

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
(Prof. Dr. med. D. Beutner)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **MicroRNAs, p16- und HPV-Status und transorale Lasermikrochirurgie im multimodalen Behandlungskonzept bei Oropharynxkarzinomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mahalia Zoe Anczykowski

aus

Frankfurt am Main

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. A. Schilling

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. A. Schilling

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 16.11.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "MicroRNAs, p16- und HPV-Status und transorale Lasermikrochirurgie im multimodalen Behandlungskonzept bei Oropharynxkarzinomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

**Ergebnisse, auf denen die vorliegenden Dissertationsarbeit basiert, wurden bereits in Fachzeitschriften publiziert und auf wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert.**

**Originalarbeiten:**

Weiss BG\*, Ihler F\*, **Anczykowski MZ**, Bertlich M, Kitz J, Steiner W, Canis M, Jakob M (2019b): Transoral laser microsurgery for treatment of oropharyngeal cancer in 368 patients. *Head Neck* 41, 3144-3158

Weiss BG, **Anczykowski MZ**, Flach S, Spiegel JL, Kitz J, Bertlich M, Canis M, Jakob M, Ihler F (2020b): Benefit of postoperative radiotherapy for early tumors with single ipsilateral lymph node metastasis. *Laryngoscope* 130, E530-E538

Weiss BG\*, **Anczykowski MZ\***, Kuffer S, Spiegel JL, Bertlich M, Canis M, Ihler F, Kitz J\*, Jakob M\* (2021): Prognostic impact of additional HPV diagnostics in 102 patients with p16-stratified advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 278, 1983-2000

Weiss BG\*, **Anczykowski MZ\***, Ihler F, Bertlich M, Spiegel JL, Haubner F, Canis M, Kuffer S, Hess J, Unger K, et al. (2022): MicroRNA-182-5p and microRNA-205-5p as potential biomarkers for prognostic stratification of p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* 33, 331-347

\*Autoren mit gleichem Beitrag

**Poster/Abstracts:**

Weiss BG, **Anczykowski MZ**, Canis M, Jakob M, Ihler F (2019a): Postoperative Radiotherapie bei Patienten mit lokal umschriebenen Tumoren (pT1 – 2) und singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastasierung (pN1). *Laryngorhinootologie* 98, S252-S253. Poster im Rahmen der 90. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn – Digitalisierung in der HNO-Heilkunde, Berlin, 29.05.2019 – 01.06.2019

Weiss BG, **Anczykowski MZ**, Canis M, Ihler F, Kitz J, Jakob M (2020): Prognostischer Stellenwert der zusätzlichen HPV-Genotypisierung in p16-stratifizierten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx fortgeschrittenen Stadiums. *Laryngorhinootologie* 99, S121. Poster im Rahmen der 91. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn – Welche Qualität macht den Unterschied, Berlin, 20.05.2020 – 23.05.2020

**Anczykowski MZ**, Ihler F, Bertlich M, Spiegel JL, Canis M, Unger K, Kitz J, Jakob M, Weiss BG (2022): MicroRNA-182-5p und microRNA-205-5p als potenzielle Biomarker zur weiteren prognostischen Stratifizierung von Patienten mit p16-positivem Oropharynxkarzinom. *Laryngorhinootologie* 101, S49-S50. Poster im Rahmen der 93. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn – Interface – Fokus Mensch im Zeitalter der technisierten Mensch, Hannover, 25.06.2022 – 28.06.2022



