die angeglichenen Gruppen der 21 männlichen und 21 weiblichen HNSCC-Fälle wurden erneut mittels Chi-Quadrat-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede in Kopienzahlveränderungen untersucht sowie die erhaltenen p-Werte mittels FDR-Verfahren adjustiert. Neben dem Vergleich der HNSCC-Fälle der Männer gegen diejenigen der Frauen, wurden auch erneut die unter D.2.4 aufgeführten klinischen Parameter hinsichtlich Assoziationen mit einzelnen Kopienzahlveränderungen getestet. Bei den DNA-Verlusten zeigten sich erstmals in Bezug auf klinische Daten zwei Regionen die im Test von Patienten ohne Lymphknotenmetastasen gegen solche mit Lymphknotenmetastasen p-Werte von kleiner 0,05 aufwiesen. Im FDR adjustierten Verfahren lagen die p-Werte beider Regionen bei 0,132. Diese beiden Regionen auf Chromosom 5q35.1-35.2 und 5q35.2-35.3 wurden auch bereits unter D.2.4 beschrieben.

Im Vergleich der 21 Frauen gegen 21 Männer fiel in Hinblick auf DNA-Zugewinne wie bereits weiter oben beschrieben die Region auf Chromosom 20p12.3-12.1 mit einem

FDR adjustierten p-Wert von 0,21 auf; somit jedoch über dem Signifikanzniveau von $< 0,05$.

Im Vergleich der 21 Frauen gegen 21 Männer zeigten sich sieben Regionen auf den Chromosomen 3p25.3-25.1, 3p25.1-22.1, 3p22.1-21.31, 3p21.31-21.1, 3p21.1-14.3, 4q35.1-35.2 und 19p12-q12, die einen p-Wert $< 0,05$ und einen FDR adjustierten p-Wert $\leq 0,1$ aufwiesen. Von den insgesamt sieben Regionen sind fünf ebenfalls unter D.2.4 bereits beschrieben worden – die Regionen auf den Chromosomen 3p22.1-21.31 und 19p12-q12 sind in der wiederholten Analyse an den gematchten Gruppen neu aufgetreten.

Die detaillierten Informationen bezüglich der Korrelationen von Kopienzahlveränderungen der gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fälle können den Tabelle 8 und 9 entnommen werden.

Tabelle 8: Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen in Bezug auf das Geschlecht

Chr	Banden	Beginn (BAC_start)/bp	Ende (BAC_end)/bp	Status Array-CGH	Frequenz bei Männern	Frequenz bei Frauen	FDR
3	3p25.3-25.1	RP11-439F4/9829852	RP11-165B2/13823746	Verlust	0,38	0	0,036
3	3p25.1-22.1	RP11-305L22/15654041	RP11-527M19/41198083	Verlust	0,33	0,05	0,103
3	3p22.1-21.31	RP11-437N10/42524397	RP11-91E8/46015822	Verlust	0,29	0	0,089
3	3p21.31-21.1	RP4-544D10/47409080	RP11-447A21/52684410	Verlust	0,33	0	0,042
3	3p21.1-14.3	RP11-122D19/54033354	RP11-80H18/58175201	Verlust	0,33	0,05	0,103
4	4q35.1-35.2	RP11-301L8/186414188	CTC-963K6/190702613	Verlust	0,29	0	0,089
19	19p12-q12	CTD-2332E11/20667611	CTC-416D1/32203740	Verlust	0,43	0,05	0,042
20	20p12.3-12.1	RP5-959I16/6262827	RP3-348M17/16641770	Zugewinn	0,33	0	0,213

Tabelle 9: Korrelation von Kopienzahlveränderungen in gematchten männlichen und weiblichen HNSCC-Fällen in Bezug auf den Lymphknotenbefall

Chr	Banden	Beginn (BAC_start)/bp	Ende (BAC_end) /bp	Status Array-CGH	Frequenz bei N0	Frequenz bei N+	FDR
5	5q35.1-35.2	RP11-20O22/ 171064773	CTC-355H1/ 175208164	Verlust	0,13	0	0,132
5	5q35.2-35.3	CTB-87L24/ 175904373	CTC-240G13/ 180580792	Verlust	0,13	0	0,132

E Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 60 Kopf-Hals-Tumore (54 Tumore der Mundhöhle, vier Tumore des Oropharynx, zwei Tumore nicht exakt klassifiziert bzgl. der Lokalisation innerhalb des Aerodigestivtraktes) mittels Array-CGH auf genomische Kopienzahlveränderungen hin untersucht. Diese Tumore stammten zum einen von typischen männlichen Kopf-Hals-Tumor Patienten mittleren Alters mit der Kombination der beiden Hauptrisikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum und zum anderen von eher für diese Krankheitsentität untypischen Patienten, nämlich Frauen älter als 70 Jahre ohne diese beiden genannten typischen Risikofaktoren. Auch wenn diese Frauen ohne die genannten Risikofaktoren deutlich seltener Plattenepithelkarzinome des Aerodigestivtraktes entwickeln, ist es bisher ungeklärt, weswegen insbesondere in höherem Alter die Inzidenz dieser Tumore in dieser seltenen Patientengruppe ansteigt. Klinisch ist diese Gruppe vor allem interessant, da es sich häufig um multimorbide Patienten handelt, bei welchen größere, radikale Tumoroperationen mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Sollten sich Unterschiede in der Tumorbilogie ergeben, kann unter Umständen in Zukunft eine individualisierte, weniger invasive und somit für die Patienten risikoärmere Therapie entwickelt werden. Ziel dieser Arbeit war es initial zu untersuchen, ob die Tumore der Frauen, die den Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum nicht ausgesetzt waren, andere genomische Aberrationen aufweisen als die Tumore der Männer mit den genannten Risikofaktoren. Die in dieser Arbeit ermittelten chromosomalen Kopienzahlveränderungen in den HNSCC wurden zudem auf Korrelationen mit klinischen und histopathologischen Parametern überprüft. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Kopf-Hals-Tumore beider Gruppen Unterschiede in der Häufigkeit HPV-assoziiierter HNSCC aufweisen. Infektionen mit HPV stellen neben Alkohol- und Tabakkonsum einen weiteren wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches dar. Zudem ist bekannt, dass sich die molekularen Veränderungen HPV-assoziiierter Tumore von denen HPV-negativer Tumore deutlich unterscheiden (Cancer Genome Atlas, 2015; Gollin, 2014).

HPV-Status des untersuchten HNSCC-Kollektivs

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene HPV-Stämme, die sog. „high-risk Typen“, vor allem HPV 16 und 18 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einiger HNSCC spielen (Leemans et al., 2011; Premoli-De-Percoco et al., 1998; Ragin et al., 2007). Insgesamt konnte in den Industrienationen eine Abnahme von Mundhöhlenkarzinomen verzeichnet werden, analog zur Abnahme des Tabakkonsums (Chaturvedi et al., 2013; Franceschi et al., 2000). Gleichzeitig konnte aber was Oropharynx-Karzinome angeht eine Zunahme der Inzidenzen beobachtet werden (Chaturvedi et al., 2013; Gollin, 2014). Dies wird vor allem auf die Zunahme der HPV-assoziierten Oropharynx-Karzinome zurückgeführt (Hong et al., 2010; Mehanna et al., 2010; Nasman et al., 2009; S. Syrjanen, 2004; Tachezy et al., 2005). In einer 2014 veröffentlichten Metaanalyse wurden insgesamt mehr als 12.000 HNSCC auf ihren HPV-Status hin überprüft. Insgesamt waren 45,8% der Oropharynx-Karzinome HPV-positiv, während bei den Karzinomen der Mundhöhle die Rate deutlich geringer, jedoch immer noch bei 24,2% lag (Ndiaye et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnten initial nur zwei HPV-positive HNSCC-Fälle – beide bei männlichen Patienten – nachgewiesen werden. Dies steht im ersten Moment nicht im Einklang mit der gängigen Literatur, da hier viel höhere Raten dokumentiert wurden. Das vorliegende Kollektiv besteht jedoch zu 90% aus Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, die im Vergleich mit Oropharynx-Karzinomen per se in viel geringerem Maße mit HPV-Infektionen assoziiert sind. Des Weiteren steigt in Industrienationen vornehmlich die Inzidenz der HNSCC bei jüngeren Patienten an, was u. a. auf das veränderte Sexualverhalten zurückgeführt wird (Rettig, Kiess, & Fakhry, 2015). Hierbei gelten als Risikofaktoren u. a. die Anzahl der oralen Sexualpartner, viele vaginale Sexualpartner sowie ein junges Alter bei erstem Sexualkontakt (Rettig et al., 2015). In Bezug auf das vorliegende Kollektiv und die sehr geringe Anzahl an detektierten HPV-assoziierten Tumoren lässt sich argumentieren, dass bei den Männern die klassischen Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum vorliegen und bei den Frauen auf Grund des hohen Alters und der früher konservativeren Moralvorstellungen und des damit einhergehenden Sexualverhaltens die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion noch deutlich geringer war.

