



Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar

Der Einfluss von HPV und ALDH1 auf das krankheitsspezifische Überleben des oralen Plattenepithelkarzinoms

Dr. med. dent. Carolin Götz

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. Andreas Kolk
2. Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 21.02.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.10.2019 angenommen.

In memoriam  
an meinen Vater

*„Nothing but the best is good enough in the treatment of cancer.“*

*SIR PETER MACCALLUM*

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden veröffentlicht in:

Götz C, Drecoll E, Straub M, Bissinger O, Wolff KD, Kolk A.  
Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma, *Oncotarget*. 2016 Nov  
22;7(47):76704-76712. doi: 10.18632/oncotarget.12501.  
PMID: 27732948  
Online abrufbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363542/>

Götz C, Bissinger O, Nobis C, Wolff KD, Drecoll E, Kolk A.  
ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC. *Biomedical  
Reports*. br 9: 284-290, 2018.  
PMID: 30233780  
Online abrufbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6142035/>

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 PLATTENEPITHELKARZINOME DER SCHLEIMHAUT DER KOPF-HALS-REGION UND IHRE ÄTIOLOGIE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 THERAPIEOPTIONEN BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 DIE ROLLE DER TNM KLASSIFIKATION BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 DIE „HALLMARKS OF CANCER“ UND IHRE BEDEUTUNG BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 DIE THEORIE DER TUMORSTAMMZELLEN UND IHR EINFLUSS BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6 DIE ALDEHYDDEHYDROGENASE I ALS TUMORSTAMMZELLMARKER BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 HUMANE PAPILLOMAVIREN UND IHRE BEDEUTUNG BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM</b> .....	<b>11</b>
<b>1.8 DETEKTIONSVERFAHREN DER HUMANEN PAPILLOMAVIREN</b> .....	<b>12</b>
<b>1.9 DER HUMANE PAPILLOMAVIREN ASSOZIIERTE SURROGATMARKER P16<sup>INK4A</sup></b> ...	<b>13</b>
<b>1.10 ZIELSETZUNG DER PROMOTION</b> .....	<b>14</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 STUDIENDESIGN DER PUBLIZIERTEN ARBEIT „IMPACT OF HPV INFECTION ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA“</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.1 STUDIENKOHORTE</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.2 TISSUE-MICROARRAY KONSTRUKTION</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.3 IMMUNHISTOCHEMIE VON P16<sup>INK4A</sup></b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.4 DNA-NACHWEIS</b> .....	<b>17</b>

<b><u>2.1.5 ERKENNUNG DER HPV-SUBTYPEN.....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>2.1.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>2.2. STUDIENDESIGN DER PUBLIZIERTEN ARBEIT „ALDH1 AS A PROGNOSTIC MARKER FOR LYMPH NODE METASTASIS IN OSCC“ .....</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b><u>2.2.1 STUDIENKOHORTE.....</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b><u>2.2.2 TISSUE-MICROARRAY KONSTRUKTION .....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>2.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE VON P16<sup>INK4A</sup> UND ALDH1 .....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>2.2.4 DIE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG VON ALDH1 UND P16<sup>INK4A</sup> .....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>2.2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>3.1 HERVORHEBUNG DER INDIVIDUELLEN LEISTUNGSBEITRÄGE DER KANDIDATIN UND ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG „IMPACT OF HPV INFECTION ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA“ .....</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b><u>3.1.1 HERVORHEBUNG DER INDIVIDUELLEN LEISTUNGSBEITRÄGE DER KANDIDATIN .....</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b><u>3.1.2 ZUSAMMENFASSUNG „IMPACT OF HPV INFECTION ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA“ .....</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>3.2 HERVORHEBUNG DER INDIVIDUELLEN LEISTUNGSBEITRÄGE DER KANDIDATIN UND ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG „ALDH1 AS A PROGNOSTIC MARKER FOR LYMPH NODE METASTASIS IN OSCC“ .....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>3.2.1 HERVORHEBUNG DER INDIVIDUELLEN LEISTUNGSBEITRÄGE DER KANDIDATIN .....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>3.2.2 ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG „ALDH1 AS A PROGNOSTIC MARKER FOR LYMPH NODE METASTASIS IN OSCC“ .....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>4. DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b><u>7.ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>8.DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>42</u></b>

## Abkürzungen

Plattenepithelkarzinom	PECA
Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region	HNSCC
Krankheitsspezifische Überlebensrate	DSS
Orales PECA	OSCC
Oropharyngeales PECA	OPSCC
Laryngeales PECA	LSSC
Nasopharyngeales PECA	NPSCC
Tonsillenkarzinom	TSCC
Humane Papillomaviren	HPV
Epstein-Barr-Virus	EBV
Programmed Cell Death Ligand 1	PD-L1
Tumor	T
Nodus	N
Metastase	M
Extrazelluläre Matrix	EZM
Tumorstammzellen	CSC
CSC-Marker	CSCM
Epitheliale-Mesenchymale Transition	EMT
Epidermal growth factor receptor	EGFR
Aldehyddehydrogenase 1	ALDH1
Real-Time Polymerase Chain Reaction	RT-PCR
Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet	FFPE
Extrakapsuläres Wachstum	ECE
Tissue-Microarray	TMA
Tris-Puffer-Lösung	TBS
Raumtemperatur	RT
Polymerase-Ketten-Reaktion	PCR
Standard deviation	sd
Konfidenzintervall	CI
Durchschnittliches Gesamtüberleben	OS
Rezidivfreies Überleben	RFS
Union for International Cancer Control	UICC

## 1 Einleitung

In der Kopf-Hals-Region findet sich bei 89% der malignen Tumore die histopathologische Differenzierung eines Plattenepithelkarzinoms (PECA) (Porter

2009). PECA der Kopf-Hals-Region (HNSCC) sind eine der häufigsten Krebserkrankungen und stehen weltweit bei Männern in der Rangfolge der Krebshäufigkeit an sechster Stelle und bei Frauen an elfter Stelle (Jemal, Siegel et al. 2009, Gotz, Drecoll et al. 2016). In Deutschland nimmt die Diagnose HNSCC bei Männern Platz sieben und bei Frauen Platz fünfzehn ein (Koch-Institut 2016). In den letzten Jahrzehnten gelang es durch anatomische Rekonstruktionen mittels mikrovaskulären Transplantaten und einem etablierten Tumornachsorgekonzept die langfristige Lebensqualität der Patienten mit der Diagnose HNSCC zu verbessern (Wolff, Follmann et al. 2012, Bissinger, Rau et al. 2017). Trotz dieser Fortschritte sind die krankheitsspezifischen Überlebensraten (DSS) für HNSCC stagnierend (Gotz, Drecoll et al. 2016). Lokalrezidive, Lymphknotenrezidive und lokoregionäre Zweitkarzinome treten zu 80% innerhalb der ersten zwei Jahre nach der primären Diagnose auf und die 5-Jahres-Überlebensrate von fortgeschrittenen HNSCC liegt bei etwa 30% (Shin and Khuri 2013).

## **1.1 Plattenepithelkarzinome der Schleimhaut der Kopf-Hals-Region und ihre Ätiologie**

Der Begriff HNSCC wird häufig zur Beschreibung in der Literatur verwendet. Jedoch gibt es genauere Aufteilungen für die einzelnen Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereichs. Da die einzelnen Subtypen verschiedene Ätiologien aufweisen bietet es sich an, sie auch in Studien folgend zu klassifizieren und nach Lokalisation getrennt zu untersuchen: OSCC (orales PECA), OPSCC (oropharyngeales PECA), laryngeales PECA (LSSC) sowie nasopharyngeales PECA (NPSCC). Für die Entstehung eines OSCC sind vor allem langjähriger Alkohol- und Tabakkonsums die entscheidenden Risikofaktoren. Diese Risikofaktoren tragen auch den Hauptteil bei der Entstehung eines LSSC. Risikoläsionen der Mundschleimhaut werden als orale Präkursorläsionen bezeichnet. Eine orale Schleimhautveränderung, die als solche präkanzeröse Läsion gilt, ist der Lichen planus. Es werden in der Literatur beim Lichen planus Wahrscheinlichkeiten der malignen Entartung von 0,4-5% angegeben (Al-Hashimi, Schifter et al. 2007). Die Zeitspanne von der Erstdiagnose des Lichen planus bis zur Diagnose des Karzinoms variiert von 20 Monaten bis 10 Jahren (Gonzalez-Moles, Scully et al. 2008, Alrashdan, Cirillo et al. 2016). In 5-20% entsteht

ein OSCC aus einer oralen Leukoplakie (Halbritter, Spieler et al. 2007). Eine Erythroplakie weist das größte Entartungspotential der Präkursorläsionen mit 14-50% auf (Kuffer and Lombardi 2002). Für das OPSCC, insbesondere für das Tonsillenzarzinom (TSCC), werden auch Humane Papillomaviren (HPV) in 50-70% als Ursache beschrieben (Sturgis and Cinciripini 2007). Bei diesen Patienten fehlen meistens Noxen als ätiologische Faktoren (D'Souza, Kreimer et al. 2007). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) spielt ätiologisch bei der Entstehung des NPSCC eine große Rolle (Goldenberg, Golz et al. 2001, Jiang, Ekshyyan et al. 2015).

## **1.2 Therapieoptionen beim oralen Plattenepithelkarzinom**

Die fallabhängige Therapieentscheidung wird gemäß der deutschen Leitlinie Mundhöhlenkarzinom interdisziplinär getroffen (Wolff, Follmann et al. 2012). Nach histologischer Sicherung, abgeschlossenem Staging mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie des Kopf-Hals-Bereiches und Hals-Nasen-Ohrenärztlicher Untersuchung folgt die präoperative Vorstellung in einer interdisziplinären Tumorkonferenz für Kopf-Hals-Tumore. Hier wird unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes des Patienten, der klinischen und radiologischen Primärtumorlokalisation und -ausdehnung sowie des Halslymphknotenstatus die Therapie festgelegt. Unter Berücksichtigung der definitiven Histologie wird der Patientenfall postoperativ in der Tumorkonferenz erneut vorgestellt. Neben der langfristigen Lebensqualität des Patienten stellen Minimierung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rezidiven und Zweittumoren die wesentlichen Therapieziele dar. Die Therapie hat, abhängig von der Prognose des Patienten, eine kurative oder palliative Intention. Es können eine operative, strahlentherapeutische oder kombiniert operativ und adjuvante strahlentherapeutische Behandlung erfolgen (Glenny, Furness et al. 2010). Eine individualisierte Therapie, welche sich an molekularen Targets des OSCC orientiert, ist für das OSCC bisher nicht als Firstline-Therapie vorhanden. Im Falle eines Rezidivs oder Zweittumors, unter bereits vorhandener Ausschöpfung sämtlicher operativer und strahlentherapeutischer Optionen und einer nachweisbaren Überexpression des Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) kann eine Therapie mit einem PD-L1 Antikörper in Betracht gezogen werden. Die Karzinomzelle kann durch PD-L1 an den PD-1 Rezeptor an T-Lymphozyten binden



und hierdurch die Immunantwort inhibieren (Straub, Drecoll et al. 2016). Die Karzinomzelle hat durch diese Form der Immunsuppression einen Überlebensvorteil (Quezada, Peggs et al. 2006). Die Immuntherapie mit einem Checkpointinhibitor, dem PD-L1 Antikörper Nivolumab oder Pembrolizumab, konnte als Secondline-Therapeutikum bei HNSCC zugelassen werden. In Phase II Studien war eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber klassischen Secondline-Therapien mit Cetuximab oder Docetaxel gegeben (Ferris, Blumenschein et al. 2016, Bauml, Seiwert et al. 2017).

### **1.3 Die Rolle der TNM Klassifikation beim oralen Plattenepithelkarzinom**

Wurde bis vor wenigen Jahren die Kategorisierung der HNSCC durch die TNM-Klassifikation bezüglich der entsprechenden Prognose und Therapie uneingeschränkt hinzugezogen, manifestiert sich seit einiger Zeit ein Umdenken (O'Sullivan, Shah; et al. 2016). Durch Untersuchungen der Rezidivhäufigkeit, des Aufkommens von Zweittumoren und Chemoresistenzen wird ersichtlich, dass eine Charakterisierung nach ausschließlich anatomischen Parametern wie Tumorgroße und Lymphknotenstatus keinen suffizienten Lösungsansatz für die Erklärung der Probleme der Rezidivhäufigkeit und der eingeschränkten 5-Jahres-Überlebensrate offenbart (Keane, Chen et al. 2015, Lee, Ho et al. 2015). Zur Verbesserung wird eine weiterführende Faktorenberücksichtigung hinsichtlich Prognose und individueller Therapie suggeriert. Neben einer patientenbezogenen Datenerhebung und einer tumorspezifischen Aufgliederung steht eine molekulargenetische Analyse zur Diskussion (Takes, Rinaldo et al. 2010). Aus tumorspezifischen zellulären und genomischen Mustern können entscheidende Hinweise für den weiteren klinischen Verlauf gezogen werden (Chiang and Massague 2008). Eine Reihe prognostisch aussagekräftiger molekularer Marker liegt bei Malignomen anderer Lokalisationen vor (Carter, Rothwell et al. 2017). Beim HNSCC müssen hinsichtlich dieser Etablierung weitere Fortschritte geleistet werden (Chung, Parker et al. 2004).