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Oropharynxkarzinome .....	1
1.1.1 Schwerpunktsetzung und Epidemiologie .....	1
1.1.2 Risikofaktoren, Pathogenese und molekulare Charakteristika .....	2
1.1.3 Klinische Präsentation .....	3
1.1.4 Diagnostik .....	4
1.1.5 Therapie .....	5
1.1.6 Prognose .....	8
1.2 Molekulare Biomarker .....	10
1.2.1 p16-/HPV-Status .....	10
1.2.2 MicroRNAs .....	10
1.3 Zielsetzung .....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Ethik .....	14
2.2 Material .....	14
2.3 Definition der Patientenkollektive (Ein- und Ausschlusskriterien) .....	15
2.3.1 Transorale Lasermikrochirurgie zur Primärtherapie von Oropharynx-karzinomen .....	15
2.3.2 Adjuvante Radio(chemo)therapie in einem TLM-basierten Therapiekonzept für pT1 – 2 pN1 ECS-negative HNSCCs .....	15
2.3.3 p16- und HPV-Status .....	16
2.3.4 miRNAs als Biomarker bei primären OPSCCs .....	16
2.4 Erhebung klinischer Daten und Behandlungskonzepte der untersuchten Patientenkollektive .....	18
2.4.1 Prätherapeutische Untersuchungen und Stadieneinteilung .....	18
2.4.2 Therapie .....	18
2.4.3 Funktionelle Ergebnisse, perioperatives Management und Komplikationen der chirurgischen Primärtherapie .....	22
2.4.4 Nachsorge .....	23
2.4.5 Alkohol- und Tabakkonsum .....	23
2.5 Experimentelle Datenerhebung, histologische und molekularbiologische .....	24
2.5.1 Probengewinnung und Gewebefixierung .....	24
2.5.2 Gewebeschnitte .....	24
2.5.3 Übersichtsfärbung und pathologische Routinediagnostik .....	25
2.5.4 Immunhistochemie zur Bestimmung des p16-Status .....	27
2.5.5 DNA-Extraktion und HPV-Genotypisierung .....	28
2.5.6 RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und MicroRNA-Quantifizierung .....	30

2.6	Statistik.....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Ergebnisse der TLM-Studie: Funktionelle und onkologische Ergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie in der Primärtherapie von Oropharynxkarzinomen .....	39
3.1.1	Patienten .....	39
3.1.2	TLM-basiertes Therapiekonzept.....	40
3.1.3	Onkologische Ergebnisse.....	40
3.1.4	Adjuvante Radio(chemo)therapie .....	43
3.1.5	Funktionelle Ergebnisse, Komplikationen und postoperatives Management .....	44
3.1.6	p16-Status .....	46
3.1.7	Aktuelle Literatur zu den gängigen Therapiestrategien für OPSCCs.....	49
3.2	Ergebnisse der pN1-Studie: Adjuvante Radio(chemo)therapie bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten, ECS-negativen Kopf-Hals-Karzinomen.....	54
3.2.1	Patienten und Therapiekonzepte .....	54
3.2.2	Onkologische Ergebnisse.....	57
3.2.3	Untergruppenanalysen.....	60
3.2.4	Aktuelle Literatur.....	63
3.3	Ergebnisse der p16-HPV-Studie: p16-Status und HPV-DNA-Nachweis bei OPSCCs .....	66
3.3.1	Patienten und Therapiekonzepte .....	66
3.3.2	p16-Expression und HPV-Typisierungsergebnisse .....	66
3.3.3	Onkologische Ergebnisse.....	71
3.3.4	Untergruppenanalysen zum Alkohol- und Tabakkonsum.....	77
3.3.5	Analyse weiterer, potenziell prognostisch relevanter Einflussfaktoren und multivariate Cox-Regression.....	80
3.3.6	Komplementäre Analysen für OPSCCs von Sublokationen mit potentiell ätiologischer Rolle von HPV (Tonsillen, Zungengrund).....	82
3.4	Ergebnisse der miRNA-Studie: MicroRNAs im Kontext von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Prognostik bei primären Oropharynxkarzinomen.....	84
3.4.1	Patienten- und Erkrankungscharakteristika und Therapiekonzepte .....	84
3.4.2	Onkologische Ergebnisse.....	86
3.4.3	Übersicht über die miRNA-Analysen .....	86
3.4.4	Expression von miR-182-5p und miR-205-5p malignem versus benignem Gewebe ...	87
3.4.5	miRNAs und Patienten-, Erkrankungs-, sowie Therapiecharakteristika .....	88
3.4.6	miRNAs zur prognostischen Stratifizierung .....	89
3.4.7	Potenziell prognostisch relevante Einflussfaktoren.....	93
3.4.8	Validierungsversuch .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1	TLM-Studie: Onkologische und funktionelle Langzeitergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie bei Oropharynxkarzinomen .....	97
4.1.1	p16-Status .....	98
4.1.2	TORS .....	99
4.1.3	Konventionelle Chirurgie und Möglichkeit zur plastischen Rekonstruktion.....	100
4.1.4	primäre Radio(chemo)therapie.....	100
4.1.5	Individualisierte Therapieempfehlungen und aR(C)T .....	101