In den letzten Jahren ist das Interesse an HPV-assoziierten Tumoren stetig gestiegen, was u. a. damit zusammenhängt, dass die Prognose der Patienten hierdurch beeinflusst wird. Fakhry et al. haben beispielsweise in einer der ersten prospektiven klinischen Studien mit 105 Patienten eine signifikant höhere Überlebensrate von Patienten mit HPV-positiven Tumoren im Gegensatz zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren nachweisen können (Fakhry et al., 2008). Auch andere Studien konnten zeigen, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren eine insgesamt längere Überlebenszeit aufweisen, als HPV-negative Tumorpatienten (Ang et al., 2010; Pytynia et al., 2014). Der Grund hierfür ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch gibt es Hinweise, dass diese Tumore ein besseres Ansprechen auf eine Strahlen- und Chemotherapie sowie eine damit einhergehende bessere lokoregionale Kontrolle aufweisen (Ang et al., 2010; Ang & Sturgis, 2012; Posner et al., 2011; Pytynia et al., 2014; Tribius et al., 2011). Es ist des Weiteren bekannt, dass sich die molekularen Veränderungen HPV-assoziiierter Tumore von denen HPV-negativer Tumore unterscheiden (Cancer Genome Atlas, 2015; Gollin, 2014). Zu den häufigsten Veränderungen zählen bei den HPV-positiven Tumoren Mutationen von *PIK3CA*, der Verlust von *TRAF3* sowie Amplifikationen von *E2F1*. HPV-negative Tumore zeigen eine Vielzahl an Veränderungen, beispielsweise Amplifikationen der chromosomalen Banden 11q13 (*CCND1*, *FADD* und *CTTN*) sowie 11q22 (*BIRC2* und *YAP1*). Des Weiteren weisen HPV-negative Tumore auch eine Vielzahl an Mutationen in Tumorsuppressorgenen auf (z. B. *FAT1*, *NOTCH1*, *SMAD4* und *CDKN2A*). Die therapeutisch relevante *EGFR*-Überexpression tritt vornehmlich in HPV-negativen Tumoren auf. Fast alle mit Tabakkonsum assoziierten Tumore zeigen den Verlust von *TP53* sowie Mutationen von *CDKN2A* (Übersicht in Cancer Genome Atlas, 2015).

Letztendlich waren HPV-positive Tumore in der vorliegenden Arbeit nur in sehr geringem Maße vertreten. HPV-positive Tumore wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen, um den möglichen Störfaktor „HPV-Status“ zu eliminieren.

Chromosomale Aberrationen des untersuchten Kollektivs

Es ist bekannt, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine große Anzahl genomischer Kopienzahlveränderungen aufweisen (Gollin, 2014; Patmore,

Cawkwell, Stafford, & Greenman, 2005). Die im vorliegenden Kollektiv am häufigsten aufgetretenen DNA-Zugewinne (>30%) befanden sich auf den Chromosomen 1q, 3q, 7q, 8p, 8q, 9q, 11p, 12q, 13q, 17q und 20q; die am häufigsten aufgetretenen DNA-Verluste befanden sich auf den Chromosomen 3p, 4p, 9p, 9q, 19p und 19q. Diese Ergebnisse stehen gut im Einklang mit in der Literatur häufig beschriebenen Kopienzahlveränderungen in HNSCC. Die häufigsten zytogenetischen Aberrationen in HNSCC sind DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q26, 5p14-15, 7p11, 8q11-12, 8q24, 11q13, 20q12-13 sowie -Verluste auf 3p, 4q35, 5q12, 8p23, 9p21-24, 11q14-23, 13q12-14, 18q23 und 21q22 (Gollin, 2014). Kopienzahlveränderungen der Chromosomen 3p, 3q, 8q, 9p und 20q konnten auch in dem in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Kollektiv als häufig vorkommende Veränderungen nachgewiesen werden.

In der hierarchischen Clusteranalyse zeigte sich eine deutliche Auftrennung der Aberrationsprofile der untersuchten HNSCC-Fälle in zwei Cluster. Es konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen der Cluster mit klinischen oder histopathologischen Parametern nachgewiesen werden. In Bezug auf den Differenzierungsgrad zeigten sich in Cluster 1 jedoch vornehmlich Fälle mit besser differenzierten Tumoren und nur sehr wenige mit schlecht differenzierten Tumoren (s. Tab. 4). Fälle in Cluster 1 wiesen insgesamt weniger chromosomale Aberrationen, insbesondere DNA-Verluste, als die Fälle in Cluster 2 auf. Diese Beobachtung passt sehr gut zu der Annahme, dass je schlechter ein Tumor differenziert ist, umso mehr chromosomale Veränderungen auftreten (Gollin, 2014). Dies ist bereits auffallend, wenn man sich die Zunahme der verschiedenen Aberrationen vom gesunden über dysplastisches Gewebe bis hin zum invasiven Karzinom betrachtet. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 3q26-qter, 5p15, 8q11-21 und 8q24.1-qter sowie DNA-Verluste auf 18q22-qter mit einer Transition von milder zu moderater Dysplasie auftreten. Zugewinne auf 11q13, 14q, 17q11-22 und 20q sowie Verluste auf 9p sind involviert im Übergang von moderater zu schwerer Dysplasie. Verluste auf 3p14-21 und 5q12-22 werden häufig in Zusammenhang mit einer Progression von schwerer Dysplasie hinzu einem invasiven Karzinom beobachtet (Gollin, 2014). In den beiden vorliegenden Clustern konnte in Bezug auf die Häufigkeit dieser Veränderungen kein Unterschied festgestellt werden, was sich dadurch erklären lässt, dass es sich bei allen hier untersuchten Tumoren bereits um invasive Karzinome handelt.

Darüber hinaus kann die intratumorale Heterogenität erklären, weswegen schlechter differenzierte Tumore mehr Veränderungen aufweisen als gut differenzierte Tumore. Tumore bestehen häufig aus unterschiedlichen Zellklonen mit verschiedenen Genotypen. Das entsteht durch die genetische Instabilität der Tumore, wodurch es im Rahmen der Progression des Tumors zu einer Anhäufung unterschiedlicher Mutationen kommt. Diese Mutationen können für die jeweilige Tumorzelle einen Überlebens- oder Vermehrungsvorteil darstellen (Merlo et al., 2010). In Bezug auf die Differenzierung der Tumore ist bereits mikroskopisch zu sehen, dass sich schlecht differenzierte Tumore stark vom ursprünglichen Gewebe unterscheiden. Dies legt nahe, dass sich schlecht differenzierte Tumore auch von besser differenzierten Tumoren hinsichtlich der Anzahl chromosomaler Aberrationen unterscheiden (Forastiere, Koch, Trotti, & Sidransky, 2001; Gollin, 2014).

Unterschiede der Kopienzahlveränderungen zwischen den Gruppen und klinisches Matching

Die mit Hilfe der Array-CGH ermittelten Kopienzahlveränderungen der Tumorproben wurden zwischen den beiden untersuchten Gruppen, Männern mit den klassischen Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum, sowie Frauen ab 70 Jahren ohne die genannten Risikofaktoren, verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft. Hierbei konnte keine signifikante Assoziation einzelner Kopienzahlveränderungen im Auftreten mit den beiden Gruppen ermittelt werden.

Wenn man in Abbildung 13 und 14 die Häufigkeitsprofile der Tumore von Männern und Frauen vergleicht, ist zu erkennen, dass sich die veränderten chromosomalen Regionen in beiden Gruppen überschneiden. Es ist dabei ebenfalls zu erkennen, dass sich die Aberrationshäufigkeiten bei den Tumoren der Frauen von denjenigen der Männer unterscheiden. Diese fallen bei den Frauen insgesamt geringer aus. Um Unterschiede in Kopienzahlveränderungen zwischen den beiden untersuchten Gruppen der Tumore von „Männern“ und „Frauen“ herauszufiltern, müssen die Gruppen möglichst gut hinsichtlich aller klinischen und histopathologischen Parameter angeglichen sein. Dies war jedoch nicht der Fall (vgl. Tab. 6 und Tab. 7). Die Tumore der Frauen waren besser differenziert; bei den Tumoren der Männer waren insgesamt mehr Tumore mit höherem T-Status und doppelt so viele N1 Tumore zu finden wie bei den Tumoren der Frauen. Aus diesem Grund wurden die

Tumore der männlichen und weiblichen Patienten einander paarweise anhand ihrer klinischen und pathologischen Daten angeglichen. Es konnten somit insgesamt 21 Frauen zu 21 Männern zugeteilt werden.

Bei den DNA-Verlusten zeigte sich erstmals eine Assoziation zweier Veränderungsregionen (Chromosom 5q35.1-35.2 und 5q35.2-35.3) mit dem Lymphknotenstatus. Die FDR adjustierten p-Werte beider Regionen lagen mit 0,132 über dem zuvor gesetzten Signifikanzniveau von 0,05, allerdings kann dies an der kleinen Fallzahl liegen. DNA-Verluste des langen Arms von Chromosom 5 (5q) wurden bereits mit Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht. Jedoch liegen die beschriebenen Regionen u. a. im Bereich von 5q31.1-33.1 und 5q21-22 (Mao, Schwartz, Daling, & Beckmann, 1998; Ribeiro et al., 2014). Dabei wurde die Region 5q21-22 bereits in einer Studie mit 49 Patienten mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht. Patienten in frühen Stadien zeigten demnach nur in 14% der Fälle einen Verlust dieser Region, während Patienten in einem lokal fortgeschrittenen Stadium in 50% der Fälle und metastasierte Patienten sogar in 100% der Fälle diesen DNA-Verlust verzeichnet hatten (Mao et al., 1998). In der chromosomalen Bande 5q21 liegen die Tumorsuppressorgene *APC* und *MCC*, die vor allem mit der familiären Polyposis coli und Kolonkarzinomen assoziiert wurden (Kinzler, Nilbert, Su, et al., 1991; Kinzler, Nilbert, Vogelstein, et al., 1991). Die in der vorliegenden Arbeit detektierten DNA-Verluste der chromosomalen Region 5q35.1-35.3 wurden bereits beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und Mammakarzinom als häufige chromosomale Veränderung beschrieben (Johannsdottir et al., 2006; Mendes-da-Silva, Moreira, Duro-da-Costa, Matias, & Monteiro, 2000). Bei Kopf-Hals-Tumoren wurden Veränderungen dieser chromosomalen Region jedoch bislang nicht als häufige Veränderung beschrieben, genauso wenig wie eine Assoziation mit Lymphknotenmetastasierung beschrieben wurde. Die beobachtete Assoziation von DNA-Verlusten auf Chromosom 5q mit Lymphknotenmetastasierung kann als Ausgangspunkt für die Identifizierung von Kandidatengenen in der chromosomalen Region dienen. Darüber hinaus sollten weitere Tumore unabhängiger Kopf-Hals-Tumor-Kollektive untersucht werden, um die Assoziation mit dem Lymphknotenstatus zu validieren.