## **1.4 Die „Hallmarks of Cancer“ und ihre Bedeutung beim oralen Plattenepithelkarzinom**

Die Identifikation molekularer Mechanismen, welche der Tumorzelle einen deutlichen Überlebensvorteil im Zellverbund bieten ist von großer wissenschaftlicher Relevanz. Die Eigenschaften wurden erstmalig im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg als „Hallmarks of Cancer“ beschrieben (Hanahan and Weinberg 2000). In diesem Modell wurden sechs grundlegende Merkmale offenbart: 1. self-sufficiency in growth signals, 2. insensitivity to anti-growth signals, 3. evading apoptosis, 4. limitless replicative potential, 5. sustained angiogenesis and 6. tissue invasion and metastasis. Diese Eigenschaften wurden 2011 durch die selben Autoren aktualisiert (Hanahan and Weinberg 2011). Im Jahr 2017 wurden sie nochmalig an aktuelle Ergebnisse der onkologischen Forschung adaptiert. Es wurden die Merkmale 7. selective growth and proliferative advantage, 8. altered stress response, 9. vascularization, 10. invasion and metastasis, 11. metabolic rewiring, 12. an abetting microenvironment, und 13. immune modulation‘ durch Fouad und Aanei aufgelistet (Fouad and Aanei 2017). Für das OSCC haben diese Eigenschaften große Bedeutung, da sie ursächlich für die Rezidivhäufigkeit, das Aufkommen von Zweitumoren und Metastasierung sind (Sasahira and Kirita 2018).

## **1.5 Die Theorie der Tumorstammzellen und ihr Einfluss beim oralen Plattenepithelkarzinom**

Die bereits erläuterten „Hallmarks of Cancer“ beschreiben wichtige, allgemeingültige Eigenschaften der Karzinogenese, die durch einzelne Faktoren gewährleistet werden. Seit einigen Jahren gibt es Hinweise, dass zum einen durch die Tumorzellen diese Faktoren auf zellulärer oder molekularer Ebene gebildet werden. Es wurde ersichtlich, dass der Tumor ein großer Verbund unterschiedlicher Zellen ist und komplexe Interaktionen vorhanden sind (Ohnishi, Yasui et al. 2018). In neueren Studien wird auch der Rolle des nicht zellulären Tumorstromas, als extrazelluläre Matrix (EZM) beschrieben, diesbezüglich eine wichtige Funktion zugeschrieben (Jensen, Hindberg et al. 2018). Die Theorie der Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells; CSC) wurde im Jahr 1994 erstmals beschrieben (Lapidot, Sirard et al. 1994,

Clarke and Fuller 2006). Es wurde deutlich, dass im Zellverbund des Tumors eine Heterogenität der Zellen vorliegt. Die These des Zufalls, dass eine beliebige Tumorzelle für die Proliferation und Ausbreitung des Tumors verantwortlich ist, war nicht länger haltbar.

Für PECA im Kopf-Hals-Bereich ist ein bisher etablierter CSC-Marker (CSCM) das in der Plasmamembran lokalisierte CD44 wie eine Vielzahl von Untersuchungen zeigen konnte (Kawano, Yanoma et al. 2005, Prince and Ailles 2008, Zhang, Filho et al. 2012). CD44 wird bei Tumoren dieser Lokalisation in verschiedenen Isoformen exprimiert (Wang, Wong et al. 2009) und hat als extrazelluläre Liganden zahlreiche Komponenten der EZM wie Hyaluronsäure, Fibronectin und Chondroitinsulfat. Diese Liganden sind für die Adhäsion und für die Funktion der Zellmigration verantwortlich, welche durch CD44 vermittelt wird. Zudem findet eine Präsentation von Wachstumsfaktoren durch CD44 statt. Diese Eigenschaften machen deutlich, dass CD44-Proteine essentiell für einen Überlebensvorteil des Tumors sind. Ein weiteres CSC-spezifisches Protein stellt CD133 dar. Die Funktion dieses Proteins ist bislang nicht hinreichend geklärt (Piechaczek 2001), die Existenz auf CSC bei Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen wird jedoch von einigen Autoren bestätigt (Collins, Berry et al. 2005, Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007, Ferrandina, Bonanno et al. 2008). Im Bereich der HPV-positiven Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes steht die Identifikation der CSC und ihrer Oberflächenproteine am Anfang. Die bisher erste und einzige stattgefundene in vitro Isolierung von HPV 16-positiven CSC aus dem Kopf-Halsbereich durch eine Forschungsgruppe ließ die erwähnten molekularen Targets unberücksichtigt (Tang, Hauff et al. 2011).

Kürzlich publizierte Ergebnisse bestätigen, dass bei HPV-induzierten Karzinomen der Zervix eine Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) vorliegt und zeigen, dass ein positiver Nachweis der CSCM CD44 und CD133 in vitro durchgeführt werden konnte (Lopez, Poitevin et al. 2012) (Feng, Peng et al. 2009). Die Fähigkeit einer Tumorzelle, eine EMT durchzuführen, kann als hauptsächlicher Faktor für eine Metastasierung angesehen werden (Liu, Wang et al. 2019). Diese Zellen zeigen eine starke Migrationsfähigkeit und die Möglichkeit, sich von interzellulären Kontakten zu lösen. Die ebenfalls hohe Rezidivrate bei der Tumorentität des Zervixkarzinoms beträgt in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung bis zu 90% (Pectasides, Kamposioras et al. 2008) und ist vergleichbar mit der des OSCC. Sie kann durch Studien in Korrelation mit einer Resistenz der CSC gegenüber einer Chemo- und

Radiotherapie gesetzt werden (Dalerba, Cho et al. 2007). Zusätzlich wurde das alpha 6-Integrin CD49f auf CSC des Zervixkarzinoms nachgewiesen und wird zudem als essentielles Adsorptionsmolekül bei der HPV-Infektion angesehen (Culp, Budgeon et al. 2006). Eine Vielzahl von Publikationen hat ebenfalls gezeigt, dass das Protein YB-1 ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese spielt. YB-1 ist ein multifunktionelles Protein, denn es ist direkt oder durch Interaktion mit anderen Faktoren an fundamentalen biologischen Prozessen beteiligt, darunter an der Regulation der Transkription, des Spleißens und der Translation, an der Vielfachresistenz von Tumorzellen (Bargou, Jurchott et al. 1997), dem Zellzyklus und sowie an der EMT (Mouneimne and Brugge 2009). Von großer Bedeutung für die Funktion von YB-1 ist seine Lokalisation innerhalb der Zelle. Diese wird durch die AKT und ERK vermittelte Phosphorylierung und Acetylierung beeinflusst. Während YB-1 im Zytoplasma an der translationalen Regulation beteiligt ist, wirkt es im Kern vor allem als Transkriptionsfaktor und steuert die Expression von Proteinen wie MMP2, Kollagen  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor (EGFR), c-MET und Phosphatidyl-inositol-kinase (PIK)3CA, die an der Mobilität, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen entscheidend beteiligt sind. Ferner interagiert YB-1 mit weiteren Faktoren wie p53, AP-1, SMAD3 und p300, hat somit indirekt Einfluss auf die Genexpression. YB-1 stellt daher einen wichtigen und integralen Teil verschiedener Signaltransduktionswege dar und wird zu Recht als ein onkogener Transkriptions/Translationsfaktor bezeichnet (Holzmüller, Mantwill et al. 2011). Diese Ergebnisse belegen beispielhaft die Relevanz von CSC bei OSCC. Jedoch ist in der Literatur auch die Problematik bezüglich der Mannigfaltigkeit der Marker und ihre noch nicht zielführende Analyse häufig diskutiert (Teixeira and Correa 2018). Aufgrund der Heterogenität eines Tumors und der multiplen interagierenden Signalwege wurde auch immer deutlicher, dass Targets mit molekularer Schlüsselfunktion gefunden werden müssen um eine suffiziente Therapie ableiten zu können. Durch die bisherigen Errungenschaften der molekularen Onkologie ist es auch ersichtlich geworden, dass eine Therapie gegen ein einzelnes Target nicht den erhofften Therapievorteil bringt (Ohnishi, Yasui et al. 2018).

## **1.6 Die Aldehyddehydrogenase I als Tumorstammzellmarker beim oralen Plattenepithelkarzinom**

Ein funktionell relevantes Enzym ist die Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1). Retinsäure ist das Oxidationsprodukt des Enzymes, das über den nukleären Retinsäurerezeptor binden kann (Schafer, Teufel et al. 2012). Somit katabolisiert die ALDH1 ein Produkt, welches direkten Einfluss auf die Genexpression hat (Elizondo, Medina-Diaz et al. 2009). ALDH1 wurde bisher bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen, unter anderem bei Glioblastomen und bei Mammakarzinomen. Es befindet sich im Zytoplasma und im Mitochondrium und konnte bei diesen Krebsarten als prädiktiver Marker für eine schlechtere Prognose identifiziert werden (Schafer, Teufel et al. 2012, Knudsen, Dervishaj et al. 2013). Eine hohe Expression von ALDH1 war vor allem in Zellen mit CSC-Eigenschaften vorhanden und ALDH1 wurde in der Vergangenheit auch als CSCM in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen (Reid, Wilson et al. 2017). Zudem scheinen Zellen mit hoher ALDH1 Funktion eine Schlüsselfunktion bei Chemotherapie-Resistenzen zu besitzen (Mihatsch, Toulany et al. 2011). Eine frühere Studie zeigte den Einfluss der Expression von ALDH1 in Hinblick auf die patientenspezifische Prognose bei OPSCC (Qian, Wagner et al. 2013). ALDH1-positive CSCs zeigten zuvor in HNSCC Studien eine tumorogene Kapazität (Clay, Tabor et al. 2010). Damit kommt diesen CSC ein zentraler Aspekt bei der EMT und der Bildung von Metastasen zu. Bei OPSCC wurde auch eine Assoziation zwischen der Expression von ALDH1 und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Qian, Wagner et al. 2013). Dies unterstreicht die potenzielle Aggressivität von Zellen mit einer hohen ALDH1 Expression (Clay, Tabor et al. 2010). Darüber hinaus wurden fortgeschrittene T-Stadien bei ALDH1-positiven OSCC-Fällen berichtet (He, Zhang et al. 2014). Insbesondere eine erhöhte Anzahl von Lymphknotenmetastasen kann ein wichtiger Hinweis darauf sein, dass CSC eine EMT durchlaufen. In der Literatur wird zudem eine signifikant reduzierte Überlebensdauer häufig als Zusammenhang mit erhöhter ALDH1 Expression diskutiert (Ginestier, Hur et al. 2007). In anderen Studien wurde jedoch auch über das Fehlen eines negativen Einflusses auf das Überleben bei hoher ALDH1-Expression berichtet (Morimoto, Kim et al. 2009, Bednarz-Knoll, Nastaly et al. 2015). Die Evaluation von ALDH1 und dessen Bedeutung ist beim OSCC noch nicht abschließend geklärt.

## 1.7 Humane Papillomaviren und ihre Bedeutung beim oralen Plattenepithelkarzinom

Seit einigen Jahren wird bei HNSCC als prognostischer Faktor die Erhebung des Status der Infektion mit HPV der betroffenen Patienten diskutiert. In den Resultaten internationaler Studien wird in 20-30% dieser Karzinome eine Korrelation mit einer HPV-Infektion angegeben (Albers, Hoffmann et al. 2010), eine Seropositivität für den HPV-Subtyp 16 ist dabei zu 70% vorliegend (Syrjanen 2007). HPV 16 stellt den onkogenen High-Risk-Typ der Papillomaviren der  $\alpha$ -Gruppe dar, welcher am häufigsten für Infektionen der oralen Mukosa verantwortlich ist. Die Tumore dieser Patientenkollektive stellen eine eigene Entität dar, welche von den überwiegend noxeninduzierten Malignomen der Kopf-Hals-Region differieren. Eine signifikant verbesserte 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten wird beschrieben, diese wird zusätzlich positiv beeinflusst im Falle eines geringeren Durchschnittsalters der Patienten bei der Erstmanifestation des Tumors und einer negativen Nikotinanamnese (Friedland, Thomas et al. 2011). Das verbesserte Outcome wird auf eine höhere Sensitivität der HPV-positiven Karzinomzellen bezüglich der postoperativen Radiochemotherapie zurückgeführt (Fakhry, Westra et al. 2008).

Eine Feldkanzerisierung, welche bei den kausal durch Alkohol- und Tabakkonsum bedingten Plattenepithelkarzinomen in der Kopf-Hals-Region für Zweittumore und Rezidive verantwortlich scheint, kann in aktuellen Untersuchungen bei den HPV-positiven HNSCC nicht bestätigt werden (Begum, Cao et al. 2005).

Jedoch finden sich in Studien ebenfalls therapierefraktäre Fälle unter den HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen (Mannelli and Gallo 2012). Bei Betrachtung der Patientenkollektive der HPV-Studien fällt auf, dass höhere Anzahlen von HPV-positiven Tumoren, bessere Ergebnisse für HPV-positive Patienten und verbesserte Überlebensraten im Vergleich zu HPV negativen Gruppen häufig in Studien veröffentlicht wurden, in denen nicht zwischen OSCC und OPSCC unterschieden wurde und andere Confounder, die das DSS signifikant beeinflussten, nicht untersucht wurden (Keane, Chen et al. 2015). Es wurden nur wenige Studien veröffentlicht, die die anatomischen Lokalisationen ausreichend unterscheiden (Krul, Van De Vijver et al. 1999). Insbesondere in OPSCC interagieren lymphoides Gewebe und lymphoide Vorläuferzellen mit HPV-Infektionen und auch Karzinomzellen durch verschiedene molekulare Mechanismen (Larsen, Johansen et al. 2009). Ein weiteres

Problem, das Überlebensvergleiche schwierig macht, ist der Vergleich inhomogener Gruppen. Das Alter und entsprechende Komorbiditäten sowie verschiedene Tumorstadien beeinflussen die Überlebensraten. Häufig werden falsche Schlussfolgerungen gezogen, die auf unterschiedlichen Überlebensraten basieren, ohne das Alter der HPV-positiven und -negativen Gruppen zu berücksichtigen. Bisher haben nur wenige Studien ausschließlich OSCC als Diagnose und homogene Gruppen im Hinblick auf Alter und Tumorstadium der Patienten untersucht.