---

4.1.6	Komplikationen, postoperatives Management und funktionelle Ergebnisse .....	102
4.1.7	Limitationen und Stärken der TLM-Studie .....	103
4.2	pN1-Studie: Nutzen der adjuvanten Radio(chemo)therapie bei lokal begrenzten Kopf-Hals-Karzinomen mit singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastase .....	104
4.2.1	Onkologische Ergebnisse.....	104
4.2.2	Untergruppenanalysen.....	105
4.2.3	Limitationen und Stärken der pN1-Studie .....	107
4.3	p16-HPV-Studie: Stellenwert des p16-Status und HPV-DNA-Nachweis als prognostische Biomarker bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen.....	108
4.3.1	p16- und HPV-Status .....	108
4.3.2	Onkologische Ergebnisse.....	110
4.3.3	Tabakkonsum.....	113
4.3.4	Limitationen, Stärken und Ausblick .....	114
4.4	miRNA-Studie: Potentielle Bedeutung von MicroRNAs als prognostische Biomarker bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx .....	116
4.4.1	miR-182.....	117
4.4.2	miR-205.....	119
4.4.3	miR-182-5p und miR-205-5p im TCGA-Kollektiv .....	120
4.4.4	Limitationen, Stärken und Ausblick .....	121
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>125</b>
6.1	Anhang pN1-Studie .....	125
6.2	Anhang p16-HPV-Studie .....	126
6.3	Anhang MicroRNA-Studie .....	132
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>137</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokale Kontrollrate bei OPSCCs stratifiziert nach den pT-Kategorien.....	42
Abbildung 2: Gesamt-, krankheitsspezifisches und rezidivfreies Überleben bei OPSCCs stratifiziert nach prognostischen Stadien. ....	42
Abbildung 3: Rezidivfreies Überleben und lokale Kontrollrate bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T. ....	44
Abbildung 4: Gesamtüberleben, krankheitsspezifisches und rezidivfreies Überleben bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem p16-Status. ....	48
Abbildung 5: Ereigniszeitanalysen bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen HNSCCs stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T. ....	59
Abbildung 6: Ereigniszeitanalysen bei pT1 pN1 und pT2 pN1, ECS-negativen HNSCCs stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T.....	62
Abbildung 7: Ereigniszeitanalysen für OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach p16-Status und HPV-Status kombiniert.....	74
Abbildung 8: Ereigniszeitanalysen für OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach p16-Status und Tabakkonsum. ....	79
Abbildung 9: Relative Expressionsänderung von miR-182-5p und miR-205-5p in OPSCCs im Vergleich zu den benignen Kontrollen. ....	88
Abbildung 10: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach miR-182-5p-Expression. ...	91
Abbildung 11: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach miR-205-5p-Expression. ...	92
Abbildung 12: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs des TCGA-Datensatzes stratifiziert nach der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p.....	96

### Abbildungen im Anhang

Abbildung A. 1: Ereigniszeitanalysen bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen HNSCCs für jede Hauptlokalisierung stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T. ....	125
Abbildung A. 2: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem HPV-Status.....	126
Abbildung A. 3: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem HPV-Status und Tabakkonsum. ....	127
Abbildung A. 4: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach dem p16-Status in der miRNA-Studie.....	136