Im angeglichenen Kollektiv konnte für DNA-Zugewinne weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen (Männer versus Frauen) festgestellt werden.

Im Vergleich der einander angeglichenen 21 Frauen gegen 21 Männer zeigten sich sieben von DNA-Verlusten betroffene Regionen auf den Chromosomen 3p25.3-25.1, 3p25.1-22.1, 3p22.1-21.31, 3p21.31-21.1, 3p21.1-14.3, 4q35.1-35.2 und 19p12-q12, die einen p-Wert $< 0,05$ und einen FDR adjustierten p-Wert $\leq 0,1$ aufwiesen; diese sieben Veränderungen traten häufiger in den Tumoren der Männer auf. Es ergaben sich darunter drei Regionen auf den Chromosomen 3p25.3-25.1, 3p21.31-p21.1 und 19p12-q12, deren FDR adjustierte p-Werte $< 0,05$ lagen und damit als signifikante Unterschiede chromosomaler Kopienzahlveränderungen gewertet wurden.

Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 (Chromosom 3p) ist bereits in mehreren HNSCC-Studien beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine der frühesten, häufigsten und wahrscheinlich entscheidendsten Aberrationen bei diesen Tumoren, die bei mehr als 90% der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle auftritt (Gollin, 2014). Auch bei vielen anderen Tumoren, wie z. B. Bronchialkarzinomen, Magenkarzinomen oder B-Zell-Lymphomen treten Veränderungen im kurzen Arm von Chromosom 3 häufig auf (Durkin & Glover, 2007). Der Verlust des Chromosoms 3p ist häufig durch einen Bruch, meistens in der chromosomalen Bande 3p14, verursacht. In dieser Region ist das *FHIT*-Gen lokalisiert; als fragilste chromosomale Stelle wurde der Lokus des *FRA3B*-Gens identifiziert (Durkin & Glover, 2007; Ishii, Wang, & Huebner, 2007). *FHIT* ist mit der Tumorentwicklung und -progression assoziiert: es spielt u. a. eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung von DNA-Schäden und der Induktion von Apoptose (Saldivar et al., 2013). Stein et al. konnten zudem zeigen, dass ein Bruch im *FRA3B*-Genlokus in Zusammenhang mit Tabakkonsum steht (Stein, Glover, Palmer, & Glisson, 2002). Auf Chromosom 3p befinden sich weitere Gene, denen eine Rolle bei der Tumorentwicklung zugeschrieben wird: u. a. *FANCD2*, *TOP2B*, *RASSF1* (Gollin, 2014; Hermsen et al., 2005). Hierbei ist zu erwähnen, dass Kopienzahlveränderungen der beiden Regionen 3p25.3-25.1 und 3p21.31-21.1 ausschließlich in Tumoren von männlichen Patienten auftraten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer anderen Studie, in der zum einen gezeigt werden konnte, dass im Durchschnitt weniger DNA-Verluste in Tumoren von Nichtrauchern zu finden sind, als in denjenigen von Rauchern. Darüber hinaus konnten in der Studie von Koch et al. Verluste von Chromosom 3p als eine spezifische chromosomale Veränderung identifiziert werden, die in den Tumoren typischer Kopf-Hals-Tumorpatienten mit dem Risikofaktor Tabakkonsum signifikant häufiger auftritt (Koch, Lango, Sewell, Zahurak, & Sidransky, 1999).

Nachdem diese Regionen auch in dieser Studie bei den Frauen ohne gängige Risikofaktoren signifikant seltener Verluste zeigten, als dies bei den Männern in der vorliegenden Kohorte der Fall war, sollten hierzu weitere Untersuchungen mit Identifizierung weiterer Kandidatengene stattfinden.

Ebenfalls mit einem FDR adjustierten p-Wert von $< 0,05$ zwischen den beiden Gruppen fiel die Region 19p12-q12 auf. Hier konnten DNA-Verluste dieser chromosomalen Region nur in einem Tumor einer weiblichen Patientin im Gegensatz zu neun männlichen HNSCC-Tumoren nachgewiesen werden. Bislang sind DNA-Verluste in diesem Bereich nicht als häufige Veränderung bei HNO-Tumoren beschrieben.

DNA-Verluste der Region 4q35.1-35.2 wiesen in der statistischen Auswertung einen FDR korrigierten p-Wert von 0,089 auf, somit über der gesetzten Grenze für Signifikanz. Frühere Studien haben epigenetisches Gen-Silencing und homozygote Deletionen auf Chromosom 4q35 in HNSCC der Mundhöhle detektiert (Nakamura et al., 2008; Nakaya et al., 2007). In dieser Region liegen das Tumorsuppressorgen *FAT1*, (Nakaya et al., 2007) sowie weitere potentielle Tumorsuppressorgene (u. a. *MTNR1A* sowie *ING2*) (Borkosky et al., 2009; Nakamura et al., 2008). Für *ING2*, das Teil der *ING*-Genfamilie ist, wurde gezeigt, dass es in Kooperation mit p53 eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellalterung, der Zellantwort bei Zellschäden sowie bei der DNA-Reparatur spielt (Nagashima et al., 2001; Pedeux et al., 2005; Wang, Wang, & Li, 2006). Bisher wurden Deletionen in dieser Region nicht mit Risikofaktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum in Verbindung gebracht. Obwohl diese Region nicht zu den häufigsten Genveränderungen bei HNSCC zählt, konnte dennoch auch hier gezeigt werden, dass die Inaktivierung diverser Tumorsuppressorgene eine Rolle bei der Entstehung dieser Art Tumore spielen kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der vorliegenden Studie bei Kopf-Hals-Tumoren typischerweise auftretende Kopienzahlveränderungen in beiden untersuchten Patientengruppen nachgewiesen werden konnten. Die Veränderungsbereiche scheinen jedoch in Zusammenhang mit regelmäßiger Einwirkung bestimmter Noxen wie Alkohol- und Tabakkonsum zu stehen. In der vorliegenden Arbeit konnten DNA-Verluste dreier Regionen identifiziert werden, die sich zwischen den beiden getesteten Gruppen der HNSCC von Männern mit den klassischen Risikofaktoren (Tabak- und Alkoholkonsum) und Frauen > 70 Jahre ohne

diese Risikofaktoren, signifikant unterschieden. Zwei dieser drei Regionen befanden sich auf Chromosom 3p. Veränderungen in dieser Region wurden bereits in vorhergehenden Studien mit dem Risikofaktor Tabakkonsum assoziiert (Koch et al., 1999; Stein et al., 2002). Die beobachteten Unterschiede in den drei identifizierten Regionen sind zumindest auf Chromosom 3p am ehesten auf Unterschiede in den Risikofaktoren und weniger auf das Alter bzw. das Geschlecht der HNSCC-Patienten zurückzuführen. Um dies genauer bestimmen zu können, wären weitere Studien an anderen HNSCC-Kollektiven wünschenswert, die sich nur in einem Parameter unterscheiden. Des Weiteren können die Ergebnisse als Ausgangspunkt für die Identifizierung von Kandidatengenen in den betroffenen Veränderungsregionen dienen. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse in weiteren HNSCC-Tumoren unabhängiger Kopf-Hals-Tumor-Kollektiven validiert werden.

Insgesamt weisen die Frauen zwar die für Kopf-Hals-Tumore typischen chromosomalen Aberrationen auf, jedoch zeigte sich im vorliegenden Kollektiv in der weiblichen Kohorte eine geringere Frequenz an chromosomalen Veränderungen, was letztendlich auch durch die bessere Differenzierung dieser Tumore erklärt werden kann. Hierbei ist es möglich, dass sich diese Aberrationen im Rahmen ständig entstehender DNA-Schäden entwickelt haben. Je älter die Menschen werden, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit verschiedene chromosomale Veränderungen zu entwickeln. Sind hierbei dann entscheidende Tumorsuppressorgene betroffen, kann dies bereits ausreichend sein um ein HNSCC zu entwickeln.

Dass sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen nur in sehr geringem Maße Unterschiede und in der Gruppe der Frauen wie bereits beschrieben die für Kopf-Hals-Tumore typischen Kopienzahlveränderungen gezeigt haben, kann auch daran liegen, dass sich Unterschiede zwischen den Tumoren der zwei Patientengruppen auf einer anderen molekularen Ebene zeigen, z. B. auf mRNA-, miRNA- oder Proteinebene. Letztendlich geht es in der Medizin langfristig darum, Krankheitsursachen aufzudecken um eine möglichst effiziente Therapie anbieten und das Überleben der Patienten verbessern zu können. Insbesondere alte, multimorbide Patienten würden von einem besseren Verständnis der Tumorbilogie und daran individuell angepassten Therapieregimen profitieren. Dabei sollte das Augenmerk auf die Radiochemotherapie gerichtet werden, da multimorbide Patienten häufig inoperabel sind. Im vorliegenden Kollektiv würden insbesondere die älteren Frauen,

bei welchen größere Operationen häufig zu riskant und mit einer deutlich höheren Morbidität und Mortalität vergesellschaftet sind von individualisierten Therapien profitieren. Im Verlauf wäre es somit von großem Interesse, ob sich bei dieser Patientengruppe im Rahmen weiterer Studien beispielsweise Marker für ein besseres Therapieansprechen bei individualisierter Therapie ergeben würden. Hierfür sind weitere genetische und molekularbiologische Forschungsprojekte unabdingbar.

F Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumore stellen die fünfthäufigste maligne Tumorerkrankung weltweit dar. Die Entstehung der HNSCC hat multifaktorielle Ursachen und ist mit verschiedenen Noxen und Infektionen assoziiert worden. Darunter fallen der Konsum von Tabak und Alkohol, eine ungesunde Ernährung, mangelnde Mundhygiene, das Betelnusskauen sowie die Infektion mit HPV und EBV. Als Hauptrisikofaktoren werden weiterhin der Konsum von Zigaretten und Alkohol angesehen, wobei das Risiko bei kombiniertem Konsum mehrfach potenziert wird. Neben Patienten, die dieser Art Risikofaktoren ausgesetzt waren, entwickeln auch Patienten ohne bekannte Risikofaktoren Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches. Bei diesen Patienten sind die Ursachen hierfür bisher nicht eindeutig bekannt. In vielfachen Studien wurden bereits vielfältige, unterschiedliche, chromosomale Aberrationen in Kopf-Hals-Tumoren detektiert. Ein Teil der chromosomalen Aberrationen konnte bereits mit Noxen wie Alkohol-, Tabakkonsum oder der Infektion mit humanen Papillomviren assoziiert werden. Andere Aberrationen konnten in Verbindung mit der weiteren Prognose oder dem Therapieansprechen, beispielsweise Strahlenempfindlichkeit, gebracht werden. Bisher gibt es jedoch noch viele weitere chromosomale Veränderungen, die weder in Bezug auf die Ursache noch auf weitere Therapien zugeordnet werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gruppen von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mittels Array-CGH auf unterschiedliche chromosomale Veränderungen hin untersucht. Die eine der beiden Gruppen bestand dabei aus Männern, die den klassischen Risikofaktoren in Kombination Alkohol- und Tabakkonsum ausgesetzt waren, während die andere Gruppe aus Frauen über 70 Jahren bestand, die keine klassischen Risikofaktoren aufwiesen. Ziel der Arbeit war es hierbei Unterschiede bei chromosomalen Veränderungen in beiden Gruppen zu detektieren. Die so identifizierten Regionen sollen Grundstein für weitere Untersuchungen, beispielsweise der Suche nach neuen Kandidatengen, in Kollektiven mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sein. In beiden Gruppen konnte eine große Anzahl an chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden, welche in Teilen in beiden Gruppen übereinstimmten. Nachdem HPV-positive Tumore auf Grund ihres Einflusses auf Kopienzahlveränderungen ausgeschlossen wurden und die beiden Gruppen anhand ihrer klinischen und pathologischen Daten einander angepasst wurden, konnten

insgesamt drei Regionen detektiert werden, die signifikante Unterschiede der chromosomalen Aberrationen zwischen den beiden Gruppen aufwiesen. Es handelt sich hierbei um Deletionen der Regionen auf den Chromosomen 3p25.3-25.1, 3p21.31-21.1 und 19p12-q12. Diese traten bei den Frauen signifikant seltener auf als bei den Männern. Verluste des kurzen Armes des Chromosoms 3 (3p) zählen zu den häufigsten Veränderungen bei Kopf-Hals-Tumoren; bestimmte Regionen in diesem Bereich konnten des Weiteren mit Tabakkonsum assoziiert werden. In Bezug auf DNA-Verluste auf Chromosom 19 sind Aberrationen in diesem Bereich nicht als häufige Veränderungen bei HNO-Tumoren beschrieben worden. Nachdem in der vorliegenden Arbeit Regionen mit signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen detektiert werden konnten, können diese als Grundlage für weitere Studien, z. B. für die Suche nach Kandidatengen, dienen. Hierbei könnten weitere Gene, die beispielsweise vermehrt bei Tabak- oder Alkoholkonsum betroffen sind, detektiert werden. Da bei den Frauen zwar häufig die typischen chromosomalen Aberrationen für HNSCC aufgetreten sind, diese aber insgesamt in niedrigerer Frequenz, liegt die Vermutung nahe, dass bereits wenige, dafür aber entscheidende Aberrationen, z. B. in wichtigen Tumorsuppressorgenen für die Tumorentstehung ausreichen.

Durch weitere molekularbiologische und genetische Untersuchungen und der Assoziation mit weiteren Daten wie z. B. dem Überleben oder Ansprechen auf Therapien, könnten einerseits die Ursachen und damit die Tumorbilogie besser verstanden werden, andererseits könnte damit eine individualisierte Behandlung in Zukunft erfolgen. Hiervon würden die Patienten im Allgemeinen profitieren, insbesondere aber auch solche, die ein hohes Alter und verschiedene Komorbiditäten aufweisen und somit häufig für eine chirurgische Intervention auf Grund des zu hohen Risikos nicht in Frage kommen.

G Anhang

Anhang 1: TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Wittekind & Meyer, 2010)

<u>Klassifikation</u>	<u>Bedeutung</u>
<u>T-Klassifikation</u> <u>Größe und Ausdehnung des Primärtumors</u>	
T0	Keine Anzeichen für einen Primärtumor
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor größer als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
TX	keine Aussage über den Primärtumor möglich
Tis	Carcinoma in situ
<u>N-Klassifikation</u> <u>Lymphknotenbefall</u>	
N0	keine Lymphknoten befallen
N1	solitärer ipsilateraler LK ≤ 3 cm
N2a	solitärer ipsilateraler LK > 3 cm, aber < 6 cm
N2b	multiple ipsilaterale LK < 6 cm
N2c	bi-/kontralaterale LK < 6 cm
N3	LK > 6 cm
NX	Keine Aussage über Lymphknotenmetastasierung möglich
<u>M-Klassifikation</u> <u>Beurteilung von Fernmetastasen</u>	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
MX	keine Aussage über Fernmetastasierung möglich
<u>G-Klassifikation</u> <u>Differenzierungsgrad des Primärtumors</u>	
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

R-Klassifikation Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors nach chirurgischer Behandlung

R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor
RX	Aussage über das Vorhandensein eines Residualtumors nicht möglich

Stadien-Einteilung

<u>Stadium</u>	<u>Einteilung</u>
Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium III	T1/T2, N1, M0 T3, N0/N1, M0
Stadium IVA	T1/T2/T3, N2, M0 T4a, N0/N1/N2, M0
Stadium IVB	Jedes T, N3, M0 T4b, jedes N, M0
Stadium IVC	Jedes T, jedes N, M1

Anhang 2: 94 Regionen mit DNA-Zugewinnen

Region	Chr	Start	Ende	p-Wert	FDR	Frequenz bei Frauen	Frequenz bei Männern	Frequenz gesamtes Kollektiv
1	1	929301	952720	1,00	1,00	0,323	0,345	0,333
2	1	4577827	24727422	0,56	0,78	0,226	0,310	0,267
3	1	25192460	46487519	0,54	0,78	0,194	0,276	0,233
10	1	145438616	152745269	1,00	1,00	0,194	0,207	0,200
11	1	153689068	155949960	1,00	1,00	0,290	0,310	0,300
12	1	157789502	161623722	0,75	0,83	0,161	0,207	0,183
13	1	161928622	183573415	0,41	0,74	0,065	0,138	0,100
14	1	186684109	196220505	1,00	1,00	0,258	0,276	0,267
15	1	197348617	199509364	0,20	0,74	0,129	0,276	0,200
16	1	200283308	206585659	0,51	0,74	0,129	0,207	0,167
17	1	208546993	238502739	0,10	0,74	0,032	0,172	0,100
18	1	239525809	249064112	0,41	0,74	0,065	0,138	0,100
19	2	235263	1634835	0,78	0,85	0,290	0,241	0,267
25	2	238586881	241972489	0,30	0,74	0,097	0,207	0,150
30	3	47409080	52684410	0,19	0,74	0,161	0,034	0,100
34	3	94611500	122356613	0,35	0,74	0,161	0,276	0,217
35	3	123371748	127117805	0,32	0,74	0,129	0,241	0,183
36	3	128320588	140689764	0,32	0,74	0,129	0,241	0,183
37	3	141596725	192381817	0,06	0,74	0,258	0,517	0,383
38	3	194057113	197493977	0,06	0,74	0,290	0,552	0,417
45	5	2518762	14544450	0,33	0,74	0,129	0,241	0,183
46	5	15139420	45535902	0,46	0,74	0,097	0,172	0,133
53	5	175904373	180580792	0,36	0,74	0,161	0,276	0,217
59	7	94136	2811158	1,00	1,00	0,484	0,517	0,500
60	7	3484225	6267527	1,00	1,00	0,419	0,414	0,417
61	7	7982252	20031564	0,76	0,84	0,194	0,241	0,217