## 1.8 Detektionsverfahren der Humanen Papillomaviren

Für die HPV-Detektion stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Wie oft diskutiert, ist die p16<sup>INK4a</sup>-Immunfärbung eine häufig durchgeführte Methode (Westra 2014). Dieses Protein interagiert auf vielfältige Weise mit dem Zellzyklus (siehe 1.9). Jedoch ist seine Expressionsstärke oft unabhängig vom HPV-Status und es ist somit kein suffizienter, alleiniger Prädiktor für den HPV-Status und hat einen niedrigen Vorhersagewert für eine HPV-Infektion (Mirghani, Amen et al. 2015). Es muss vielmehr als unabhängiger Marker betrachtet werden, der den Zellzyklus von Karzinomzellen beeinflusst. In der Literatur wird die These geführt, dass die p16<sup>INK4a</sup> Immunfärbung und Überexpression eine unzureichende HPV-Nachweismethode ist, da bei der alleinigen Verwendung der letzteren Methode die Anzahl der falsch positiven HPV-positiven Patienten um ungefähr 50% höher liegt und Studien, bei denen die p16<sup>INK4a</sup>-Immunfärbung ohne andere HPV-Nachweismethoden kontrolliert wurde, eine höhere positive HPV-Rate aufweisen (Wirth 2016). Bemerkenswert ist eine große Anzahl von HPV-positiven Fällen, die mit einer Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> bei OPSCC korreliert, hauptsächlich bei TSCC (Wolff, Follmann et al. 2012). Bei OSCC ist die Korrelation zwischen einer p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression und einer HPV-Infektion jedoch ohne weitere methodische Untersuchungen nicht tragbar (Walline, Komarck et al. 2013). Als Standardmethode des Nachweises der HPV-Infektion wird

in der Literatur die Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) von extrahierter DNA aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem OSCC-Gewebe (FFPE) als Standardmethode für den HPV-Nachweis erwähnt (Wirth 2016). Ein Vorteil bei dieser Methode ist die Möglichkeit, FFPE für die RT-PCR zu verwenden, da dies eine retrospektive Untersuchung von OSCC-Patienten ermöglicht. Zusätzlich können die HPV-Subtypen anschließend mit einem LCD-Array unter Verwendung von DNA, die ebenfalls aus FFPE extrahiert wurde, nachgewiesen werden. Die Verwendung der RT-PCR und des LCD-Arrays bieten mehr Vorteile in Form von zuverlässigeren Ergebnissen und bessere wirtschaftliche Aspekte als die Verwendung der Sanger-Sequenzanalyse (Young, Urban et al. 2015). Mit der zusätzlichen Methode des LCD-Arrays erhält man zusätzlich zur Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse weitere Informationen zum onkogenen Risikopotenzial der zugrunde liegenden HPV-Subtypen, da ein positives Ergebnis für den LCD-Array nur beobachtet wurde, wenn die OSCC-DNA HPV positiv war (Gotz, Drecoll et al. 2016).

Eine weitere Nachweismethode mit Visualisierung ist die In-situ Hybridisierung. Bei dieser Methode wird die virale DNA direkt optisch nachgewiesen (Reuschenbach, Kansy et al. 2013). Die Spezifität wird bei diesem Nachweis als sehr gut bezeichnet (Stewart, Baird et al. 2011). Die mangelnde Sensitivität bei dieser Methode lässt sie im Kontext aller Nachweismethoden in der qualitativen Wertigkeit zurückfallen, da eine HPV-Infektion durch ein negatives Ergebnis nicht sicher ausgeschlossen werden kann (Lingen, Xiao et al. 2013).

## **1.9 Der Humane Papillomaviren assoziierte Surrogatmarker p16<sup>INK4a</sup>**

p16<sup>INK4a</sup>, auch als CDK-Inhibitor 2A bezeichnet, wird durch das CDKN2A-Gen kodiert (Sritippho, Pongsirivet et al. 2016). Im Zellzyklus bindet es an CDK4 und CDK 6 und wirkt in der S-Phase inhibierend. Eine Methylierung der DNA, beispielsweise durch Nikotinkonsum, kann zu einer Mutation des CDKN2A-Gens führen (Romagosa, Simonetti et al. 2011). p16<sup>INK4a</sup> wird eine antiproliferative Aktivität zugeschrieben, es besitzt relevante Wechselwirkungen mit den Signalwegen des Retinoblastomproteins und p53 (Serrano 1997, Romagosa, Simonetti et al. 2011). Diese Pathways haben Schlüsselfunktion in der Tumorsuppression. Demzufolge wird



p16<sup>INK4a</sup> auch als Tumorsuppressorprotein bezeichnet und ist beim HNSCC sowie bei Brust- und Darmkrebs als mutiert und fehlreguliert beschrieben worden (Hoesli, Birkeland et al. 2018). Vor kurzem wurden Interaktionen von p16<sup>INK4a</sup> entdeckt, die Funktionen bei der Regulierung der CSC und der Umkehrung der Seneszenz von CSC während der Therapie bewirken (Milanovic, Fan et al. 2018). Zudem konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Fibroblasten bei oxidativem Stress in die Seneszenz übergehen und hierbei eine Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> vorliegt (Wu, Xue et al. 2007). Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass die Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> einen negativen prognostischen Einfluss hat und diese das Wiederauftreten des Tumors fördert und eine reduzierte Überlebensdauer als Folge hat (Gotz, Bissinger et al. 2018). Die Invasivität der Tumorzellen soll mit einer Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> assoziiert sein (Chen, Chu et al. 2013). Die gesteigerte Invasivität erklärt sich über die Wechselwirkungen mit Laminen und Kateninen (Jung, Schrauder et al. 2001). Zudem hat p16<sup>INK4a</sup> einen relevanten Einfluss auf die Angiogenese und Apoptose. Die Herunterregulation von p16<sup>INK4a</sup> wurde in der Literatur auch beschrieben. Es wurde argumentiert, dass die verminderte Expression von p16<sup>INK4a</sup>, das als Tumorsuppressor gilt, zu einem schlechteren Überleben führt (Sharpless 2005). Die Rolle der Unter- und Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> scheint von der Krebsart individuell abhängig zu sein (Romagosa, Simonetti et al. 2011). Die HPV-assoziierten Onkoproteine wie E7 beeinflussen die Expression von p16<sup>INK4a</sup> (Gotz, Drecoll et al. 2016). Daher wird p16<sup>INK4a</sup> in vielen Studienprotokollen als HPV-verwandter Ersatzmarker verwendet und dadurch als Surrogatmarker bezeichnet (Malinowsky, Wolff et al. 2010). Eine HPV-Infektion wurde bisher häufig mittels Immunhistochemie (IHC) von p16<sup>INK4a</sup> nachgewiesen. Jedoch zeigten viele Studien Kritikpunkte an diesem Vorgehen, mittlerweile ist diese Methodik der indirekten HPV-Diagnostik über p16<sup>INK4a</sup> nur beim OPSCC etabliert und ohne fehlerhafte Resultate und Schlussfolgerungen durchzuführen (Gipson, Robbins et al. 2018).

## 1.10 Zielsetzung der Promotion

Das Fehlen einer suffizienten Behandlung therapierefraktärer und rezidivierender OSCC liefert den Hintergrund dieser Promotion und ihrer zugrundeliegenden

Publikationen „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“ und „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“. In diesem Bereich muss weiterführende fundierte Grundlagenforschung betrieben werden, um somit die Basis für eine klinische Anwendung zu schaffen. Ziel dieser aktuellen Promotion war es, eine homogene Patientengruppe mit der Diagnose OSCC zu vergleichen. Es sollten Faktoren untersucht werden, die das Überleben und den krankheitsspezifischen Verlauf in Bezug auf Metastasierung oder Rezidivverhalten des OSCC beeinflussen könnten.

In der Literatur spielen die HPV-Infektion und ein möglicher kanzerogener Einfluss auf die Entstehung des OSCC eine relevante Rolle. Häufig verwendete HPV-Nachweismethoden sollten bewertet werden und der HPV-Status sollte auf Relevanz für das Überleben der OSCC Patienten und dessen klinischen Verlauf untersucht werden. Zusätzlich war es ein Anliegen die spezifische Rolle von p16<sup>INK4a</sup>, außerhalb der Funktion des HPV-Nachweises, als potentiellen Marker zu betrachten. ALDH1 sollte als ein bisher kaum untersuchter Tumorstammzellmarker in der Entität des OSCC hinsichtlich Beeinflussung des Überlebens und des Metastasierungsverhaltens ausgewertet werden.

## **2. Material und Methode**

### **2.1 Studiendesign der publizierten Arbeit „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“**

#### **2.1.1 Studienkohorte**

202 Patienten, die zwischen 2009 und 2011 in der Abteilung für Mund,- Kiefer- und Gesichtschirurgie der Technischen Universität München operiert wurden, sind in diese Studie aufgenommen worden. Die Einschlusskriterien waren die Durchführung einer Operation mit kurativem Aspekt, die Verfügbarkeit patientenspezifischer Daten und von FFPE-OSCC. Für jeden Patienten der Studie lagen vollständige Follow-up-

Daten vor. Alle Patienten waren in regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen in unserer Abteilung vorstellig. Tumoren der Zungenbasis und Tumoren mit Beteiligung des Oropharynx wurden in der aktuellen Studie ausgeschlossen, um eine strikte Analyse ausschließlich von OSCC zu gewährleisten. Alle Fälle wurden im interdisziplinären Tumorboard für Kopf-Hals-Tumore am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München prä- und posttherapeutisch vorgestellt. Die durchgeführten Therapien der eingeschlossenen Patienten waren primäre Tumoroperationen im Sinne von Tumorresektionen mit intraoperativer Schnellschnittkontrolle und entsprechender Neck Dissection. Gemäß der deutschen Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom wurde bei allen Patienten im Falle von einseitig lokalisierten Tumoren eine ipsilaterale selektive Neck-Dissection mit Entfernung der ipsilateralen Lymphknoten in Level I-III durchgeführt. Bei mittellinienüberschreitenden Karzinomen wurde eine beidseitige selektive Neck Dissection der Level I-III durchgeführt. Die Neck Dissection wurde bei Lymphknotenmetastasen in Level IIB oder III auf die Level IV und V erweitert (Wolff, Follmann et al. 2012).

Eine postoperative adjuvante Radiotherapie mit einer Dosis zwischen 50 und 66 Gy wurde im Falle von Lymphknotenmetastasen, bei extrakapsulärem Wachstum (ECE), Knocheninfiltration, bei positiven mikroskopischen Resektionsrändern (R1) oder ausgedehnten Tumoren (T3 und T4) gemäß der deutschen Leitlinie für das Mundhöhlenkarzinom durchgeführt (Wolff, Follmann et al. 2012).

Ausschlusskriterien für den Einschluss in diese Studie waren der Tod aufgrund eines nicht tumorspezifischen Ereignisses, Fernmetastasen bei der Primärdiagnose und die Durchführung einer neoadjuvanten oder primären Radiotherapie. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München genehmigt und entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

### **2.1.2 Tissue-Microarray Konstruktion**

Zwei Pathologen legten fest, welche Anteile des Karzinomgewebes aus dem Tumorzentrum, der Invasionsfront des Tumors und den Lymphknoten jedes

Studienpatienten in den Tissue-Microarray (TMA) mitaufgenommen werden sollten. Das Gewebe wurde mit Formalin fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet. Es wurden jeweils zwei Gewebebereiche mit einem Durchmesser von 6 mm gestanzt und unter Verwendung eines Tissue Microarrayers (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA) wie zuvor beschrieben in den TMA eingefügt (Nagai 1999).

### **2.1.3 Immunhistochemie von p16<sup>INK4a</sup>**

Tumorgewebe wurde mit Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet (FFPE). Wie zuvor beschrieben, wurde ein TMA von zwei Pathologen erstellt (Straub, Drecoll et al. 2016). Zwei Gewebeanteile jedes Karzinoms wurden in den TMA eingefügt. TMA-Schnitte mit vier Mikrometern Stärke wurden mit dem p16<sup>INK4a</sup> Antikörper (CINtec; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) nach den Empfehlungen des Herstellers auf folgende Weise angefärbt: nach Entparaffinierung, Wässerung und Waschen mit Tris-Puffer-Lösung (TBS; 0,05 mol l<sup>-1</sup> Trizma-Base 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl; pH 7,6), wurde das Epitop-Retrival der Gewebsschnitte durch Kochen im Drucktopf (4 Minuten, 10 mmol / l Citratpuffer, pH-Wert 6,0) durchgeführt, gefolgt von einer Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität (mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 Minuten, Raumtemperatur (RT)). Nach dem Waschen in TBS wurden die Schnitte mit dem p16<sup>INK4a</sup>-Antikörper in Antikörper-Verdünnungsmittel (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) inkubiert, gefolgt von einer weiteren TBS-Waschung. Die Färbung wurde durch die Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin-chromogenic-Substrat (DakoCytomation; 10 min, RT) sichtbar gemacht. Schließlich wurden die Schnitte mit Mayer-Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt und die Objektträger dann mit Pertex-Medium (MEDITE, Burgdorf, Deutschland) eingedeckelt (Nakao, Yang et al. 1997). Als Auswertung wurde das Auftreten eines Färbesignals in den vorliegenden Proben als positiv gewertet wie bereits in der Literatur beschrieben (Begum, Gillison et al. 2003, Ndiaye, Mena et al. 2014).