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Terminologie der Neck-Dissection .....	20
Tabelle 2: Therapiekonzepte und eingeschlossene Patienten bezogen auf die Zeiträume der aR(C)T-Standardprotokolle und -Verfahren an der Universitätsmedizin Göttingen ...	22
Tabelle 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Eindeckung von Paraffinschnitten.....	26
Tabelle 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten.....	26
Tabelle 5: Immunhistochemische Färbung mit Antigen-spezifischen Primärantikörpern .....	28
Tabelle 6: Untersuchte miRNAs .....	35
Tabelle 7: Definition prognostischer Endpunkte.....	38
Tabelle 8: Verteilung von T- und N-Kategorie bei primär transoral lasermikrochirurgisch therapierten OPSCCs .....	39
Tabelle 9: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach pT-Kategorien und prognostischen Stadien .....	41
Tabelle 10: Distribution und Kaplan-Meier-Schätzungen bei fortgeschrittenen OPSCCs und Indikation zur adjuvanten Radio(chemo)therapie (pN+; pT3 – 4) .....	43
Tabelle 11: Postoperative Ernährungstherapie über nasogastrale und PEG-Sonden .....	45
Tabelle 12: Postoperative Komplikationen und anschließende Intervention.....	45
Tabelle 13: Klinisch-pathologische Charakteristika bei p16-positiven und p16-negativen OPSCCs .....	47
Tabelle 14: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs fortgeschrittener Erkrankungsstadien III – IVa, stratifiziert nach dem p16-Status .....	48
Tabelle 15: Studien zu Langzeitergebnissen kurativer Therapiestrategien bei OPSCCs.....	50
Tabelle 16: Klinisch-pathologische Charakteristika und Nachsorgedaten bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen OSCCs, OPSCCs oder HPSCCs stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T .....	56
Tabelle 17: Onkologische Langzeitergebnisse bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativ klassifizierten HNSCCs stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T .....	58
Tabelle 18: Studien zu onkologischen Langzeitergebnissen bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten HNSCCs mit oder ohne aR(C)T im primären Behandlungskonzept.....	64
Tabelle 19: Therapieversagen stratifiziert nach Hauptlokalisierung der Tumoren und Durchführung einer aR(C)T .....	65
Tabelle 20: HPV-Status und -Typisierung von OPSCCs stratifiziert nach dem p16-Status.....	67
Tabelle 21: Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten bei OPSCCs stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status.....	69
Tabelle 22: Rezidive, Fernmetastasen und Zweitumoren bei OPSCCs stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status.....	72
Tabelle 23: Studien zu onkologischen Langzeitergebnissen bei OPSCCs mit gegebenem p16- und HPV-Status .....	75
Tabelle 24: Prognostische Assoziationen von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika bei OPSCCs .....	80
Tabelle 25: Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status.....	83
Tabelle 26: Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika sowie Nachsorgedaten des Gesamt-kollektivs der miRNA-Studie sowie der entsprechend p16-Status stratifizierten Untergruppen .....	85
Tabelle 27: miR-182-5p- und miR-205-5p-Expression im Kontext der Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika .....	89
Tabelle 28: miR-182-5p und miR-205-5p und Prognose bei OPSCCs.....	90

Tabelle 29: Ereigniszeitanalysen im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika in der miRNA-Studie.....	94
--	----

### **Tabellen im Anhang**

Tabelle A. 1: HPV-Status und -Typisierung von OPSCCs der Tonsillenregion und des Zungengrundes stratifiziert nach dem p16-Status.....	128
Tabelle A. 2: Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds .....	129
Tabelle A. 3: Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds .....	131
Tabelle A. 4: Expression der getesteten miRNAs in OPSCCs verglichen mit benignen Kontrollen.....	132
Tabelle A. 5: miRNA-Expression im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose im Gesamtkollektiv.....	133
Tabelle A. 6: miRNA-Expression im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose in der p16-positiven Untergruppe .....	134
Tabelle A. 7: miRNAs im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose in der p16-negativen Untergruppe .....	135

## Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
aR(C)T	adjuvante Radio(chemo)therapie
ASCO	American Society of Clinical Oncology
c/pTNM	Einteilung nach klinischen ( <i>clinical</i> , c)/pathologischen (p) TNM-Kriterien
CDK2NA	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> , Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CI	<i>confidence interval</i> , Konfidenzintervall
Ct	<i>cycle threshold</i> , Schwellenzyklus
CT-Untersuchung	Computertomographie-Untersuchung
DSS	<i>disease-specific survival</i> , krankheitsspezifisches Überleben
ECS	<i>extracapsular spread</i> , extrakapsuläre Tumorausdehnung
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FF-Gewebe	<i>Fresh-frozen</i> -, gefrorenes Frischgewebe
FFPE-Gewebe	<i>Fresh-frozen-paraffin-embedded</i> -, Formalin-fixiertes-Paraffin-eingebettetes-Gewebe
FOSS	Functional Outcome Swallowing Scale
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCCs	<i>head and neck squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region
HPSCCs	<i>hypopharyngeal squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx
HPV	Humane Papillomaviren
HR	Hazard Ratio
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICD-10-GM	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems-10th Revision-German Modification, Internationale statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
LCR	<i>local control rate</i> , lokale Kontrollrate
LSCCs	<i>laryngeal squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome des Larynx
M	<i>distant metastasis</i> , Fernmetastasierung
miRNAs, miRs	MicroRNAs
MRT-Untersuchung	Magnetresonanztomographie-Untersuchung
N	<i>regional nodal metastasis</i> , regionäre Lymphknotenmetastasierung
N/A	<i>not available</i> , nicht verfügbar
ND	Halslymphknotenausräumung, Neck-Dissection
OPSCCs	<i>oropharyngeal squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome des Oropharynx
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
OSCCs	<i>oral squamous cell carcinomas</i> , Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle
PEG-Sonde	perkutan endoskopische Gastrostomiesonde
PFS	<i>progression-free survival</i> , progressionsfreies Überleben
pR(C)T	primäre Radio(chemo)therapie
qRT-PCR	<i>quantitative real-time-polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