62	7	21208415	52700138	0,46	0,74	0,097	0,172	0,133
63	7	54640630	55229631	0,20	0,74	0,129	0,276	0,200
65	7	72436769	75134470	0,76	0,84	0,226	0,172	0,200
67	7	77126898	78473769	0,43	0,74	0,065	0,138	0,100
68	7	79702216	97264652	0,46	0,74	0,097	0,172	0,133
69	7	98946495	101389774	1,00	1,00	0,290	0,276	0,283
70	7	103163388	127321595	0,46	0,74	0,097	0,172	0,133
73	7	148595274	155295097	0,75	0,83	0,161	0,207	0,183
74	7	155501974	158804231	0,38	0,74	0,194	0,310	0,250
75	8	488653	1624128	0,38	0,74	0,194	0,310	0,250
79	8	38170901	43197654	0,42	0,74	0,065	0,138	0,100
80	8	48525287	62249646	0,40	0,74	0,226	0,345	0,283
81	8	64304418	99147361	0,58	0,79	0,290	0,379	0,333
82	8	101210915	126728859	0,43	0,74	0,323	0,448	0,383
83	8	127495448	128667455	0,28	0,74	0,258	0,414	0,333
84	8	130270790	137725399	0,27	0,74	0,226	0,379	0,300
85	8	139239227	142544371	0,75	0,84	0,194	0,241	0,217
86	8	144333827	146033936	0,78	0,85	0,290	0,345	0,317
87	9	11190	233308	1,00	1,00	0,129	0,103	0,117
88	9	2531111	20183465	0,20	0,74	0,161	0,034	0,100
91	9	33498185	38320163	0,67	0,80	0,129	0,069	0,100
95	9	123812551	126413324	0,33	0,74	0,129	0,241	0,183
96	9	127089109	128193295	0,77	0,84	0,226	0,276	0,250
97	9	129217477	133642444	0,56	0,78	0,226	0,310	0,267
98	9	133852943	140893506	0,18	0,74	0,258	0,448	0,350
105	10	135221600	135222940	0,70	0,81	0,097	0,138	0,117
106	11	189227	2306063	0,57	0,78	0,226	0,310	0,267
111	11	61096318	66955369	0,61	0,80	0,484	0,414	0,450
112	11	67662700	69589482	0,43	0,74	0,323	0,448	0,383
113	11	70629079	70919961	0,39	0,74	0,226	0,345	0,283
114	11	75431286	76397807	0,75	0,83	0,161	0,207	0,183
117	11	100641187	104299413	0,25	0,74	0,065	0,172	0,117
124	12	48284343	53460231	0,74	0,83	0,161	0,207	0,183
125	12	54131859	58000936	0,70	0,81	0,097	0,138	0,117
128	12	120578976	123250202	0,08	0,74	0,387	0,172	0,283
130	12	130604614	132268331	1,00	1,00	0,129	0,138	0,133
131	12	133346391	133599629	1,00	1,00	0,161	0,172	0,167
132	13	20238604	22085693	0,53	0,77	0,161	0,241	0,200
133	13	23210664	25025512	0,66	0,80	0,129	0,069	0,100
137	13	112591157	114909379	0,12	0,74	0,129	0,310	0,217
141	16	72088	2128722	0,13	0,74	0,581	0,379	0,483
142	16	3531439	4502448	0,74	0,83	0,161	0,207	0,183
143	16	5501771	26201004	0,14	0,74	0,065	0,207	0,133
144	16	29644284	31048088	0,21	0,74	0,129	0,276	0,200
145	16	32283770	33637948	0,14	0,74	0,065	0,207	0,133
148	16	66596260	79043072	0,49	0,74	0,129	0,207	0,167
149	16	81013248	86192535	0,17	0,74	0,097	0,241	0,167
150	16	88557223	90024506	0,13	0,74	0,581	0,379	0,483
151	17	856239	7312242	0,75	0,84	0,161	0,207	0,183
152	17	7498754	20172437	0,73	0,83	0,129	0,172	0,150
153	17	25440972	36247617	0,30	0,74	0,097	0,207	0,150
154	17	36712319	43739782	1,00	1,00	0,258	0,241	0,250
155	17	44084882	48817562	1,00	1,00	0,194	0,207	0,200
157	17	55262476	66108804	0,51	0,74	0,129	0,207	0,167
159	17	73552570	80780814	0,59	0,79	0,290	0,379	0,333
166	18	75477059	75808683	0,25	0,74	0,065	0,172	0,117
167	18	76607638	77838436	0,16	0,74	0,194	0,379	0,283
168	19	259784	12767174	0,79	0,87	0,548	0,483	0,517
169	19	13240938	17701434	1,00	1,00	0,581	0,552	0,567
170	19	20667611	32203740	1,00	1,00	0,129	0,103	0,117
171	19	34535824	58911979	1,00	1,00	0,452	0,448	0,450
172	20	328014	4689907	0,07	0,74	0,129	0,345	0,233
173	20	6262827	16641770	0,00	0,26	0,032	0,310	0,167
174	20	17852943	23596240	0,47	0,74	0,097	0,172	0,133
175	20	24989530	59994531	0,33	0,74	0,129	0,241	0,183
176	20	60462266	62922066	0,25	0,74	0,194	0,345	0,267
178	21	43635239	47943440	0,70	0,81	0,097	0,138	0,117

179	22	17242248	51106252	0,20	0,74	0,129	0,276	0,200
-----	----	----------	----------	------	------	-------	-------	-------

Anhang 3: 64 Regionen mit DNA-Verlusten

Region	Chr	Start	Ende	p-Wert	FDR	Frequenz bei Frauen	Frequenz bei Männern	Frequenz gesamtes Kollektiv
1	1	929301	952720	0,73	0,90	0,129	0,172	0,150
2	1	4577827	24727422	1,00	1,00	0,226	0,241	0,233
3	1	25192460	46487519	1,00	1,00	0,194	0,207	0,200
4	1	48230723	50571477	1,00	1,00	0,161	0,172	0,167
5	1	50823002	51884440	1,00	1,00	0,097	0,103	0,100
6	1	53737606	55875826	1,00	1,00	0,161	0,172	0,167
26	3	212817	8895825	0,03	0,17	0,129	0,379	0,250
27	3	9829852	13823746	0,01	0,17	0,097	0,379	0,233
28	3	15654041	41198083	0,03	0,17	0,097	0,345	0,217
29	3	42524397	46015822	0,07	0,22	0,065	0,241	0,150
30	3	47409080	52684410	0,00	0,13	0,032	0,310	0,167
31	3	54033354	58175201	0,03	0,17	0,097	0,345	0,217
32	3	59727302	74152406	0,03	0,17	0,097	0,345	0,217
33	3	77503140	87488189	0,05	0,20	0,097	0,310	0,200
39	4	66628	8103624	0,15	0,40	0,161	0,345	0,250
40	4	10599780	20739814	0,17	0,40	0,097	0,241	0,167
44	4	186414188	190702613	0,02	0,17	0,032	0,241	0,133
52	5	171064773	175208164	0,05	0,20	0,032	0,207	0,117
53	5	175904373	180580792	0,05	0,20	0,032	0,207	0,117
56	6	26195894	29214068	0,68	0,87	0,129	0,069	0,100
57	6	31924988	42780788	0,42	0,71	0,161	0,069	0,117
64	7	56297474	71507839	0,18	0,41	0,258	0,103	0,183
73	7	148595274	155295097	0,42	0,71	0,065	0,138	0,100
74	7	155501974	158804231	1,00	1,00	0,129	0,103	0,117
75	8	488653	1624128	1,00	1,00	0,226	0,207	0,217
76	8	2316227	11765149	1,00	1,00	0,290	0,276	0,283
77	8	14234770	30826090	1,00	1,00	0,226	0,207	0,217
78	8	32411506	37086323	1,00	1,00	0,161	0,138	0,150
79	8	38170901	43197654	1,00	1,00	0,129	0,103	0,117
87	9	11190	233308	0,35	0,70	0,161	0,276	0,217
88	9	2531111	20183465	0,17	0,40	0,097	0,241	0,167
89	9	21167685	23387562	0,53	0,82	0,161	0,241	0,200
90	9	24101721	31579999	0,29	0,62	0,097	0,207	0,150
91	9	33498185	38320163	0,10	0,27	0,032	0,172	0,100
92	9	40514338	69444194	0,78	0,97	0,258	0,310	0,283
93	9	71129855	88731859	0,67	0,87	0,129	0,069	0,100
97	9	129217477	133642444	0,14	0,40	0,065	0,207	0,133
98	9	133852943	140893506	0,56	0,86	0,226	0,310	0,267
99	10	270607	35799788	0,42	0,71	0,065	0,138	0,100
100	10	36933907	68469618	0,68	0,87	0,129	0,069	0,100
101	10	69772091	88065908	0,71	0,87	0,097	0,138	0,117
102	10	89704489	92935820	1,00	1,00	0,129	0,103	0,117
103	10	93749564	104663470	0,70	0,87	0,097	0,138	0,117
112	11	67662700	69589482	0,50	0,82	0,129	0,207	0,167
113	11	70629079	70919961	0,53	0,82	0,161	0,241	0,200
114	11	75431286	76397807	0,46	0,77	0,097	0,172	0,133
116	11	83344399	100108958	0,41	0,71	0,065	0,138	0,100
117	11	100641187	104299413	0,71	0,87	0,097	0,138	0,117

118	11	105445897	108722050	1,00	1,00	0,161	0,172	0,167
119	11	110847894	114236228	0,38	0,71	0,323	0,207	0,267
120	11	115319527	123760895	0,79	0,97	0,355	0,310	0,333
121	11	124983596	134479818	0,79	0,97	0,387	0,345	0,367
139	14	93495784	107106019	1,00	1,00	0,161	0,138	0,150
145	16	32283770	33637948	0,26	0,60	0,194	0,069	0,133
146	16	46510743	55869021	1,00	1,00	0,194	0,172	0,183
152	17	7498754	20172437	1,00	1,00	0,097	0,103	0,100
163	18	34082238	49021879	0,42	0,71	0,065	0,138	0,100
165	18	70659486	74138642	0,71	0,87	0,097	0,138	0,117
166	18	75477059	75808683	0,71	0,87	0,097	0,138	0,117
167	18	76607638	77838436	0,71	0,87	0,097	0,138	0,117
168	19	259784	12767174	0,03	0,17	0,032	0,241	0,133
169	19	13240938	17701434	0,05	0,20	0,032	0,207	0,117
170	19	20667611	32203740	0,25	0,58	0,194	0,345	0,267
171	19	34535824	58911979	0,10	0,31	0,032	0,172	0,100