### **2.1.4 DNA-Nachweis**

Es wurden FFPE-Full-Face-Slides des zentralen Tumorareals jedes Patienten in 15 Mikrometer dicken Schnitten angefertigt. Wie bereits beschrieben wurde hieraus

DNA extrahiert (O'Rorke, Ellison et al. 2012, Oguejiofor, Hall et al. 2013). Die Extraktion der HPV-DNA wurde mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Prim Mix A und Mix B (Mix My 11/09 und Mix 125) des LCD-Array HPV 3.5-Kits (Zytemed Systems, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

### **2.1.5 Erkennung der HPV-Subtypen**

Das HPV 3.5-LCD-Array-Kit (Zytemed Systems, Berlin, Deutschland) wurde verwendet, um die HPV-Subtypen zu identifizieren (Okami, Reed et al. 1999). Es sind mit diesem System 32 Subtypen nachweisbar, darunter HPV-Typen mit unterschiedlichem Risiko für eine maligne Entartung. Nach der Amplifikation der HPV-DNA wurde die Hybridisierung am LCD-Array-Chip durchgeführt. Nach dem Waschen der Chips und dem Trocknen durch Zentrifugation war die Visualisierung der gebundenen Amplikons über eine Enzym-Substrat-Reaktion möglich. Die Arrays wurden anschließend per Scanner analysiert.

### **2.1.6 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit dem Programm „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS für Windows, Release 22.0.0, 2013, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ausgewertet. Die Cox-Regression wurde für die Überlebensanalyse verwendet. Als Signifikanztests wurden der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest und der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Wahrscheinlichkeiten von weniger als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

## **2.2. Studiendesign der publizierten Arbeit „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“**

### **2.2.1 Studienkohorte**

Die vorliegende publizierte Studie schloss 186 Patienten mit der Diagnose OSCC ein. Die chirurgische Behandlung wurde zwischen Januar 2009 und Dezember 2012 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt. Die chirurgische Behandlung umfasste die Tumorresektion, Neck Dissection und intraoperative Schnellschnittkontrolle und die primäre Rekonstruktion mit einem mikrovaskulären Transplantat. Alle Patienten wurden in der interdisziplinären Konferenz für Kopf- und Hals-Tumore Klinikums rechts der Isar vor und nach der Operation vorgestellt. Die klinischen Daten aller Patienten waren verfügbar und von allen Patienten war FFPE-Gewebe verfügbar. Nachsorgeuntersuchungen wurden bei allen eingeschlossenen Patienten gemäß der deutschen S3-Leitlinie für das Mundhöhlenkarzinom durchgeführt (Wolff, Follmann et al. 2012). Diese Leitlinie empfiehlt, dass Patienten mit Mundhöhlenkrebs alle drei Monate innerhalb der ersten 2 Jahre nach der Erstdiagnose und danach alle 6 Monate in den Jahren 3 und 4 untersucht werden sollten. Bei jedem zweiten Nachsorgetermin wird eine radiologische Diagnostik mittels CT oder MRT von Kopf und Hals durchgeführt. Nach der Leitlinie kann die Nachsorge 5 Jahre nach der Erstdiagnose abgeschlossen werden. Alle Tumoroperationen wurden mit kurativem Anliegen durchgeführt und beinhalteten eine Neck Dissection. Als intraoperative Kontrolle wurde bei jeder Tumoroperation auch eine intraoperative Schnellschnittdiagnostik durchgeführt. Wie zuvor beschrieben, wurde eine adjuvante Cisplatin-basierte Radiochemotherapie bei Lymphknotenmetastasen, extrakapsulärer Ausbreitung, Tumordinfiltration des Knochens, Tumoren mit erweiterter Größe (T3-T4) und positivem histologischem Nachweis von Tumorzellen (R1) durchgeführt (Gotz, Drecoll et al. 2016). Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn keine kurative chirurgische Behandlung durchgeführt wurde und die primäre Behandlung eine Radiochemotherapie war. Die Studie war gemäß der gemäß der Deklaration von

Helsinki aufgebaut und wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

## **2.2.2 Tissue-Microarray Konstruktion**

Das Tumorzentrum, die Invasionsfront des Tumors und die entsprechenden Lymphknoten der Patienten (FFPE) wurden in den TMA wie bereits beschrieben aufgenommen (Bissinger, Kolk et al. 2017). Zwei Pathologen analysierten die Bereiche, die für den TMA verwendet werden sollten. Es wurden jeweils 2 Dots pro Bereich in den TMA unter Verwendung eines Tissue-Micro-Arrayers (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA) eingefügt (Nagai 1999).

## **2.2.3 Immunhistochemie von p16<sup>INK4a</sup> und ALDH1**

p16<sup>INK4a</sup> wurde auf den vier Mikrometer dicken TMA-Schnitten unter Verwendung des p16<sup>INK4a</sup>-Antikörpers (Kat.-Nr. 725–4713; Ventana Medical Systems, Inc.; Roche, Tucson, AZ, USA) wie bereits beschrieben angefärbt (30). ALDH1 wurde ebenfalls unter Verwendung eines primären ALDH1-Antikörpers (Kat.-Nr. 611194; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) bei einer Verdünnung von 1:500 angefärbt. Die immunhistochemische Färbung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers und wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Schafer, Teufel et al. 2012). Negative und positive Kontrollen wurden für beide Antikörper gefärbt. Für die p16<sup>INK4a</sup>-Färbung wurden Schnitte von HPV-negativen Zervixkarzinomen als Negativkontrolle und HPV-positive Zervixkarzinomschnitte als Positivkontrolle verwendet. Für die ALDH1-Färbung wurden Glioblastomschnitte als Positivkontrolle verwendet und Urothelkarzinomschnitte dienten als Negativkontrolle (Gotz, Drecoll et al. 2016).

## **2.2.4 Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung von ALDH1 und p16<sup>INK4a</sup>**

Die Färbungen wurden unter einem Lichtmikroskop unter 200-facher Vergrößerung ausgewertet (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Es wurde ein qualitatives und quantitatives Auswertungssystem, wie zuvor beschrieben, verwendet, das die Intensität der Färbung sowie die Anzahl der gefärbten Zellen miteinbezog (Remmele and Stegner 1987). Die Intensität der Färbung und die Zellzahl wurden in den Stufen 0 und 4 bewertet. Die Bewertung der Intensität wurde wie folgend bewertet: Keine Färbung wurde als 0, eine schwache Färbung als 1, mittlere bis schwache Färbung als 2, mittlere Färbung als 3 und starke Färbung als 4 bewertet. Der Anzahl an positiv angefärbten Zellen wurde mit 0 bei <10%, 1 bei 10–25%, 2 bei 25–50%, 3 bei 50–75% und 4 bei > 75% angegeben. Anschließend wurden die Färbeintensitäts- und Anteile an positiven Zellen multipliziert. Als Multiplikationsergebnis resultierten die Gruppen 0, 2, 4, 12 und 16. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden anschließend die Werte für einen Cutoff-Level für eine Positivität für ALDH1 festgelegt. Die Werte 12 und 16 wurden für eine Positivität an ALDH1 festgelegt. Die Werte 0, 2 und 4 wurden als negativ für ALDH1 festgelegt. Für p16<sup>INK4a</sup> wurden als positives Ergebnis die Werte 12 und 16 und für die Negativität wurde der Wert 0 definiert. Der HPV-Nachweis wurde wie bereits beschrieben an DNA durchgeführt, die aus FFPE Tumorgewebe isoliert wurde (Qiamp DNA FFPE-Gewebekit; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Desweiteren wurde eine durch Polymerasekettenreaktion durchgeführt und ein HPV-Array-Kit (HPV 3.5; Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) verwendet (Gotz, Drecoll et al. 2016).

## **2.2.5 Statistische Auswertung**

Es wurde die SPSS-Software für Mac, Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) für die statistische Auswertung verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test und der U2-Test wurden zur Analyse der Daten verwendet. Die Überlebensraten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode bewertet und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und Konfidenzintervall (CI) dargestellt. Um die Signifikanz der Unterschiede bei den



Überlebenswahrscheinlichkeiten zu testen, wurde der Log-Rank-Test verwendet. Risikoregressionsmodelle, wie der Kruskal-Wallis-Test wurden verwendet, um die Assoziation von ALDH1- und p16<sup>INK4a</sup>-Expression mit Tumorgröße und Lymphknotenmetastasen zu untersuchen. Die Cox-Regression wurde zur Analyse multivariater Überlebenszeiten verwendet. Es wurde für p-Werte <0,05 eine statistische Signifikanz festgelegt.

### **3.1 Hervorhebung der individuellen Leistungsbeiträge der Kandidatin und Zusammenfassung der Veröffentlichung „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“**

#### **3.1.1 Hervorhebung der individuellen Leistungsbeiträge der Kandidatin**

Die Publikation „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“ (Gotz, Drecoll et al. 2016) wurde durch meine Person, der Promovendin Frau Dr. med. dent. Carolin Götz, in Eigenregie erstellt. Als Erstautorin und corresponding author hatte ich zudem die Aufgabe, den Einreichungsprozess und die erforderlichen Änderungen des Reviewprozesses auszuführen. Der Studiengedanke, die Erhebung der Patientendaten, die Konzeption und Durchführung der Laborarbeiten und die statistische Analyse wurden ebenfalls durch mich geleistet. Hilfreiche Einarbeitungen in die Methodik der pathohistologischen Auswertung erhielt ich durch Frau Dr. med. Enken Drecoll und Frau Dr. med. Melanie Boxberg (geborene Straub), Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Großartige Unterstützung bei der Konzeption der Studie wurde mir durch den Letztautor Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff zuteil. Durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Oliver Bissinger erhielt ich wertvolle Hilfe bei der statistischen Analyse

der Studie. Alle genannten Autoren waren an der Durchsicht des Manuskripts und an wertvollen Hinweisen zur Verbesserung der Publikation beteiligt.

### **3.1.2 Zusammenfassung „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“**

HNSCC werden häufig nach ihrer Ätiologie eingeteilt. Noxen-assoziierte Kollektive werden mit der HPV-assoziierten Gruppe verglichen, während unterschiedliche Lokalisationen wie OSCC und OPSCC oft als eine Gruppe gemeinsam untersucht werden. Das Ziel der Publikation „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“ (Gotz, Drecoll et al. 2016) war es zu zeigen, dass die Einteilung, alleinig durch die Ätiologie, nicht angemessen ist. 12 (5,94%) Patienten waren p16<sup>INK4a</sup> positiv (Tabelle 1). Diese Ergebnisse waren deutlich durch eine starke Färbeintensität zu erkennen. HPV-positive Zervixkarzinome wurden als Positivkontrollen verwendet. Bezüglich der p16<sup>INK4a</sup> Positivität konnte zwischen den einzelnen Lokalisationen wie Tumorzentrum, Invasionsfront und Lymphknoten kein Unterschied festgestellt werden. 7 (3,47%) Patienten wurden basierend auf den PCR-Ergebnissen als HPV positiv bewertet. Eine Probe eines HPV-positiven Zervixkarzinoms wurde als Positivkontrolle verwendet, um eine HPV-Infektion zu bestätigen. In allen Fällen wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, um eine ausreichende Menge an DNA sicherzustellen. Nur in 4 Fällen (1,98%) entsprach das PCR-Ergebnis einer positiven p16<sup>INK4a</sup>-Färbung. In 8 Fällen (3,96%) war die p16<sup>INK4a</sup>-Färbung positiv, das PCR-Ergebnis jedoch negativ. In 3 Fällen (1,49%) war die p16<sup>INK4a</sup>-Färbung negativ, die PCR für HPV war jedoch positiv. Zusammenfassend ist erkennbar, dass die p16<sup>INK4a</sup>-Färbung zum Nachweis von HPV nicht ausreichend sensitiv und spezifisch ist. Um den HPV-Subtyp zu identifizieren, wurde das HPV-LCD-Array-Kit verwendet. Darüber hinaus diente es als Kontrolle für die PCR-Methode. Zwischen der PCR und dem HPV-LCD-Array-Kit wurden keine widersprüchlichen Ergebnisse festgestellt. In 5 OSCC-Fällen war der HPV-Subtyp 16 vorhanden, in einem Fall waren die HPV-Subtypen 16 und 52 vorhanden und in einem Fall waren die HPV-Subtypen 16 und 53 vorhanden. Die relevanten klinischen Daten von 202 eingeschlossenen Patienten mit der Diagnose OSCC sind in Tabelle 1 aufgeführt. Risikofaktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum waren in

vergleichbarer Anzahl in der HPV positiven und negativen Gruppe vorhanden. Die Mehrheit der beiden Gruppen rauchte, und die Kombination aus Nikotinkonsum und regelmäßigem Alkoholkonsum wurde bei 10% beider Gruppen beobachtet. Der Karnofsky-Index wurde für jeden Tumorpatienten erhoben. Alle Patienten der aktuellen Studie hatten einen Karnofsky-Status zwischen 90 und 100 %, unabhängig von der HPV-Positivität. Aufgrund des hohen Karnofsky-Index war der Status nicht signifikant mit den Überlebensraten verbunden. Die Überlebensraten beider Gruppen unterschieden sich nach univariaten und multivariaten Analysen nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). HPV-positive Patienten hatten ein durchschnittliches Gesamtüberleben (OS) von 33,17 Monaten ((standard deviation (sd) 5,21; 95% Konfidenzintervall (CI): 22,96–43,38) und HPV-negative Patienten zeigten ein durchschnittliches OS von 78,34 Monaten (sd 4,27; 95% -KI: 69,99–86,70).