---

RFS	<i>recurrence-free survival</i> , rezidivfreies Überleben
R-Status	postoperativen Resektionsstatus
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
T	<i>primary tumor</i> , Ausdehnung des Primärtumors
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TLM	transorale Lasermikrochirurgie
TORS	<i>transoral robotic surgery</i> , transorale roboterassistierte Chirurgie
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein P53</i>
UICC	Union Internationale Contre le Cancer



# 1 Einleitung

## 1.1 Oropharynxkarzinome

### 1.1.1 Schwerpunktsetzung und Epidemiologie

Karzinome der Kopf-Hals-Region bilden international die siebhäufigste neudiagnostizierte Malignomerkrankung (Jansen et al. 2021; Sung et al. 2021). Plattenepithelkarzinome (*squamous cell carcinoma*, SCCs) stellen mit > 90 % die größte histologische Gruppe. Meist handelt es sich um eine Entartung von Zellen der Mucosa von Lippe, Mundhöhle (*oral cavity squamous cell carcinomas*, OSCCs), Nasopharynx, Oropharynx (*oropharyngeal squamous cell carcinomas*, OPSCCs), Hypopharynx (*hypopharyngeal squamous cell carcinomas*, HPSCCs) oder Larynx (*laryngeal squamous cell carcinomas*, LSCCs) (Castellsague et al. 2016; Cooper et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf OPSCCs. Sie bilden etwa 12 – 14 % der Karzinome der Kopf-Hals-Region (Cooper et al. 2009) und koinzidieren zunehmend häufiger als andere Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (*head and neck squamous cell carcinomas*, HNSCCs) mit einem positiven Nachweis Humaner Papillomaviren (HPV) im Malignomgewebe (Castellsague et al. 2016; Wurdemann et al. 2017). In Deutschland ist zwischen 1999 und 2014 die altersstandardisierte Rate neudiagnostizierter OPSCCs angestiegen (Wittekindt et al. 2019). Ähnliches wurde für europäische Länder wie das Vereinigte Königreich Großbritannien, die Niederlanden, Dänemark und der Slowakei für den Zeitraum zwischen 1983 und 2002 berichtet (Chaturvedi et al. 2013). Von dem Inzidenzanstieg waren dabei vor allem Altersgruppen unter 60 Jahren betroffen (Chaturvedi et al. 2013), wobei ein anderes für eine persistierende orale HPV-Infektion prädisponierendes Sexualverhalten (beispielsweise höhere Häufigkeit von Oralverkehr und wechselnder Sexualpartner) ursächlich sein könnte (Chaturvedi et al. 2013; Gillison et al. 2008). Ein abnehmender Inzidenztrend von OPSCCs infolge einer bereits möglichen Impfung gegen verschiedene HPV-Genotypen wird frühestens für das Jahr 2060 erwartet (Gillison et al. 2015).

---

In der vorliegenden Arbeit wurde zur besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet, wobei alle Geschlechter gleichermaßen gemeint sind. Alle personenbezogenen Bezeichnungen sind somit als geschlechtsneutral zu erachten.

### 1.1.2 Risikofaktoren, Pathogenese und molekulare Charakteristika

Tabak-, Alkoholkonsum und eine persistierende HPV-Infektion gehören zu den relevantesten bekannten exogenen Risikofaktoren in der multikausalen Pathogenese von HNSCCs (D'Souza et al. 2007; Gillison et al. 2008).

Tabakkonsum allein erhöht das Risiko der Entwicklung eines Pharynxkarzinoms um mehr als das sechsfache (Gandini et al. 2008). Weiterhin ist unabhängig vom Tabakkonsum starker Alkoholkonsum mit einer Risikosteigerung um mehr als das fünffache assoziiert (Turati et al. 2013). Beides scheint dabei dosisabhängig (Blot et al. 1988; Turati et al. 2013) und in Kombination mindestens multiplikativ zu wirken (Blot et al. 1988; Hashibe et al. 2007). Etwa 4 % der HNSCCs wären durch Unterlassen von Alkoholabusus allein, weitere 33 % durch Unterlassen von Tabakkonsum allein und weitere 35 % durch Unterlassen von beidem vermeidbar (Hashibe et al. 2009).