H Literatur

- Andre, K., Schraub, S., Mercier, M., & Bontemps, P. (1995). Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, *31B*(5), 301-309.
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & 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
- Ang, K. K., & Sturgis, E. M. (2012). Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol*, *22*(2), 128-142. doi: 10.1016/j.semradonc.2011.12.004
- Applebaum, K. M., Furniss, C. S., Zeka, A., Posner, M. R., Smith, J. F., Bryan, J., Eisen, E. A., Peters, E. S., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2007). Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, *99*(23), 1801-1810. doi: 10.1093/jnci/djm233
- Barrett, M. T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P. S., Yakhini, Z., Bruhn, L., & Laderman, S. (2004). Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(51), 17765-17770. doi: 10.1073/pnas.0407979101
- Bejjani, B. A., & Shaffer, L. G. (2006). Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J Mol Diagn*, *8*(5), 528-533. doi: 10.2353/jmoldx.2006.060029
- Benjamini Y, & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* *57*, 289-300.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, *354*(6), 567-578. doi: 10.1056/NEJMoa053422
- Borkosky, S. S., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Beder, L. B., Gunduz, E., Ali, M. A., Rodriguez, A. P., Cilek, M. Z., Tominaga, S., Yamanaka, N., Shimizu, K., & Nagai, N. (2009). Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, *135*(5), 703-713. doi: 10.1007/s00432-008-0507-y
- Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., & Brakenhoff, R. H. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*, *63*(8), 1727-1730.
- Burian, M., Selzer, E., & Kornek, G.V. (2002). Fortschritte in der Behandlung von HNO-Tumoren. *Onkologie*, *25*, 26-30.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., & Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, *56*(11), 2488-2492.
- Cancer Genome Atlas, Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, *517*(7536), 576-582. doi: 10.1038/nature14129

- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., Rosenberg, P. S., Bray, F., & Gillison, M. L. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*, *31*(36), 4550-4559. doi: 10.1200/JCO.2013.50.3870
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, *29*(32), 4294-4301. doi: 10.1200/JCO.2011.36.4596
- Chipron GmbH. *Chipron HPV^{Type} 3.5 LCD-Array Kit*. Berlin: Chipron GmbH.
- Choi, P., & Chen, C. (2005). Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, *104*(6), 1113-1128. doi: 10.1002/cncr.21293
- Coe, B. P., Ylstra, B., Carvalho, B., Meijer, G. A., Macaulay, C., & Lam, W. L. (2007). Resolving the resolution of array CGH. *Genomics*, *89*(5), 647-653. doi: 10.1016/j.ygeno.2006.12.012
- Cummings, K. M., & Proctor, R. N. (2014). The changing public image of smoking in the United States: 1964-2014. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *23*(1), 32-36. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0798
- D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, *356*(19), 1944-1956. doi: 10.1056/NEJMoa065497
- Dassonville, O., Formento, J. L., Francoual, M., Ramaioli, A., Santini, J., Schneider, M., Demard, F., & Milano, G. (1993). Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol*, *11*(10), 1873-1878.
- de Ravel, T. J., Devriendt, K., Fryns, J. P., & Vermeesch, J. R. (2007). What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr*, *166*(7), 637-643. doi: 10.1007/s00431-007-0463-6
- Dimery, I. W., & Hong, W. K. (1993). Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, *85*(2), 95-111.
- Durkin, S. G., & Glover, T. W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*, *41*, 169-192. doi: 10.1146/annurev.genet.41.042007.165900
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, *21*(35), 5400-5413. doi: 10.1038/sj.onc.1205651
- Eich, H. T., Loschcke, M., Scheer, M., Kocher, M., Bongartz, R., Wacker, S., Zoller, J. E., & Muller, R. P. (2008). Neoadjuvant radiochemotherapy and radical resection for advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity. Outcome of 134 patients. *Strahlenther Onkol*, *184*(1), 23-29. doi: 10.1007/s00066-008-1725-6
- El-Husseiny, G., Kandil, A., Jamshed, A., Khafaga, Y., Saleem, M., Allam, A., Al-Rajhi, N., Al-Amro, A., Rostom, A. Y., Abuzeid, M., Otieschan, A., & Flores, A. D. (2000). Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg*, *38*(3), 193-199. doi: 10.1054/bjom.1999.0235
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., & 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
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide:

- sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210
- Ferrer, I., Armstrong, J., Capellari, S., Parchi, P., Arzberger, T., Bell, J., Budka, H., Strobel, T., Giaccone, G., Rossi, G., Bogdanovic, N., Fakai, P., Schmitt, A., Riederers, P., Al-Sarraj, S., Ravid, R., & Kretzschmar, H. (2007). Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol*, 17(3), 297-303. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00073.x
- Fiegler, H., Carr, P., Douglas, E. J., Burford, D. C., Hunt, S., Scott, C. E., Smith, J., Vetrie, D., Gorman, P., Tomlinson, I. P., & Carter, N. P. (2003). DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer*, 36(4), 361-374. doi: 10.1002/gcc.10155
- Fiegler, H., Redon, R., & Carter, N. P. (2007). Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat Protoc*, 2(3), 577-587. doi: 10.1038/nprot.2007.53
- Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., & Sidransky, D. (2001). Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 345(26), 1890-1900. doi: 10.1056/NEJMra001375
- Franceschi, S., Bidoli, E., Herrero, R., & Munoz, N. (2000). Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol*, 36(1), 106-115.
- Georges, P., Rajagopalan, K., Leon, C., Singh, P., Ahmad, N., Nader, K., & Kubicek, G. J. (2014). Chemotherapy advances in locally advanced head and neck cancer. *World J Clin Oncol*, 5(5), 966-972. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.966
- Gillison, M. L. (2007). Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck*, 29(8), 779-792. doi: 10.1002/hed.20573
- Gollin, S. M. (2014). Cytogenetic alterations and their molecular genetic correlates in head and neck squamous cell carcinoma: a next generation window to the biology of disease. *Genes Chromosomes Cancer*, 53(12), 972-990. doi: 10.1002/gcc.22214
- Gronbaek, K., Hother, C., & Jones, P. A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS*, 115(10), 1039-1059. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_636.xml.x
- Gronhoj Larsen, C., Gyldenlove, M., Jensen, D. H., Therkildsen, M. H., Kiss, K., Norrild, B., Konge, L., & von Buchwald, C. (2014). Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer*, 110(6), 1587-1594. doi: 10.1038/bjc.2014.42
- Ha, P. K., & Califano, J. A. (2003). The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14(5), 363-369.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z. F., Berthiller, J., & Boffetta, P. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*, 99(10), 777-789. doi: 10.1093/jnci/djk179
- Hayes, D. N., Van Waes, C., & Seiwert, T. Y. (2015). Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *J Clin Oncol*, 33(29), 3227-3234. doi: 10.1200/JCO.2015.62.1086
- Hermesen, M., Snijders, A., Guervos, M. A., Taenzer, S., Koerner, U., Baak, J., Pinkel, D., Albertson, D., van Diest, P., Meijer, G., & Schrock, E. (2005). Centromeric

- chromosomal translocations show tissue-specific differences between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Oncogene*, 24(9), 1571-1579. doi: 10.1038/sj.onc.1208294
- Hoang, T., Huang, S., Armstrong, E., Eickhoff, J. C., & Harari, P. M. (2012). Enhancement of radiation response with bevacizumab. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 37. doi: 10.1186/1756-9966-31-37
- Hong, A. M., Grulich, A. E., Jones, D., Lee, C. S., Garland, S. M., Dobbins, T. A., Clark, J. R., Harnett, G. B., Milross, C. G., O'Brien, C. J., & Rose, B. R. (2010). Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine*, 28(19), 3269-3272. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.098
- Huang, S. H., O'Sullivan, B., Waldron, J., Lockwood, G., Bayley, A., Kim, J., Cummings, B., Dawson, L. A., Hope, A., Cho, J., Witterick, I., Chen, E. X., & Ringash, J. (2011). Patterns of care in elderly head-and-neck cancer radiation oncology patients: a single-center cohort study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 79(1), 46-51. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.10.052
- Inazawa, J., Inoue, J., & Imoto, I. (2004). Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci*, 95(7), 559-563.
- Ishii, H., Wang, Y., & Huebner, K. (2007). A Fhit-ing role in the DNA damage checkpoint response. *Cell Cycle*, 6(9), 1044-1048.
- Johannsdottir, H. K., Jonsson, G., Johannesdottir, G., Agnarsson, B. A., Eerola, H., Arason, A., Heikkila, P., Egilsson, V., Olsson, H., Johannsson, O. T., Nevanlinna, H., Borg, A., & Barkardottir, R. B. (2006). Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors. *Int J Cancer*, 119(5), 1052-1060. doi: 10.1002/ijc.21934
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083), 818-821.
- Kessler, P., Grabenbauer, G., Leher, A., Bloch-Birkholz, A., Vairaktaris, E., & Neukam, F. W. (2008). Neoadjuvant and adjuvant therapy in patients with oral squamous cell carcinoma Long-term survival in a prospective, non-randomized study. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 46(1), 1-5. doi: 10.1016/j.bjoms.2007.08.006
- Kessler, P., Grabenbauer, G., Leher, A., Bloch-Birkholz, A., Vairaktaris, E., Neukam, F. W., & Sauer, R. (2007). [Five year survival of patients with primary oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study]. *Strahlenther Onkol*, 183(4), 184-189. doi: 10.1007/s00066-007-1469-8
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D., & et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253(5020), 661-665.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hamilton, S. R., Hedge, P., Markham, A., & et al. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*, 251(4999), 1366-1370.
- Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., Dallenbach-Hellweg, G., Schmidt, D., & von Knebel Doeberitz, M. (2001). Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, 92(2), 276-284.
- Klein, J. D., & Grandis, J. R. (2010). The molecular pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biol Ther*, 9(1), 1-7.