Die Überlebensraten unterschieden sich auch nicht signifikant zwischen p16<sup>INK4a</sup>-positiven Fällen (durchschnittliches OS 40,08 Monate, sd 4,28; 95% CI: 69,99–86,77) und p16<sup>INK4a</sup>-Negativität (durchschnittliche OS 78,38 Monate, Sd 6,55; 95% CI: 27,24–52,92). HPV und p16<sup>INK4a</sup>-positive Fälle wiesen ebenfalls keine besseren Überlebensraten auf (durchschnittliches OS 31,56 Monate, sd 16,62; 95% -CI: 14,94–48,18). Sowohl das Lokalrezidiv als auch das Lymphknotenrezidiv spielten eine wichtige Rolle für das Überleben ( $p=0,001$ ). Drei dieser Patienten waren HPV-positiv, vier waren p16<sup>INK4a</sup>-positiv und zwei der p16<sup>INK4a</sup>-positiven Patienten waren ebenfalls HPV-positiv. Das rezidivfreie Überleben (RFS) der HPV-positiven Patienten betrug durchschnittlich 8,56 Monate (sd 1,56; 95% CI: 5,51–11,61); HPV negative Patienten zeigten ein durchschnittliches RFS von 18,66 Monaten (sd 2,57; 95% CI: 13,63–23,69). Das RFS der p16<sup>INK4a</sup>-positiven Patienten betrug durchschnittlich 22,05 Monate (sd 5,78; 95% CI: 10,73–33,38) und p16<sup>INK4a</sup>-negative Patienten hatten ein durchschnittliches RFS von 17,70 Monaten (sd 2,54; 95% CI: 12,73–22,67). Das UICC-Stadium (Union for International Cancer Control) ( $p=0,031$ ), das Alter der Patienten ( $p =0,012$ ) und die Lymphknotenmetastasierung ( $p=0,003$ ) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose hatten einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate, unabhängig vom HPV-Status oder von der p16<sup>INK4a</sup>-Expression. Im Gegensatz dazu zeigten das Geschlecht, das T-Stadium, extrakapsuläres Wachstum und das Grading des Tumors keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben oder dem DSS ( $p > 0,05$ ). Zudem waren diese Ergebnisse unabhängig vom HPV- oder p16<sup>INK4a</sup>-Status. Man kann die Schlussfolgerung ziehen, dass der

immunohistochemische p16<sup>INK4a</sup>-Nachweis keine zuverlässige Methode für den HPV-Nachweis beim OSCC ist. Die p16<sup>INK4a</sup>-Positivität stimmte nicht mit den PCR-Ergebnissen der HPV-DNA überein. Darüber hinaus wird beim OSCC der Einfluss der HPV-bedingten Karzinogenese überschätzt. Die Bedeutung der HPV-Infektion bleibt beim OSCC klinisch unklar, jedoch ist der Einfluss der HPV-Infektion auf die Überlebensraten beim OSCC nicht relevant.

**Table 1: Clinicopathological features**

Clinical Parameters	HPV – * (n = 195)	HPV + * (n = 7)
Median age in years (range)	57.6 (29.5–85.8)	57.4 (44.3–65.8)
<u>Gender</u>		
Male/Female	141/54	4/3
<u>UICC Stage</u>		
I	48	×
II	35	×
III	38	3
IVa	74	4
<u>Tumor Size</u>		
T1	72	2
T2	73	1
T3	21	2
T4a/b	29	2
<u>N Stage</u>		
N0	100	3
N1	35	2
N2	60	2
<u>Extracapsular spread</u>	21	2
<u>Grading</u>		
G1	12	×
G2	130	5
G3	2	2
<u>p16</u>		
Positive	8	4
Negative	187	3

Tabelle 1:\* HPV-: HPV negativ; \*HPV+ positiv gemäß der Ergebnisse der PCR; x: nicht vorhanden

## **3.2 Hervorhebung der individuellen Leistungsbeiträge der Kandidatin und Zusammenfassung der Veröffentlichung „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“**

### **3.2.1 Hervorhebung der individuellen Leistungsbeiträge der Kandidatin**

Die Publikation „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“ (Gotz, Bissinger et al. 2018) wurde durch meine Person, der Promovendin Frau Dr. med. dent. Carolin Götz, in Alleinarbeit erstellt. Als Erstautorin und corresponding author hatte ich zudem die Aufgabe, die Einreichung beim Journal und die Änderungen des Reviewprozesses durchzuführen. Ebenso oblag es meiner Person den Studiengedanken, die Erhebung der Patientendaten, die Konzeption und Durchführung der Laborarbeiten und die statistische Analyse zu leisten. Eine Einarbeitung in die pathohistologische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von ALDH1 erhielt ich freundlicherweise durch Frau Dr. med. Enken Drecoll, Institut für Pathologie der Technischen Universität München. Der Letztautor Herr Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk und Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff standen mir bei der Konzeption der Studie in überdurchschnittlichem Maße zur Seite. Durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Oliver Bissinger und Herrn Dr. med. Christopher Nobis erhielt ich wertvolle Unterstützung bei der grafischen Analyse der Ergebnisse und bei der statistischen Auswertung der Studie. Alle Autoren der Publikation waren an der Durchsicht des Manuskripts und an der Korrektur der Publikation beteiligt.

### **3.2.2 Zusammenfassung der Veröffentlichung „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“**

Das Ziel der vorliegenden Publikation „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“ (Gotz, Bissinger et al. 2018) bestand darin, die Rolle von ALDH1 als CSCM für OSCC zu untersuchen und die Rolle von p16<sup>INK4a</sup>, welches

auch ein Surrogatmarker von HPV ist, im Falle der Expression von ALDH1 zu bestimmen. Die klinischen Parameter der 186 eingeschlossenen OSCC-Patienten sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Follow-up Daten ergaben, dass die mittlere Überlebenszeit der Kohorte  $44,54 \pm 86,81$  Monate betrug (95% Konfidenzintervall (CI):32,06-57,02). Die Überlebensrate wurde durch aufgetretene Lymphknotenrezidive signifikant beeinflusst ( $p=0,020$ ). Dies trat bei 18 Patienten der Gesamtkohorte auf. In diesen Fällen sank die Überlebenszeit auf  $36,31 \pm 21,39$  Monate (95% CI:26,43-46,19). Ein weiterer signifikanter Effekt auf die Überlebensrate wurde beim Auftreten eines Lokalrezidivs beobachtet ( $p=0,027$ ). Dies trat bei 25 Patienten auf, worunter die Überlebenszeit auf  $28,49 \pm 23,97$  Monate (95% CI:19,09-37,89) sank. Bei der Erstdiagnose hatten die folgenden Aspekte einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate: Patienten mit UICC-Stadium III hatten im Vergleich zu den Fällen von UICC-Stadium I und II ( $p=0,003$ ) eine signifikant verringerte Überlebenszeit, ebenso wie Patienten mit UICC-Stadium IV ( $p=0,001$ ). Patienten mit N2-Stadium hatten eine signifikant verringerte Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit N0-Stadium ( $p=0,001$ ). Das UICC-Stadium IV hatte einen signifikant negativeren Einfluss auf das Überleben im Vergleich zu UICC-Stadium I-III ( $p=0,001$ ). Es wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorbereichen hinsichtlich der Positivität für ALDH1 beobachtet. Bei 24 Patienten wurde eine niedrige ALDH1-Expression und bei 162 Patienten eine hohe Expression festgestellt. Die Gesamtüberlebensraten unterschieden sich nicht signifikant zwischen den ALDH1-positiven Fällen ( $44,90 \pm 91,40$  Monate; 95% CI:30,71-58,93) und den ALDH1-negativen Fällen ( $41,81 \pm 37,83$ ; 95% CI:26,01-56,83;  $p=0,78$ ). Die hohe Expression von ALDH1 in tumorinfiltrierten Lymphknoten zeigte im Vergleich zu einer niedrigen Expression von ALDH1 einen Zusammenhang mit weiter fortgeschrittenen klinisch-pathologischen Stadien ( $p=0,03$ ). Die hohe Expression von ALDH1 im Tumorzentrum und in der Invasionsfront zeigte keinen signifikanten Einfluss. In 8 Fällen wurde eine p16<sup>INK4a</sup>-Positivität festgestellt. Die mittlere Überlebensrate der Patienten mit p16<sup>INK4a</sup>-positiven OSCC betrug  $32,38 \pm 11,94$  Monate (95% -CI:24,11–40,65); Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der p16<sup>INK4a</sup>-positiven und -negativen Gruppe ( $p=0,12$ ) festgestellt. Insgesamt waren 5 Patienten der Kohorte p16<sup>INK4a</sup>-positiv und gleichzeitig auch HPV-positiv für den HPV-Subtyp 16 (bei diesen Patienten betrug die mittlere Überlebenszeit  $37,00 \pm 11,35$  Monate; 95% CI:27,05–46,95). Es wurde kein

signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebenszeit zwischen der p16<sup>INK4a</sup>-positiven und der HPV 16-positiven und -negativen Gruppe ( $p=0,13$ ) festgestellt. Insgesamt waren 3 Patienten p16<sup>INK4a</sup>-positiv und HPV-negativ (bei diesen Patienten betrug die mittlere Überlebenszeit  $24,67 \pm 12,92$  Monate; 95% CI:10,05-39,29). Diese Patienten wiesen eine signifikant verringerte Überlebenszeit auf, verglichen mit der mittleren Überlebensrate der Gesamtkohorte ( $p=0,048$ ). Insgesamt waren 178 Patienten p16<sup>INK4a</sup>-und HPV-negativ und hatten eine mittlere Überlebenszeit von  $51,16 \pm 41,23$  Monaten (95% CI:45,12-57,20; verglichen mit der Gesamtkohorte,  $p=0,35$ ). 5 Patienten, die p16<sup>INK4a</sup>-positiv und auch HPV-positiv getestet wurden, zeigten eine positive ALDH1-Expression. Diese Gruppe hatte eine mittlere Überlebenszeit von  $34,85 \pm 9,29$  Monaten (95% CI:25,56-44,14). Die verbleibenden p16<sup>INK4a</sup>-positiven Fälle mit negativer ALDH1-Expression ( $n=3$ ) hatten ein mittleres Überleben von  $28,26 \pm 12,90$  Monaten (95% CI:13,66-42,86). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeiten dieser Gruppen ( $p=0,57$ ) gesehen. Im Vergleich der Überlebenszeiten der gesamten Kohorte und der p16<sup>INK4a</sup>-positiven und ALDH1-positiven Untergruppe ( $p=0,25$ ) oder der gesamten Kohorte und der p16<sup>INK4a</sup>-positiven und ALDH1-negativen Untergruppe ( $p=0,15$ ) wurde ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang festgestellt. Insgesamt waren 2 Patienten der HPV-positiven Patienten ALDH1-negativ. Die mittlere Überlebenszeit betrug  $32,59 \pm 13,85$  Monate; (95% CI:13,34-51,84). 3 Patienten zeigten Positivität für ALDH1 (mittlere Überlebenszeit:  $39,94 \pm 8,02$  Monate; 95% CI:30,86–49,02). Es wurde kein Einfluss auf die Überlebenszeit zwischen diesen letztgenannten Gruppen beobachtet ( $p=0,69$ ). Außerdem wurde kein Einfluss auf die Überlebenszeit zwischen diesen letztgenannten Untergruppen und der Gesamtkohorte beobachtet ( $p=0,54$  für ALDH1-negative und HPV-positive Patienten;  $p=0,60$  für ALDH1-positiv und HPV-positive Patienten). Ein Lymphknotenrezidiv und ein Lokalrezidiv trat in einem ALDH1-positiven, p16<sup>INK4a</sup>-positiven und HPV-negativen Fall auf (Überlebenszeit 17,92 Monate). In einem ALDH1-positiven, p16<sup>INK4a</sup>-positiven und HPV-positiven Fall (Überlebenszeit 30,57 Monate) wurde ein Lokalrezidiv diagnostiziert. Insgesamt zeigen die Daten, dass die ALDH1-Expression geeignet ist, eine ungünstige Prognose bei OSCC-Patienten zu erkennen. Der HPV-Status zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit oder die CSCM-Expression. p16<sup>INK4a</sup> bleibt ein potenzieller Marker für ein schlechteres Outcome beim OSCC. Diese These sollte in weiteren Studien geklärt werden.