Der weltweite Anteil von OPSCCs, die einer HPV-Infektion zugeschrieben werden, wird auf etwa 30 % (de Martel et al. 2017) bis 40 % geschätzt (Ndiaye et al. 2014). Die Prävalenz einer oralen HPV-Infektion bei Personen ohne Infektion mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus und/oder ohne Tumorleiden ist demgegenüber mit etwa 7,5 % deutlich niedriger (Wood et al. 2017). Bei HPVs handelt es sich um epithelotrope DNA-Viren, deren sogenannte frühe Region (*early-region*, E-Region) die regulativ wirkenden, frühen Proteine E1, E2 und E4 – 7, respektive deren späte Region (*late-region*, L-Region) die Strukturproteine des Viruskapsids L1 und L2 codiert (Graham 2017). Die Einteilung von HPVs erfolgt entsprechend Abweichungen im L1-Locus in verschiedene Genotypen (Bernard et al. 2010). Diese werden entsprechend ihres onkogenen Potentials in *High-* und *Low-Risk* Typen unterteilt (Tumban 2019). Wie auch bei HPV-assoziierten Karzinomen der anogenitalen Region (beispielsweise von Cervix Vulva, Vagina; Penis, Anus) prädominieren bei OPSCCs Infektionen mit dem *High-Risk* HPV-Genotyp 16 (HPV16) (Arbyn et al. 2012). Die Präsenz von Antikörpern gegen das virale Onkoprotein E6 dieses HPV-Genotyps ist dabei mit einem etwa 20- bis nahezu 100-fach erhöhten Risiko der Entwicklung eines OPSCCs assoziiert (Kreimer et al. 2019). Unklar ist, inwiefern HPV-Infektionen und Tabak- und/oder Alkoholkonsum miteinander interagieren und in Kombination das OPSCC-Risiko verändern (D'Souza et al. 2007; Gillison et al. 2008; Kreimer et al. 2020).

Auf molekularer Ebene wird bei nicht HPV-assoziierten HNSCCs eine Entwicklung in ausgedehnten, durch Einwirken von Noxen wie Alkohol und Tabak bereits molekular veränderten, jedoch makroskopisch noch unauffälligen, präneoplastischen Feldern des Schleimhautepithels angenommen (Califano et al. 1996; Gillison et al. 2008; Leemans et al. 2011). Konträr zu HPV-assoziierten Karzinomen sind diese HNSCCs häufiger mit Deletionen der kurzen Arme der Chromosomen 3 (3p), 9 (9p), und 17 (17p) (Braakhuis et al. 2004) sowie Inaktivierung des p53-codierenden Gens *Tumor protein P53 (TP53)* (Cancer Genome Atlas 2015) und des p16-codierenden des Gens *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

(*CDK2NA*) (Cancer Genome Atlas 2015) assoziiert. Demgegenüber werden Zellzyklusdysregulation und genomische Instabilität bei HPV-assoziierten Karzinomen typischerweise im Kontext der Integration anfänglich episomal vorliegender HPV-DNA in das Wirtsgenom (Braakhuis et al. 2004; Jeon et al. 1995), einer in Folge gesteigerten Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 (Jeon et al. 1995), Inhibition des als Wildtyp vorliegenden Proteins p53 (Andl et al. 1998; Cancer Genome Atlas 2015) und einer Inaktivierung des Retinoblastoma-Proteins (Dyson et al. 1989) sowie einer vermutlich dadurch induzierten Überexpression des Proteins p16 (Hara et al. 1996) diskutiert (Graham 2017; Leemans et al. 2011).

Die immunhistochemische Bestimmung der p16-Überexpression gilt als Surrogatmarker zur Differenzierung von HPV-assoziierten (p16-positiv) und nicht HPV-assoziierten OPSCCs (p16-negativ) (Gillison et al. 2019; Lewis et al. 2018). Zu den Vorteilen dieser Untersuchung gehören neben der hohen Sensitivität der Detektion einer E6/E7-Expression von *High-Risk* HPVs (Jordan et al. 2012) und der unabhängigen prognostischen Aussagekraft, die vergleichsweise einfache, reproduzierbare, ressourcensparende und breit verfügbare immunhistochemische Nachweismethodik (Jordan et al. 2012; Lewis et al. 2018; Lydiatt et al. 2017). Eine p16-Immunhistochemie wird bei HNSCCs aktuell ausschließlich in der Routinediagnostik bei der Erstdiagnose eines Karzinoms im Oropharynx (Fakhry et al. 2018; Lewis et al. 2018) sowie bei mindestens fraglich in Level II (kraniojugulär) oder III (mediojugulär) lokalisierten Lymphknotenmetastasen ausgehend von einem unbekanntem Primärtumor empfohlen (Fakhry et al. 2018; Lewis et al. 2018). Außerhalb des Oropharynx ist die klinische Relevanz einer (möglichen) HPV-Assoziation bei HNSCCs bisher unklar (Lewis et al. 2018).