- Koch, W. M., Lango, M., Sewell, D., Zahurak, M., & Sidransky, D. (1999). Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope*, *109*(10), 1544-1551. doi: 10.1097/00005537-199910000-00002
- Kruse, A. L., Bredell, M., Luebbbers, H. T., & Gratz, K. W. (2010). Head and neck cancer in the elderly: a retrospective study over 10 years (1999 - 2008). *Head Neck Oncol*, *2*, 25. doi: 10.1186/1758-3284-2-25
- 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
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(1), 9-22. doi: 10.1038/nrc2982
- Liu, C. J., Lin, S. C., Chen, Y. J., Chang, K. M., & Chang, K. W. (2006). Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog*, *45*(10), 721-731. doi: 10.1002/mc.20213
- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., & Murray, C. J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, *367*(9524), 1747-1757. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68770-9
- Manduchi, E., Grant, G. R., McKenzie, S. E., Overton, G. C., Surrey, S., & Stoeckert, C. J., Jr. (2000). Generation of patterns from gene expression data by assigning confidence to differentially expressed genes. *Bioinformatics*, *16*(8), 685-698.
- Mao, E. J., Schwartz, S. M., Daling, J. R., & Beckmann, A. M. (1998). Loss of heterozygosity at 5q21-22 (adenomatous polyposis coli gene region) in oral squamous cell carcinoma is common and correlated with advanced disease. *J Oral Pathol Med*, *27*(7), 297-302.
- Mehanna, H., Jones, T. M., Gregoire, V., & Ang, K. K. (2010). Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus. *BMJ*, *340*, c1439. doi: 10.1136/bmj.c1439
- Mendes-da-Silva, P., Moreira, A., Duro-da-Costa, J., Matias, D., & Monteiro, C. (2000). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. *Mol Pathol*, *53*(4), 184-187.
- Merlo, L. M., Shah, N. A., Li, X., Blount, P. L., Vaughan, T. L., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2010). A comprehensive survey of clonal diversity measures in Barrett's esophagus as biomarkers of progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*, *3*(11), 1388-1397. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0108
- Mohr, C., Bohndorf, W., Carstens, J., Harle, F., Hausamen, J. E., Hirche, H., Kimmig, H., Kutzner, J., Muhling, J., Reuther, J., & et al. (1994). Preoperative radiochemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone. A prospective, multicentric, randomized DOSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx (a 3-year follow-up). *Int J Oral Maxillofac Surg*, *23*(3), 140-148.
- Muir, C. S., Fraumeni, J. F., Jr., & Doll, R. (1994). The interpretation of time trends. *Cancer Surv*, *19-20*, 5-21.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowol, K., & Harris, C. C. (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(17), 9671-9676. doi: 10.1073/pnas.161151798
- Nakamura, E., Kozaki, K., Tsuda, H., Suzuki, E., Pimkhaokham, A., Yamamoto, G., Irie, T., Tachikawa, T., Amagasa, T., Inazawa, J., & Imoto, I. (2008). Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral

- squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99(7), 1390-1400. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00838.x
- Nakaya, K., Yamagata, H. D., Arita, N., Nakashiro, K. I., Nose, M., Miki, T., & Hamakawa, H. (2007). Identification of homozygous deletions of tumor suppressor gene FAT in oral cancer using CGH-array. *Oncogene*, 26(36), 5300-5308. doi: 10.1038/sj.onc.1210330
- Nasman, A., Attner, P., Hammarstedt, L., Du, J., Eriksson, M., Giraud, G., Ahrlund-Richter, S., Marklund, L., Romanitan, M., Lindquist, D., Ramqvist, T., Lindholm, J., Sparen, P., Ye, W., Dahlstrand, H., Munck-Wikland, E., & Dalianis, T. (2009). Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 125(2), 362-366. doi: 10.1002/ijc.24339
- Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsague, X., Laporte, L., Bosch, F. X., de Sanjose, S., & Trottier, H. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 15(12), 1319-1331. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70471-1
- Neuvial, P., Hupe, P., Brito, I., Liva, S., Manie, E., Brennetot, C., Radvanyi, F., Aurias, A., & Barillot, E. (2006). Spatial normalization of array-CGH data. *BMC Bioinformatics*, 7, 264. doi: 10.1186/1471-2105-7-264
- Nyflot, M. J., Kruser, T. J., Traynor, A. M., Khuntia, D., Yang, D. T., Hartig, G. K., McCulloch, T. M., Wiederholt, P. A., Gentry, L. R., Hoang, T., Jeraj, R., & Harari, P. M. (2015). Phase 1 trial of bevacizumab with concurrent chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck with exploratory functional imaging of tumor hypoxia, proliferation, and perfusion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 91(5), 942-951. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.11.029
- Olsen, J., Sabroe, S., & Ipsen, J. (1985). Effect of combined alcohol and tobacco exposure on risk of cancer of the hypopharynx. *J Epidemiol Community Health*, 39(4), 304-307.
- Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R., & Wigler, M. (2004). Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*, 5(4), 557-572. doi: 10.1093/biostatistics/kxh008
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-298.
- Patmore, H. S., Cawkwell, L., Stafford, N. D., & Greenman, J. (2005). Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Ann Surg Oncol*, 12(10), 831-842. doi: 10.1245/ASO.2005.09.017
- Pedoux, R., Sengupta, S., Shen, J. C., Demidov, O. N., Saito, S., Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S. H., McMenamin, M., Nagashima, M., Grossman, S. R., Appella, E., & Harris, C. C. (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol*, 25(15), 6639-6648. doi: 10.1128/MCB.25.15.6639-6648.2005
- Petersen, I., Schwendel, A., Bockmuhl, U., & Dietel, M. (1996). [Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis]. *Pathologe*, 17(5), 333-341.
- Pezzuto, F., Buonaguro, L., Caponigro, F., Ionna, F., Starita, N., Annunziata, C., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2015). Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. *Oncology*, 89(3), 125-136. doi: 10.1159/000381717

- Pinkel, D., Se Graves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W., & Albertson, D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, *20*(2), 207-211. doi: 10.1038/2524
- Pinkel, D., & Albertson, D. G. (2005). Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *6*, 331-354. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162140
- Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, *83*(1), 18-29.
- Posner, M. R., Lorch, J. H., Goloubeva, O., Tan, M., Schumaker, L. M., Sarlis, N. J., Haddad, R. I., & Cullen, K. J. (2011). Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol*, *22*(5), 1071-1077. doi: 10.1093/annonc/mdr006
- Premoli-De-Percoco, G., Ramirez, J. L., & Galindo, I. (1998). Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology: An in situ hybridization study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *86*(1), 77-81.
- Pritzkuleit, R., Beske, F., & Katalinic, A. (2010). [Demographic change and cancer]. *Onkologie*, *33 Suppl 7*, 19-24. doi: 10.1159/000319738
- Pytynia, K. B., Dahlstrom, K. R., & Sturgis, E. M. (2014). Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, *50*(5), 380-386. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.019
- Ragin, C. C., Modugno, F., & Gollin, S. M. (2007). The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*, *86*(2), 104-114.
- Reiche, D. (2003). *Roche Lexikon Medizin* (5. Auflage). München: Urban & Fischer Verlag.
- Rettig, E., Kiess, A. P., & Fakhry, C. (2015). The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, *15*(1), 35-49. doi: 10.1586/14737140.2015.957189
- Ribeiro, I. P., Marques, F., Caramelo, F., Pereira, J., Patricio, M., Prazeres, H., Ferrao, J., Juliao, M. J., Castelo-Branco, M., de Melo, J. B., Baptista, I. P., & Carreira, I. M. (2014). Genetic gains and losses in oral squamous cell carcinoma: impact on clinical management. *Cell Oncol (Dordr)*, *37*(1), 29-39. doi: 10.1007/s13402-013-0161-5
- Riede, U.-N., Werner, M., & Freudenberg, N. (2009). *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie mit 76 Tabellen und 47 authentischen Fällen*. Heidelberg: Springer.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012* (10. Ausgabe). Berlin: BGZ Druckzentrum GmbH.
- Robbins, K. T., Clayman, G., Levine, P. A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., Som, P., Wolf, G. T., American Head and Neck Society, American Academy of Otolaryngology-Head & Neck Surgery. (2002). Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, *128*(7), 751-758.
- Saldivar, J. C., Bene, J., Hosseini, S. A., Miuma, S., Horton, S., Heerema, N. A., & Huebner, K. (2013). Characterization of the role of Fhit in suppression of DNA damage. *Adv Biol Regul*, *53*(1), 77-85. doi: 10.1016/j.jbior.2012.10.003
- Schock GF, N., Lubenow, H., Löffert, D., & Korfhage, C. (2005). Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. *Biospektrum* *6*, 781-782.