Table 2 Clinicopathological characteristics of 186 OSCC patients

<b>Clinical Parameters</b>	
Median age in years (range)	58.68 (41.02-85.82)
<u>Gender</u>	
Male / Female	142/44
<u>UICC Stage</u>	
I	38
II	39
III	29
IVa	80
<u>Tumour Size</u>	
T1	48
T2	78
T3	31
T4a	29
<u>N Stage</u>	
N0	73
N1	38
N2a/b/c	9/37/29
<u>Extracapsular spread</u>	10
<u>Grading</u>	
G1	10
G2	135
G3	33
G4	8

Tabelle 2



## 4. Diskussion

In den letzten Jahrzehnten konnten chirurgische Behandlungskonzepte und Nachsorgemodelle beim OSCC vielversprechende Fortschritte erreichen. Die Lebensqualität der Patienten konnte hierdurch stetig verbessert werden (Mucke, Koschinski et al. 2015). Jedoch konnten keine signifikanten Errungenschaften bezüglich der Überlebensraten dieser Patienten erzielt werden. Die molekulare Onkologie hat deswegen für die Zukunft die entscheidende Rolle zielgerichtete Therapien zu generieren, um damit das patientenspezifische Überleben signifikant zu beeinflussen. CSC sind ein grundlegendes Forschungsthema in der molekularen Onkologie. Diese Zellen können als entscheidende Elemente für Therapieresistenz und Metastasierung angesehen werden (La Porta, Zapperi et al. 2012). Im Hinblick auf diese Aspekte kann die Überlebensrate der Patienten mit CSC direkt korreliert sein. Mehrere Studien berichteten über schlechtere Überlebensraten in Fällen mit hoher CSC-Expression, unabhängig von der Tumorentität (Reya, Morrison et al. 2001). Das TNM / UICC-Stadium ist bei der Erstdiagnose nicht immer ein vorhersagbares Ergebnis, da die TNM / UICC-Klassifizierung nur auf anatomischen und klinischen Gegebenheiten basiert und zelluläre Interaktionen nicht berücksichtigt (Burke 2004). Der erste Schritt besteht darin, CSC zu identifizieren und anschließend die Mechanismen zu untersuchen, die CSC einsetzen, um Resistenzen zu erlangen und das aggressive Tumorverhalten zu unterstützen (Magni, Shammah et al. 1996). In CSC-Subpopulationen wurden bereits verschiedene Signalwege untersucht. Ein spezifisches CSC-Molekül ist ALDH1, es weist eine verstärkte Expression in CSC verschiedener Tumore auf (Ikawa, Imprim et al. 1983). In OPSCC wurde auch eine Assoziation zwischen der Expression von ALDH1 und Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Qian, Wagner et al. 2013). In der ALDH1-positiven Gruppe in der vorliegenden Studie wurden erhöhte Lymphknotenmetastasen sowie ein Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium im Vergleich zur ALDH1-negativen Gruppe festgestellt. Dies unterstreicht die potenzielle Aggressivität der Karzinomzellen mit hoher ALDH1-Expression, wie bereits in der Literatur erwähnt und unterstützt die beschriebene signifikante Assoziation von ALDH1 mit Lymphknotenmetastasen (Xu, Muller et al. 2012). Darüber hinaus wurden fortgeschrittene T-Stadien bei ALDH1-positiven OSCC-Fällen berichtet (He, Zhang et

al. 2014). In der Literatur wird ein negatives Überlebensergebnis häufig als Zusammenhang mit angereicherten ALDH1-Fällen diskutiert (Ginestier, Hur et al. 2007). Die Studie „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“ beinhaltete eine begrenzte Anzahl von ALDH1-negativen Fällen im Kollektiv, diese zeigten jedoch eine schlechtere Überlebenszeit als die der ALDH1-positiven Gruppe (Gotz, Bissinger et al. 2018). Ein signifikanter Einfluss auf die Überlebensrate beim OSCC wurde jedoch anhand der aktuellen Ergebnisse nicht ermittelt. Das Fehlen eines negativen Einflusses auf das Überleben durch ALDH1-Positivität wurde auch in anderen Studien berichtet (Bednarz-Knoll, Nastaly et al. 2015). Im Hinblick auf die aktuelle Studie kann das Fehlen eines negativen Einflusses auf das Überleben jedoch auch auf die geringe Anzahl von ALDH1-negativen Fällen zurückzuführen sein. Die Auswertung und Skalierung der immunhistochemischen Färbung, die in der vorliegenden Studie als positive und negative Expression von ALDH1 zusammengefasst wurde, war mit dem Protokoll anderer Studien vergleichbar (Alamgeer, Ganju et al. 2014). Darüber hinaus konnten eindeutige Ergebnisse beim immunhistochemischen Nachweis von p16<sup>INK4a</sup> evaluiert werden. Einige Autoren hatten eine erhöhte Zellmigrationsfähigkeit bei p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression beschrieben (Chen, Chu et al. 2013). Dies kann das Potenzial für Lymphknotenmetastasen erhöhen. Die vorliegende Studie identifizierte wenige Fälle von p16<sup>INK4a</sup>-positiven OSCC. Diese Fälle hatten ein signifikant schlechteres Überleben, wenn sie zusätzlich HPV-negativ waren, obwohl keine spezifischen klinisch-pathologischen Merkmale hinsichtlich der Lymphknotenmetastasierung und eines fortgeschrittenen Tumorstadiums beobachtet wurden. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Fälle für den letztgenannten Marker können die folgenden Schlussfolgerungen nur als vorläufig angesehen werden. Nur wenige OSCC-Studien konzentrierten sich auf p16<sup>INK4a</sup> und machen einen Vergleich der Literatur mit diesen Daten schwierig. Aufgrund der Interaktion von p16<sup>INK4a</sup> im Zellzyklus kann daher vermutet werden, dass dieses Protein für OSCC von großer Bedeutung ist. In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von ALDH1 und p16<sup>INK4a</sup> festgestellt werden. Die Auswirkungen einer HPV-Infektion auf die Prognose und die Therapie für OSCC werden oft diskutiert und zeigen in der Literatur viele Unklarheiten auf. Die zugrundeliegende Studie der Veröffentlichung „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“ wurde durchgeführt, um den Einfluss von HPV an einem großen, homogenen Kollektiv von OSCC-Patienten

zu bewerten (Gotz, Drecoll et al. 2016). Dabei wurden verschiedene HPV-Nachweismethoden sowie das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben der Patienten untersucht. Nach unserem Wissen ist es die erste große Studie, die keine verbesserte Überlebensrate von HPV-positiven OSCC-Patienten zeigt. Darüber hinaus zeigte diese Studie, dass HPV nur bei einer geringen Anzahl von OSCC-Fällen nachweisbar ist. In der Literatur differiert die HPV-Positivitätsrate bei HNSCC von Studie zu Studie oft erheblich (Duray, Descamps et al. 2012). Es zeigt sich in der Literaturanalyse zudem, dass die hohe Anzahl an HPV-positiven HNSCC auf eine schlechte Differenzierung zwischen OSCC und OPSCC zurückzuführen ist (Ang, Harris et al. 2010, Zhao, Ang et al. 2012). Studien, die nur OSCC in ihre Bewertung einbezogen hatten, zeigten eine vergleichbar geringere Anzahl von HPV-positiven PECA, ähnlich wie in der vorliegenden Studie (Lingen, Xiao et al. 2013, Mirghani, Amen et al. 2015). Studien mit OPSCC-Patienten, insbesondere TSCC, weisen höhere HPV-Positivitätsraten auf (Marur, D'Souza et al. 2010). HPV hat einen selektiven Tropismus für das Epithel der Tonsillenkrypten (Syrjanen 2004). Die Interaktion zwischen HPV und verschiedenen Gewebetypen, insbesondere lymphatischem Gewebe in OPSCC, ist ein interessantes Thema für weiterführende Studien. HPV-positive OPSCC weisen bessere Ansprechraten in Hinblick auf adjuvante Therapiestrategien, wie eine adjuvante Bestrahlung oder antikörperspezifische Therapien, auf (Ziemann, Arenz et al. 2015). Die Auswertung, der in mehreren publizierten Studien verwendeten HPV-Nachweismethoden, lieferte eine zusätzliche Erklärung für die Vielzahl der HPV-positiven HNSCC-Fälle anderer Studien. Für die HPV-Erkennung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Wie oft diskutiert, ist die p16<sup>INK4a</sup>-Immunfärbung eine unzureichende Methode für die HPV-Detektion, die immer noch häufig angewandt wird (Ndiaye, Mena et al. 2014). Da dieses Protein auf vielfältige Weise mit dem Zellzyklus interagiert, ist es kein Prädiktor für den HPV-Status und hat einen niedrigen Vorhersagewert für eine HPV-Infektion (Nagai 1999). In der vorliegenden Studie wurde eine hohe Fehlerrate beobachtet, da einige Fälle, die p16<sup>INK4a</sup>-positiv waren zudem HPV-negativ waren. Bei Verwendung einer p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie als alleinige Methode wäre die Anzahl der falsch positiven HPV-positiven Patienten um 50% höher gelegen. Studien, die eine p16<sup>INK4a</sup>-Immunfärbung ohne andere Nachweismethoden anwendeten, wiesen eine höhere HPV-Infektionsrate auf (Walline, Komarck et al. 2013). Mit der Verwendung der PCR konnten vergleichbare Raten an HPV-positiven

Patienten, wie in der Literatur beschrieben, nachgewiesen werden (Walline, Komarck et al. 2013). Zusätzlich wurden die HPV-Subtypen mit dem LCD-Array detektiert. Die Verwendung der PCR und des LCD-Arrays bietet mehr Vorteile durch verlässliche Ergebnisse und einen besseren ökonomischen Aspekt als die Verwendung der Sanger-Sequenzanalyse (Krul, Van De Vijver et al. 1999). Mit der zusätzlichen Methode des LCD-Arrays konnten neben der Bestätigung der PCR-Ergebnisse weitere Informationen zum onkogenen Risikopotenzial der zugrunde liegenden HPV-Subtypen evaluiert werden. Der HPV-Subtyp 16 wurde in allen HPV-positiven Fällen als häufigster onkogener HPV-Subtyp nachgewiesen, der zuvor für OSCC bereits in der Literatur beschrieben war (Rettig, Wentz et al. 2015). Falsch positive Ergebnisse einer HPV-Infektion und eine Überschätzung der Anzahl der HPV-positiven Patienten konnten daher im Hinblick auf die hier dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Homogene Gruppen von Tumorpatienten sind eine wichtige Voraussetzung für einen sinnvollen Vergleich. Die vorliegende Studiengruppe zeigte homogene patienten- und tumorspezifische Eigenschaften in der HPV-positiven und -negativen Untergruppe, die Vergleiche ohne Bias zuließen (Gillison, Chaturvedi et al. 2015).

## **5. Schlussfolgerung und Ausblick**

Nach unserem besten Wissen sind die vorliegenden Studien die ersten, die eine ALDH1-Expression, die Interaktion von p16<sup>INK4a</sup> und dem HPV Status in einem großen OSCC Kollektiv bewerten. Die eingeschlossenen Studien weisen einige Einschränkungen auf. Hier ist der retrospektive Charakter der Untersuchungen und die alleinige Verwendung von FFPE-Gewebe zu nennen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass ALDH1 als prädiktiver CSCM für fortgeschrittene OSCC-Tumorstadien dienen kann und eine Überexpression ein Prädiktor für das Vorhandensein von klinisch nicht evidenter Lymphknotenmetastasen sein kann. Dies kann von großem klinischem Interesse sein, da eine Lymphknotenmetastasierung weder radiologisch noch klinisch während des gesamten Krankheitsverlaufs sicher prognostiziert werden kann. In der weiteren Studie wurde zudem die These bestätigt, dass der HPV-Status keinen Einfluss auf die Überlebensrate des OSCC hat. Zudem sollte die HPV-Detektion über eine PCR und nicht über den immunhistochemischen Nachweis von

p16<sup>INK4a</sup> erfolgen und die Therapie beim OSCC unabhängig vom HPV-Status entschieden werden sollte. Eine gesteigerte Expression von p16<sup>INK4a</sup> ist beim OSCC mit einem schlechteren Überleben assoziiert und kann als potentieller prädiktiver Marker für das Überleben dienen. Da p16<sup>INK4a</sup> im Zellzyklus deutliche Wechselwirkungen aufweist, sollten weitere Studien hierzu durchgeführt werden, um die verschiedenen Phasen des Zellzyklus beim OSCC zu beurteilen. Die eingeschlossenen Studien können als wegweisende Vorarbeiten betrachtet werden, die als Grundlage für zukünftige Studien dienen. Weiterführende Studien können sich auf die Evaluation der Invasionsfront bei OSCC-Zelllinien konzentrieren, um weiteres Verständnis im Bereich der EMT und damit auch der Lymphknotenmetastasierung und Tumorinvasion zu erlangen. Die Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> in OSCC ist ein vielversprechendes Zukunftsthema für laufende Studien, in denen das Migrationspotenzial bewertet wird.

## 6. Literaturverzeichnis

Al-Hashimi, I., M. Schifter, P. B. Lockhart, D. Wray, M. Brennan, C. A. Migliorati, T. Axell, A. J. Bruce, W. Carpenter, E. Eisenberg, J. B. Epstein, P. Holmstrup, M. Jontell, F. Lozada-Nur, R. Nair, B. Silverman, K. Thongprasom, M. Thornhill, S. Warnakulasuriya and I. van der Waal (2007). "Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **103 Suppl**: S25 e21-12.