### 1.1.3 Klinische Präsentation

Die klinische Präsentation von HNSCCs hängt eng mit der Karzinomtopografie zusammen. Bei OPSCCs werden ferner entsprechend der HPV-Assoziation signifikante Unterschiede beschrieben. Beispielsweise liegt das mediane Alter von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCCs mit etwa 57 Jahren etwa vier Jahre vor jenem von Patienten mit nicht HPV-assoziierten OPSCCs (O'Sullivan et al. 2016). Ferner ist die Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCCs stärker ausgeprägt und es fehlt meist ein vorausgehender ausgedehnter Noxenkonsum (Ang et al. 2010; O'Sullivan et al. 2016). Darüber hinaus besteht die initiale Beschwerdesymptomatik bei HPV-assoziierten OPSCCs häufiger in einer Raumforderung im Bereich der Halsweichteile (56,1 % vs. 22,2 %) (Khalid et al. 2019), wohingegen Halsschmerzen (11,1 % vs. 29,6 %) und andere lokale Symptome wie Schluckstörungen (4,4 % vs. 18,5 %) in einer höheren Frequenz bei nicht HPV-assoziierten OPSCCs auftreten (Khalid et al. 2019). Korrespondierend dazu findet sich bei HPV-assoziierten OPSCCs meist bereits eine ausgedehntere Metastasierung in die regionären Lymphknoten (N2/3 79,6 % vs. 62,9 %), wohingegen nicht HPV-

assoziierte OPSCCs typischerweise einen fortgeschrittenen Lokalbefund (T3 – 4 55,6 % vs. 36,0 %) aufweisen (O'Sullivan et al. 2016). Weiterhin ist bei HPV-assoziierten OPSCCs häufiger eine multiple Fernmetastasierung vorzufinden (Huang et al. 2012), wobei sowohl bei HPV-assoziierten als auch bei nicht HPV-assoziierten OPSCCs am häufigsten die Lunge das primäre Metastasierungsorgan darstellt (Huang et al. 2012).

Anatomisch scheinen insbesondere Karzinome der Tonsillenregion und des Zungengrunds mit einer HPV-Infektion einherzugehen (Andl et al. 1998; Castellsague et al. 2016; Gillison et al. 2000; Paz et al. 1997), wobei das spezialisierte Epithel in der Tiefe der lingualen und palatinalen Tonsillenkrypten einen wichtigen Faktor in der Etablierung einer persistierenden HPV-Infektion und Immunevasion der Wirtszellen darstellen könnte (Lyford-Pike et al. 2013).

#### 1.1.4 Diagnostik

Bei Verdacht auf das Vorhandensein eines OPSCCs ist eine histopathologische Diagnosesicherung stets anzustreben (Mehanna et al. 2016a). Das diagnostische Procedere wird durch Untersuchungen zur möglichst exakten Erhebung des Erkrankungsausmaßes sowie weiterer therapeutischer Determinanten wie beispielsweise der Therapiefähigkeit des Patienten und dem Ausschluss simultaner Karzinome komplettiert (Mehanna et al. 2016a; Pfister et al. 2020).

Im Sinne des klinischen und wissenschaftlichen Diskurses hat sich die Klassifikation der lokalen Tumorausdehnung (T), des regionären Lymphknotenbefalls (N) und einer eventuellen Fernmetastasierung (M) nach klinischen oder pathologischen TNM-Kriterien (c/pTNM) der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Brierley et al. 2017; Sobin et al. 2010) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Amin et al. 2017; Edge und American Joint Committee on Cancer. 2010) etabliert (Mehanna et al. 2016a; Pfister et al. 2020). Die TNM-Klassifikation stellt wiederum die wesentliche Komponente zur Bestimmung der prognostischen Stadien dar (Amin et al. 2017; Brierley et al. 2017; Edge und American Joint Committee on Cancer. 2010; Sobin et al. 2010), wobei fortgeschrittene Stadien prognostisch ungünstiger angesehen werden (Wurdemann et al. 2017). Mithilfe der Kriterien der UICC/AJCC wird neben dem postoperativen Resektionsstatus (R-Status) auch Tumorcharakteristika wie extrakapsuläre Tumorausdehnung (*extracapsular spread*, ECS), Lymphgefäß- und/oder Veneninvasion einheitlich dokumentiert (Amin et al. 2017; Brierley et al. 2017; Sobin et al. 2010).