- Scholes, A. G., Woolgar, J. A., Boyle, M. A., Brown, J. S., Vaughan, E. D., Hart, C. A., Jones, A. S., & Field, J. K. (1998). Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin? *Cancer Res*, *58*(9), 2003-2006.
- Simard, E. P., Torre, L. A., & Jemal, A. (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*, *50*(5), 387-403. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.01.016
- Singh, B., Gogineni, S., Goberdhan, A., Sacks, P., Shaha, A., Shah, J., & Rao, P. (2001). Spectral karyotyping analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, *111*(9), 1545-1550. doi: 10.1097/00005537-200109000-00010
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, *6*(5), 963-968.
- Stein, C. K., Glover, T. W., Palmer, J. L., & Glisson, B. S. (2002). Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer*, *34*(3), 333-340. doi: 10.1002/gcc.10061
- Syrigos, K. N., Karachalios, D., Karapanagiotou, E. M., Nutting, C. M., Manolopoulos, L., & Harrington, K. J. (2009). Head and neck cancer in the elderly: an overview on the treatment modalities. *Cancer Treat Rev*, *35*(3), 237-245. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.11.002
- Syrjanen, K., Syrjanen, S., & Pyrhonen, S. (1982). Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, *44*(6), 323-334.
- Syrjanen, K., Vayrynen, M., Castren, O., Mantyjarvi, R., Pyrhonen, S., & Yliskoski, M. (1983). Morphological and immunohistochemical evidence of human papilloma virus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine cervix. *Int J Gynaecol Obstet*, *21*(4), 261-269.
- Syrjanen, S. (2004). HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*, *57*(5), 449-455.
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., Ruijter-Schippers, H. J., Van Der Wal, J. E., Snow, G. B., Leemans, C. R., & Braakhuis, B. J. (2002). Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol*, *161*(3), 1051-1060. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64266-6
- Tachezy, R., Klozar, J., Salakova, M., Smith, E., Turek, L., Betka, J., Kodet, R., & Hamsikova, E. (2005). HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis*, *11*(3), 181-185. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01112.x
- Thun, M., Peto, R., Boreham, J., & Lopez, A. D. (2012). Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tob Control*, *21*(2), 96-101. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2011-050294
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, *65*(2), 87-108. doi: 10.3322/caac.21262
- Tribius, S., Ihloff, A. S., Rieckmann, T., Petersen, C., & Hoffmann, M. (2011). Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Lett*, *304*(2), 71-79. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.002
- van Beers, E. H., Joosse, S. A., Ligtenberg, M. J., Fles, R., Hogervorst, F. B., Verhoef, S., & Nederlof, P. M. (2006). A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer*, *94*(2), 333-337. doi: 10.1038/sj.bjc.6602889
- van de Wiel, M. A., Kim, K. I., Vosse, S. J., van Wieringen, W. N., Wilting, S. M., & Ylstra, B. (2007). CGHcall: calling aberrations for array CGH tumor profiles. *Bioinformatics*, *23*(7), 892-894. doi: 10.1093/bioinformatics/btm030

- van de Wiel, M. A., Smeets, S. J., Brakenhoff, R. H., & Ylstra, B. (2005). CGHMultiArray: exact P-values for multi-array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics*, *21*(14), 3193-3194. doi: 10.1093/bioinformatics/bti489
- van de Wiel, M. A., & Wieringen, W. N. (2007). CGHregions: dimension reduction for array CGH data with minimal information loss. *Cancer Inform*, *3*, 55-63.
- van den Brule, A. J., Pol, R., Franssen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., & Snijders, P. J. (2002). GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*, *40*(3), 779-787.
- Vassilakopoulou, M., Psyrri, A., & Argiris, A. (2015). Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol*, *51*(5), 409-415. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.01.006
- Vishak, S., Rangarajan, B., & Kekatpure, V. D. (2015). Neoadjuvant chemotherapy in oral cancers: Selecting the right patients. *Indian J Med Paediatr Oncol*, *36*(3), 148-153. doi: 10.4103/0971-5851.166716
- Wang, Y., Wang, J., & Li, G. (2006). Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett*, *580*(16), 3787-3793. doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.065
- Welsch, U., Sobotta, J., & Deller, T. (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Auflage). München: Elsevier.
- Wen, C. P., Tsai, M. K., Chung, W. S., Hsu, H. L., Chang, Y. C., Chan, H. T., Chiang, P. H., Cheng, T. Y., & Tsai, S. P. (2010). Cancer risks from betel quid chewing beyond oral cancer: a multiple-site carcinogen when acting with smoking. *Cancer Causes Control*, *21*(9), 1427-1435. doi: 10.1007/s10552-010-9570-1
- Westra, W. H. (2009). The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol*, *3*(1), 78-81. doi: 10.1007/s12105-009-0100-y
- Wittekind, C. (Hrsg.) & Meyer, H.-J. (Hrsg.). (2010). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren* (7. Auflage). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Wolff, K.-D., Bootz, F., Beck, J., Bikowski, K., Böhme, P., Budach, W., Burkhardt, A., Danker, H., Eberhardt, W., Engers, K., Fietkau, R., Frerich, B., Gauler, T., Germann, G., Gittler-Hebestreit, N., Grötz, K., Horch, R., Ihrler, S., Keilholz, U., Lell, M., Lübke, A., Mantey, W., Nusser-Müller-Busch, R., Pistner, H., Paradies, K., Reichert, T., Reinert, S., Schliephake, H., Schmitter, M., Singer, S., Westhofen, M., Wirz, S., & Wittlinger, M. (2012). Mundhöhlenkarzinom „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“. S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom. Berlin: Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e. V.
- Worsham, M. J., Chen, K. M., Meduri, V., Nygren, A. O., Errami, A., Schouten, J. P., & Benninger, M. S. (2006). Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, *132*(6), 668-677. doi: 10.1001/archotol.132.6.668
- Xia, W., Lau, Y. K., Zhang, H. Z., Xiao, F. Y., Johnston, D. A., Liu, A. R., Li, L., Katz, R. L., & Hung, M. C. (1999). Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res*, *5*(12), 4164-4174.
- Yap, Y. Y., Hassan, S., Chan, M., Choo, P. K., & Ravichandran, M. (2007). Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *136*(6), 986-991. doi: 10.1016/j.otohns.2006.11.027

Zang, J., Li, C., Zhao, L. N., Shi, M., Zhou, Y. C., Wang, J. H., & Li, X. (2013). Prognostic value of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer: A meta-analysis. *Head Neck*, 35(10), 1507-1514. doi: 10.1002/hed.23156

Danksagung

Die vorliegende Dissertation der Technischen Universität München wurde an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Klinikum rechts der Isar unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. M. Kesting sowie in der Abteilung für Strahlenzytogenetik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Zitzelsberger am Helmholtzzentrum München durchgeführt.

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. M. Kesting für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit, die großartige Unterstützung und die geduldige Bereitschaft auftretende Fragen und Probleme immer schnellstmöglich zu beantworten und zu lösen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. V. Zangen, Frau Dr. J. Heß und Herrn Prof. Dr. H. Zitzelsberger für die umfangreiche, sehr geduldige Betreuung sowie die großartige Unterstützung und den fachlichen Rat während der Versuche am Helmholtzzentrum sowie der fortwährenden Unterstützung auch im Anschluss daran.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. E. Drecoll vom Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar für die immer schnelle und prompte Bereitstellung der Paraffinblöcke.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. A. Walch, Frau U. Buchholz und Frau C.-M. Pflüger für ihre großartige Unterstützung bei der Anfertigung und Analyse der HE-Schnitte sowie der Tumorschnitte.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zytogenetik für das sehr gute Arbeitsklima und die sehr herzliche Aufnahme bedanken. Ein außerordentlicher Dank geht hierbei insbesondere an Frau E. Konhäuser, Frau C. Innerlohinger, Frau L. Schneider und Herrn A. Selmeier die mich so tatkräftig bei den zahlreichen Experimenten unterstützt haben. Ein großes Dankeschön geht an dieser Stelle auch an Herrn H. Braselmann für seine unverzichtbare Hilfe und Unterstützung bei den statistischen Fragestellungen meiner Arbeit.

Aus tiefstem Herzen möchte ich meinen größten Dank meinen Eltern aussprechen, die mich nicht nur während der gesamten Promotion so tatkräftig unterstützt, sondern dies auch mein ganzes Leben während der Schulzeit, des Studiums und darüber hinaus ohne Unterlass, allen Widrigkeiten und Problemen zum Trotz unternommen haben. Ihr habt mir immer mit euren Ratschlägen, Taten und in vielen Teestunden auf eine Art und Weise geholfen, die ich mir nicht besser hätte wünschen können und die man, wenn man ehrlich ist, nicht in Worte fassen kann. Diese Promotionsarbeit ist ausschließlich euch gewidmet und soll ein Zeichen für unsere immerwährende, besondere Verbundenheit sein.

Curriculum vitae

Robin Martin Satanovskij

* 17.01.1987 in München

Schulbildung

09/1997 – 06/2006 Carl-Orff-Gymnasium in Unterschleißheim
06/2006 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2006 – 10/2008 Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an LMU/TUM
10/2008 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2008 – 10/2012 Klinischer Ausbildungsabschnitt an TUM
10/2012 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

05/2010 – 05/2016 Promotion in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (Leitung: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus Dietrich Wolff)

Beruflicher Werdegang

02/2013 – dato Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Nephrologie, Klinikum rechts der Isar (Leitung: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Heemann)
02/2015 – 07/2015 Rotation ins Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar München (Leitung: Prof. Dr. T. Meitinger)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung bzw. Fakultät

Medizin

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Vergleich von DNA Kopienzahlveränderungen in
 ovalen Plattenepithelkarzinomen in Bezug auf das Vorliegen
 in typischer Risikofaktoren
 in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
 Gesichtschirurgie (Lehrstuhl bzw. Fachgebiet oder Klinik)

unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Marco Kesting

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2
 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und
 Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden
 Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
- Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen
 Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- Die vollständige Dissertation wurde in
 veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung
 hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad **noch nicht** erworben und bin **nicht** in einem
 früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- Ich habe bereits am
 bei der Fakultät für
 der Hochschule
 unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema
 die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die
 Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis
 genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

- einverstanden
 nicht einverstanden

München, den 15.08.2016

Robin Scharnberg
 Unterschrift