Alamgeer, M., V. Ganju, B. Kumar, J. Fox, S. Hart, M. White, M. Harris, J. Stuckey, Z. Prodanovic, M. E. Schneider-Kolsky and D. N. Watkins (2014). "Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer." Breast Cancer Res **16**(2): R44.

Albers, A. E., T. K. Hoffmann, J. P. Klussmann and A. M. Kaufmann (2010). "[Prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus]." HNO **58**(8): 778-790.

Alrashdan, M. S., N. Cirillo and M. McCullough (2016). "Oral lichen planus: a literature review and update." Arch Dermatol Res **308**(8): 539-551.

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

Bargou, R. C., K. Jurchott, C. Wagener, S. Bergmann, S. Metzner, K. Bommert, M. Y. Mapara, K. J. Winzer, M. Dietel, B. Dorken and H. D. Royer (1997). "Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression." Nat Med **3**(4): 447-450.

Bauml, J., T. Y. Seiwert, D. G. Pfister, F. Worden, S. V. Liu, J. Gilbert, N. F. Saba, J. Weiss, L. Wirth, A. Sukari, H. Kang, M. K. Gibson, E. Massarelli, S. Powell, A. Meister, X. Shu, J. D. Cheng and R.

- Haddad (2017). "Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study." J Clin Oncol **35**(14): 1542-1549.
- Bednarz-Knoll, N., P. Nastaly, A. Zaczek, M. G. Stoupiec, S. Riethdorf, H. Wikman, V. Muller, J. Skokowski, J. Szade, A. Sejda, M. Welnicka-Jaskiewicz and K. Pantel (2015). "Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression." Oncotarget **6**(29): 26789-26803.
- Begum, S., D. Cao, M. Gillison, M. Zahurak and W. H. Westra (2005). "Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma." Clin Cancer Res **11**(16): 5694-5699.
- Begum, S., M. L. Gillison, M. A. Ansari-Lari, K. Shah and W. H. Westra (2003). "Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin." Clin Cancer Res **9**(17): 6469-6475.
- Bissinger, O., A. Kolk, E. Drecoll, M. Straub, C. Lutz, K. D. Wolff and C. Gotz (2017). "EGFR and Cortactin: Markers for potential double target therapy in oral squamous cell carcinoma." Exp Ther Med **14**(5): 4620-4626.
- Bissinger, O., A. Rau, S. Koerdt, K. D. Wolff, M. R. Kesting and C. Gotz (2017). "Evaluating tumour after care in oral squamous cell carcinoma: Insights into patients' health related quality of life." J Craniomaxillofac Surg **45**(2): 262-266.
- Burke, H. B. (2004). "Outcome prediction and the future of the TNM staging system." J Natl Cancer Inst **96**(19): 1408-1409.
- Carter, L., D. G. Rothwell, B. Mesquita, C. Snowton, H. S. Leong, F. Fernandez-Gutierrez, Y. Li, D. J. Burt, J. Antonello, C. J. Morrow, C. L. Hodgkinson, K. Morris, L. Priest, M. Carter, C. Miller, A. Hughes, F. Blackhall, C. Dive and G. Brady (2017). "Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer." Nat Med **23**(1): 114-119.
- Chen, Y. W., H. C. Chu, L. Ze-Shiang, W. J. Shiah, C. P. Chou, D. S. Klimstra and B. C. Lewis (2013). "p16 Stimulates CDC42-dependent migration of hepatocellular carcinoma cells." PLoS One **8**(7): e69389.
- Chiang, A. C. and J. Massague (2008). "Molecular basis of metastasis." N Engl J Med **359**(26): 2814-2823.
- Chung, C. H., J. S. Parker, G. Karaca, J. Wu, W. K. Funkhouser, D. Moore, D. Butterfoss, D. Xiang, A. Zanation, X. Yin, W. W. Shockley, M. C. Weissler, L. G. Dressler, C. G. Shores, W. G. Yarbrough and C. M. Perou (2004). "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression." Cancer Cell **5**(5): 489-500.
- Clarke, M. F. and M. Fuller (2006). "Stem cells and cancer: two faces of eve." Cell **124**(6): 1111-1115.
- Clay, M. R., M. Tabor, J. H. Owen, T. E. Carey, C. R. Bradford, G. T. Wolf, M. S. Wicha and M. E. Prince (2010). "Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase." Head Neck **32**(9): 1195-1201.
- Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower and N. J. Maitland (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.
- Culp, T. D., L. R. Budgeon and N. D. Christensen (2006). "Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor." Virology **347**(1): 147-159.
- D'Souza, G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W. M. Koch, W. H. Westra and M. L. Gillison (2007). "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer." N Engl J Med **356**(19): 1944-1956.

- Dalerba, P., R. W. Cho and M. F. Clarke (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." Annu Rev Med **58**: 267-284.
- Duray, A., G. Descamps, C. Decaestecker, M. Rimmelink, N. Sirtaine, J. Lechien, P. Ernoux-Neufcoeur, N. Bletard, J. Somja, C. E. Depuydt, P. Delvenne and S. Saussez (2012). "Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma." Laryngoscope **122**(7): 1558-1565.
- Elizondo, G., I. M. Medina-Diaz, R. Cruz, F. J. Gonzalez and L. Vega (2009). "Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBPbeta interaction." Biochem Pharmacol **77**(2): 248-257.
- Fakhry, C., W. H. Westra, S. Li, A. Cmelak, J. A. Ridge, H. Pinto, A. Forastiere and M. L. Gillison (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.
- Feng, D., C. Peng, C. Li, Y. Zhou, M. Li, B. Ling, H. Wei and Z. Tian (2009). "Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri." Oncol Rep **22**(5): 1129-1134.
- Ferrandina, G., G. Bonanno, L. Pierelli, A. Perillo, A. Procoli, A. Mariotti, M. Corallo, E. Martinelli, S. Rutella, A. Paglia, G. Zannoni, S. Mancuso and G. Scambia (2008). "Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **18**(3): 506-514.
- Ferris, R. L., G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A. D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E. E. Vokes, C. Even, F. Worden, N. F. Saba, L. C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W. J. Geese, J. Kopit, J. W. Shaw and M. L. Gillison (2016). "Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." N Engl J Med **375**(19): 1856-1867.
- Fouad, Y. A. and C. Aanei (2017). "Revisiting the hallmarks of cancer." Am J Cancer Res **7**(5): 1016-1036.
- Friedland, P., A. Thomas, A. Naran, B. Amanuel, F. Grieu-lacopetta, A. Carrello, G. Harnett, C. Meyer and M. Phillips (2011). "Human papillomavirus and gene mutations in head and neck squamous carcinomas." ANZ J Surg.
- Gillison, M. L., A. K. Chaturvedi, W. F. Anderson and C. Fakhry (2015). "Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." J Clin Oncol **33**(29): 3235-3242.
- Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha and G. Dontu (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Gipson, B. J., H. A. Robbins, C. Fakhry and G. D'Souza (2018). "Sensitivity and specificity of oral HPV detection for HPV-positive head and neck cancer." Oral Oncol **77**: 52-56.
- Glenny, A. M., S. Furness, H. V. Worthington, D. I. Conway, R. Oliver, J. E. Clarkson, M. Macluskey, S. Pavitt, K. K. Chan, P. Brocklehurst and C. E. Panel (2010). "Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy." Cochrane Database Syst Rev(12): CD006387.
- Goldenberg, D., A. Golz, A. Netzer, E. Rosenblatt, A. Rachmiel, R. F. Goldenberg and H. Z. Joachims (2001). "Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck." Am J Otolaryngol **22**(3): 197-205.
- Gonzalez-Moles, M. A., C. Scully and J. A. Gil-Montoya (2008). "Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation." Oral Dis **14**(3): 229-243.
- Gotz, C., O. Bissinger, C. Nobis, K. D. Wolff, E. Drecoll and A. Kolk (2018). "ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC." Biomed Rep **9**(4): 284-290.

- Gotz, C., E. Drecoll, M. Straub, O. Bissinger, K. D. Wolff and A. Kolk (2016). "Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma." Oncotarget **7**(47): 76704-76712.
- Halbritter, S. A., P. Spieler and M. M. Bornstein (2007). "[High risk lesions of the oral mucosa-- Diagnosis, therapy and follow-up in two cases]." Schweiz Monatsschr Zahnmed **117**(7): 730-745.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- He, K. F., L. Zhang, C. F. Huang, S. R. Ma, Y. F. Wang, W. M. Wang, Z. L. Zhao, B. Liu, Y. F. Zhao, W. F. Zhang and Z. J. Sun (2014). "CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma." Biomed Res Int **2014**: 838632.
- Hoesli, R., A. C. Birkeland, A. J. Rosko, M. Issa, K. L. Chow, N. L. Michmerhuizen, J. E. Mann, S. B. Chinn, A. G. Shuman, M. E. Prince, G. T. Wolf, C. R. Bradford, J. B. McHugh, J. C. Brenner and M. E. Spector (2018). "Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma." Oral Oncol **77**: 83-89.
- Holzmueller, R., K. Mantwill, C. Haczek, E. Rognoni, M. Anton, A. Kasajima, W. Weichert, D. Treue, H. Lage, T. Schuster, J. Schlegel, B. Gansbacher and P. S. Holm (2011). "YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma." Int J Cancer **129**(5): 1265-1276.
- Ikawa, M., C. C. Impraim, G. Wang and A. Yoshida (1983). "Isolation and characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes from usual and atypical human livers." J Biol Chem **258**(10): 6282-6287.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu and M. J. Thun (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.
- Jensen, S. B., K. Hindberg, T. Solomon, E. N. Smith, J. D. Lapek, Jr., D. J. Gonzalez, N. Latysheva, K. A. Frazer, S. K. Braekkan and J. B. Hansen (2018). "Discovery of novel plasma biomarkers for future incident venous thromboembolism by untargeted synchronous precursor selection mass spectrometry proteomics." J Thromb Haemost **16**(9): 1763-1774.
- Jiang, R., O. Ekshyyan, T. Moore-Medlin, X. Rong, S. Nathan, X. Gu, F. Abreo, E. L. Rosenthal, M. Shi, J. T. Guidry, R. S. Scott, L. M. Hutt-Fletcher and C. A. Nathan (2015). "Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis." J Oral Pathol Med **44**(1): 28-36.
- Jung, A., M. Schrauder, U. Oswald, C. Knoll, P. Sellberg, R. Palmqvist, G. Niedobitek, T. Brabletz and T. Kirchner (2001). "The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation." Am J Pathol **159**(5): 1613-1617.
- Kawano, T., S. Yanoma, Y. Nakamura, O. Shiono, T. Kokatu, A. Kubota, M. Furukawa and M. Tsukuda (2005). "Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer." Am J Otolaryngol **26**(5): 308-313.
- Keane, F. K., Y. H. Chen, B. A. Neville, R. B. Tishler, J. D. Schoenfeld, P. J. Catalano and D. N. Margalit (2015). "Changing prognostic significance of tumor stage and nodal stage in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx in the human papillomavirus era." Cancer **121**(15): 2594-2602.
- Knudsen, E. S., O. Dervishaj, C. G. Kleer, T. Pajak, G. F. Schwartz and A. K. Witkiewicz (2013). "EZH2 and ALDH1 expression in ductal carcinoma in situ: complex association with recurrence and progression to invasive breast cancer." Cell Cycle **12**(13): 2042-2050.
- Koch-Institut, Z. f. K. i. R. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.



Krul, E. J., M. J. Van De Vijver, E. Schuurin, R. W. Van Kanten, A. A. Peters and G. J. Fleuren (1999). "Human papillomavirus in malignant cervical lesions in Surinam, a high-risk country, compared to the Netherlands, a low-risk country." *Int J Gynecol Cancer* **9**(3): 206-211.

Kuffer, R. and T. Lombardi (2002). "Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN)." *Oral Oncol* **38**(2): 125-130.

La Porta, C. A., S. Zapperi and J. P. Sethna (2012). "Senescent cells in growing tumors: population dynamics and cancer stem cells." *PLoS Comput Biol* **8**(1): e1002316.

Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-648.

Larsen, S. R., J. Johansen, J. A. Sorensen and A. Krogdahl (2009). "The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma." *J Oral Pathol Med* **38**(8): 657-662.

Lee, C. C., H. C. Ho, Y. C. Su, C. H. Yu and C. C. Yang (2015). "Modified Tumor Classification With Inclusion of Tumor Characteristics Improves Discrimination and Prediction Accuracy in Oral and Hypopharyngeal Cancer Patients Who Underwent Surgery." *Medicine (Baltimore)* **94**(27): e1114.

Lingen, M. W., W. Xiao, A. Schmitt, B. Jiang, R. Pickard, P. Kreinbrink, B. Perez-Ordóñez, R. C. Jordan and M. L. Gillison (2013). "Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas." *Oral Oncol* **49**(1): 1-8.

Liu, H., M. Wang, N. Liang and L. Guan (2019). "PDCD2 sensitizes HepG2 cells to sorafenib by suppressing epithelial-mesenchymal transition." *Mol Med Rep*.

Lopez, J., A. Poitevin, V. Mendoza-Martinez, C. Perez-Plasencia and A. Garcia-Carranca (2012). "Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance." *BMC Cancer* **12**: 48.

Magni, M., S. Shammah, R. Schiro, W. Mellado, R. Dalla-Favera and A. M. Gianni (1996). "Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer." *Blood* **87**(3): 1097-1103.

Malinowsky, K., C. Wolff, B. Ergin, D. Berg and K. F. Becker (2010). "Deciphering signaling pathways in clinical tissues for personalized medicine using protein microarrays." *J Cell Physiol* **225**(2): 364-370.

Mannelli, G. and O. Gallo (2012). "Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers." *Cancer Treat Rev* **38**(5): 515-539.

Marur, S., G. D'Souza, W. H. Westra and A. A. Forastiere (2010). "HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic." *Lancet Oncol* **11**(8): 781-789.

Mihatsch, J., M. Toulany, P. M. Bareiss, S. Grimm, C. Lengerke, R. Kehlbach and H. P. Rodemann (2011). "Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity in vitro." *Radiother Oncol* **99**(3): 300-306.

Milanovic, M., D. N. Y. Fan, D. Belenki, J. H. M. Dabritz, Z. Zhao, Y. Yu, J. R. Dorr, L. Dimitrova, D. Lenze, I. A. Monteiro Barbosa, M. A. Mendoza-Parra, T. Kanashova, M. Metzner, K. Pardon, M. Reimann, A. Trumpp, B. Dorken, J. Zuber, H. Gronemeyer, M. Hummel, G. Dittmar, S. Lee and C. A. Schmitt (2018). "Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness." *Nature* **553**(7686): 96-100.

Mirghani, H., F. Amen, F. Moreau and J. Lacau St Guily (2015). "Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma?" *Oral Oncol* **51**(3): 229-236.

Morimoto, K., S. J. Kim, T. Tanei, K. Shimazu, Y. Tanji, T. Taguchi, Y. Tamaki, N. Terada and S. Noguchi (2009). "Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression." *Cancer Sci* **100**(6): 1062-1068.

- Mouneimne, G. and J. S. Brugge (2009). "YB-1 translational control of epithelial-mesenchyme transition." Cancer Cell **15**(5): 357-359.
- Mucke, T., J. Koschinski, K. D. Wolff, A. Kanatas, D. A. Mitchell, D. J. Loeffelbein, H. Deppe and A. Rau (2015). "Quality of life after different oncologic interventions in head and neck cancer patients." J Craniomaxillofac Surg **43**(9): 1895-1898.
- Nagai, M. A. (1999). "Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas." Braz J Med Biol Res **32**(7): 897-904.
- Nakao, Y., X. Yang, M. Yokoyama, A. Ferenczy, S. C. Tang, M. M. Pater and A. Pater (1997). "Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation." Br J Cancer **75**(10): 1410-1416.
- Ndiaye, C., M. Mena, L. Alemany, M. Arbyn, X. Castellsague, L. Laporte, F. X. Bosch, S. de Sanjose and H. Trottier (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.
- O'Rorke, M. A., M. V. Ellison, L. J. Murray, M. Moran, J. James and L. A. Anderson (2012). "Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis." Oral Oncol **48**(12): 1191-1201.
- O'Sullivan, B., J. P. Shah; and W. M. Lydiatt (2016). Head and Neck Cancer Staging and Prognosis: Perspectives of the UICC and the AJCC, Springer, Cham.
- Oguejiofor, K. K., J. S. Hall, N. Mani, C. Douglas, N. J. Stevin, J. Homer, G. Hall and C. M. West (2013). "The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma." Clin Oncol (R Coll Radiol) **25**(11): 630-638.
- Ohnishi, Y., H. Yasui, M. Nozaki and M. Nakajima (2018). "Molecularly-targeted therapy for the oral cancer stem cells." Jpn Dent Sci Rev **54**(2): 88-103.
- Okami, K., A. L. Reed, P. Cairns, W. M. Koch, W. H. Westra, S. Wehage, J. Jen and D. Sidransky (1999). "Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma." Oncogene **18**(23): 3541-3545.
- Pectasides, D., K. Kamposioras, G. Papaxoinis and E. Pectasides (2008). "Chemotherapy for recurrent cervical cancer." Cancer Treat Rev **34**(7): 603-613.
- Piechaczek, C. (2001). "Cd133." J Biol Regul Homeost Agents **15**(1): 101-102.
- Porter, C. K. (2009). "Head and neck cancer: public perceptions and new directions." Today's FDA **21**(8): 28-29, 31-23.
- Prince, M. E. and L. E. Ailles (2008). "Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer." J Clin Oncol **26**(17): 2871-2875.
- Qian, X., S. Wagner, C. Ma, J. P. Klussmann, M. Hummel, A. M. Kaufmann and A. E. Albers (2013). "ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status." Oncol Rep **29**(5): 1777-1784.
- Quezada, S. A., K. S. Peggs, M. A. Curran and J. P. Allison (2006). "CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells." J Clin Invest **116**(7): 1935-1945.
- Reid, P., P. Wilson, Y. Li, L. G. Marcu, A. H. Staudacher, M. P. Brown and E. Bezak (2017). "In vitro investigation of head and neck cancer stem cell proportions and their changes following X-ray irradiation as a function of HPV status." PLoS One **12**(10): e0186186.

- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." *Pathologie* **8**(3): 138-140.
- Rettig, E. M., A. Wentz, M. R. Posner, N. D. Gross, R. I. Haddad, M. L. Gillison, C. Fakhry, H. Quon, A. G. Sikora, W. J. Stott, J. H. Lorch, C. G. Gourin, Y. Guo, W. Xiao, B. A. Miles, J. D. Richmon, P. E. Andersen, K. J. Misiukiewicz, C. H. Chung, J. E. Gerber, S. D. Rajan and G. D'Souza (2015). "Prognostic Implication of Persistent Human Papillomavirus Type 16 DNA Detection in Oral Rinses for Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Carcinoma." *JAMA Oncol* **1**(7): 907-915.
- Reuschenbach, M., K. Kansy, K. Garbe, S. Vinokurova, C. Flechtenmacher, C. Toth, E. S. Prigge, O. C. Thiele, S. Reinert, J. Hoffmann, M. von Knebel Doeberitz and K. Freier (2013). "Lack of evidence of human papillomavirus-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in southern Germany." *Oral Oncol* **49**(9): 937-942.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.
- Romagosa, C., S. Simonetti, L. Lopez-Vicente, A. Mazo, M. E. Leonart, J. Castellvi and S. Ramon y Cajal (2011). "p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors." *Oncogene* **30**(18): 2087-2097.
- Sasahira, T. and T. Kirita (2018). "Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma." *Int J Mol Sci* **19**(8).
- Schafer, A., J. Teufel, F. Ringel, M. Bettstetter, I. Hoepner, M. Rasper, J. Gempt, J. Koeritzer, F. Schmidt-Graf, B. Meyer, C. P. Beier and J. Schlegel (2012). "Aldehyde dehydrogenase 1A1--a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma." *Neuro Oncol* **14**(12): 1452-1464.
- Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." *Exp Cell Res* **237**(1): 7-13.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." *Mutat Res* **576**(1-2): 22-38.
- Shin, D. M. and F. R. Khuri (2013). "Advances in the management of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck." *Head Neck* **35**(3): 443-453.
- Sritippho, T., S. Pongsirwet, N. Lertprasertsuke, K. Buddhachat, T. Sastraruji and A. Iamaroon (2016). "p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer?" *Asian Pac J Cancer Prev* **17**(8): 4049-4057.
- Stewart, G. D., J. Baird, F. Rae, J. Nanda, A. C. Riddick and D. J. Harrison (2011). "Utilizing mRNA extracted from small, archival formalin-fixed paraffin-embedded prostate samples for translational research: assessment of the effect of increasing sample age and storage temperature." *Int Urol Nephrol* **43**(4): 961-967.
- Straub, M., E. Drecoll, N. Pfarr, W. Weichert, R. Langer, A. Hapfelmeier, C. Gotz, K. D. Wolff, A. Kolk and K. Specht (2016). "CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Oncotarget* **7**(11): 12024-12034.
- Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" *Cancer* **110**(7): 1429-1435.
- Syrjanen, S. (2004). "HPV infections and tonsillar carcinoma." *J Clin Pathol* **57**(5): 449-455.
- Syrjanen, S. (2007). "Human papillomaviruses in head and neck carcinomas." *N Engl J Med* **356**(19): 1993-1995.

Takes, R. P., A. Rinaldo, C. E. Silver, J. F. Piccirillo, M. Haigentz, Jr., C. Suarez, V. Van der Poorten, R. Hermans, J. P. Rodrigo, K. O. Devaney and A. Ferlito (2010). "Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer." Head Neck **32**(12): 1693-1711.

Tang, A. L., S. J. Hauff, J. H. Owen, M. P. Graham, M. J. Czerwinski, J. J. Park, H. Walline, S. Papagerakis, J. Stoerker, J. B. McHugh, D. B. Chepeha, C. R. Bradford, T. E. Carey and M. E. Prince (2011). "UM-SCC-104: A New human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line." Head Neck.

Teixeira, M. G. and L. Correa (2018). "Quality Assessment of Prognostic Studies Using Cancer Stem Cell Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma." Appl Immunohistochem Mol Morphol **26**(5): e61-e69.

Walline, H. M., C. Komarck, J. B. McHugh, S. A. Byrd, M. E. Spector, S. J. Hauff, M. P. Graham, E. Bellile, J. S. Moyer, M. E. Prince, G. T. Wolf, D. B. Chepeha, F. P. Worden, M. H. Stenmark, A. Eisbruch, C. R. Bradford and T. E. Carey (2013). "High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods." JAMA Otolaryngol Head Neck Surg **139**(12): 1320-1327.

Wang, S. J., G. Wong, A. M. de Heer, W. Xia and L. Y. Bourguignon (2009). "CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression." Laryngoscope **119**(8): 1518-1530.

Westra, W. H. (2014). "Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas." Oral Oncol **50**(9): 771-779.

Wirth, L. J. (2016). "Cetuximab in Human Papillomavirus-Positive Oropharynx Carcinoma." J Clin Oncol **34**(12): 1289-1291.

Wolff, K. D., M. Follmann and A. Nast (2012). "The diagnosis and treatment of oral cavity cancer." Dtsch Arztebl Int **109**(48): 829-835.

Wu, J., L. Xue, M. Weng, Y. Sun, Z. Zhang, W. Wang and T. Tong (2007). "Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence." PLoS One **2**(1): e164.

Xu, J., S. Muller, S. Nannapaneni, L. Pan, Y. Wang, X. Peng, D. Wang, M. Tighiouart, Z. Chen, N. F. Saba, J. J. Beitler, D. M. Shin and Z. G. Chen (2012). "Comparison of quantum dot technology with conventional immunohistochemistry in examining aldehyde dehydrogenase 1A1 as a potential biomarker for lymph node metastasis of head and neck cancer." Eur J Cancer **48**(11): 1682-1691.

Young, R. J., D. Urban, C. Angel, J. Corry, B. Lyons, N. Vallance, S. Kleid, T. A. Iseli, B. Solomon and D. Rischin (2015). "Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma." Br J Cancer **112**(6): 1098-1104.

Zhang, Z., M. S. Filho and J. E. Nor (2012). "The biology of head and neck cancer stem cells." Oral Oncol **48**(1): 1-9.

Zhao, N., M. K. Ang, X. Y. Yin, M. R. Patel, K. Fritchie, L. Thorne, K. L. Muldrew, M. C. Hayward, W. Sun, M. D. Wilkerson, B. S. Chera, T. Hackman, A. M. Zanation, J. E. Grilley-Olson, M. E. Couch, W. W. Shockley, M. C. Weissler, C. G. Shores, W. K. Funkhouser, A. F. Olshan and D. N. Hayes (2012). "Different cellular p16(INK4a) localisation may signal different survival outcomes in head and neck cancer." Br J Cancer **107**(3): 482-490.

Ziemann, F., A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J. P. Klussmann, R. Engenhardt-Cabillic and A. Wittig (2015). "Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation +/- Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis." Am J Cancer Res **5**(3): 1017-1031.

## **7. Abbildungsverzeichnis**

Tabelle 1: Studienkohorte der Publikation „Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma“

Tabelle 2: Studienkohorte der Publikation „ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC“

## **8. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk, stellvertretender Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München. Er gab mir von Anfang an die Möglichkeit, meine Studienideen zu verwirklichen und Fuß in der Forschung der molekularen Onkologie zu fassen.

Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München, danke ich für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung einreichen zu dürfen.

Die Möglichkeit, pathologische Fragestellungen zu diskutieren und eine Einarbeitung in die Methodik der pathohistologischen Auswertung erhielt ich durch Frau Dr. med. Enken Drecolt und Frau Dr. med. Melanie Boxberg (geborene Straub), Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Im Labor wurde mir durch die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Daniela Hellmann und durch Frau Daniela Angermeier großartige Hilfe zuteil. In memoriam möchte ich auch Herrn Univ.-Professor Dr. Manfred Schmitt, ehemaliger Leiter der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München danken, da er mich einen Teil meiner Experimente in seinem Labor durchführen ließ.

Großen Dank spreche ich meiner Schwester und meiner Mutter für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit aus. Einen Ansporn für diese Arbeit erhielt ich auch durch meinen Vater. Er motivierte mich stets in herausragender Weise, die wissenschaftlichen Fragestellungen zu hinterfragen und die Studien weiterzuentwickeln. In memoriam widme ich ihm diese Arbeit in Dankbarkeit. Die vorliegende Arbeit möchte ich mit einem Zitat von Sir Peter MacCallum (1885-1974) schließen: „Nothing but the best is good enough in the treatment of cancer“.