Seit der Einarbeitung in die Kriterien der 2017, und daher nach Beendigung der Einschlusszeiträume der vorliegenden Arbeit, veröffentlichten achten Edition der Kriterien der UICC (Brierley et al. 2017)/AJCC (Amin et al. 2017) wird die Evaluation des ECS, der p16-Überexpression und die Relevanz der exakten Anzahl multipler befallener Lymphknoten

für die Routinediagnostik bei OPSCCs gefordert (Fakhry et al. 2018; Lewis et al. 2018; Lydiatt et al. 2017).

### 1.1.5 Therapie

Behandlungsempfehlungen werden bei HNSCCs in interdisziplinären Konferenzen an der TNM-Klassifikation der Tumormanifestation orientiert und patientenindividuell erarbeitet und im Einklang mit dem Patientenwillen festgelegt (Pfister et al. 2020). Die Optimierung der onkologischen Sicherheit, des anatomischen und funktionellen Organerhalts, der Komplikationsrate sowie der gesundheitsbezogenen Lebensqualität bilden dabei allgemeine Ziele in der onkologischen Therapie und Forschung.

Kurative Therapiekonzepte basieren entweder auf einer primären Radiotherapie (pRT) kombiniert mit Chemotherapie (pRCT) kombiniert mit Chemotherapie (pRCT) und/oder dem therapeutischen Antikörper sowie gegen den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) Cetuximab oder einem primär chirurgischen Vorgehen (Culie et al. 2021; Pfister et al. 2020). Bezogen auf die onkologische Sicherheit werden beide kurative Optionen dabei bei den meisten HNSCCs als weitgehend vergleichbar effektiv angesehen (Dhanireddy et al. 2019; Pfister et al. 2020; Sinha et al. 2018), wobei diesbezüglich bisher kaum randomisierte kontrollierte Studie vorliegen (Culie et al. 2021; Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study et al. 1991).

Zur chirurgischen Behandlung des lokalen Primärtumors existieren differierende Operationsverfahren, welche über einen transoralen oder transzervikalen Zugang durchgeführt werden. Abhängig von Tumorgröße und Lymphknotenbefall können diese, falls indiziert, durch eine Halslymphknotenausräumung (Neck-Dissection, ND), rekonstruktionschirurgische Eingriffe und/oder adjuvante Radio(chemo)therapie ergänzt werden (Moncrieff et al. 2009; Spiegel et al. 2019; Steiner et al. 2003; Viros Porcuna et al. 2020). Bei lokal und/oder regional fortgeschrittener Erkrankung wird dabei eine multimodale Therapie bestehend aus Operation mit adjuvanter Radio-, und bei Präsenz bestimmter Risikofaktoren auch, Chemotherapie empfohlen (Pfister et al. 2020). Eine alleinige Chemotherapie ist bei OPSCCs dem palliativen Kontext vorbehalten (Pfister et al. 2020).

#### 1.1.5.1 Chirurgie — Transorale Lasermikrochirurgie

Die transorale Lasermikrochirurgie (TLM) wurde von Strong und Jako erstmalig zur möglichst funktionserhaltenden Therapie begrenzter Larynxveränderungen angewendet (Strong und Jako 1972). Herrn Professor Steiner und Kollegen ist maßgeblich die Erweiterung des Indikationsspektrums der TLM auch auf umschriebene sowie lokal fortgeschrittene Malignome und alle Lokalisationen des oberen Aerodigestivtrakts zu verdanken (Ambrosch 2003; Canis et al. 2015; Moore und Hinni 2013; Steiner 1988; Steiner et al. 2003; Weiss et al. 2017). Inzwischen hat sich die TLM in mehreren Zentren zu einer

Therapieoption etabliert (Dalton et al. 2020; Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009; Rogers et al. 2016).

Die TLM basiert auf einer Entfernung des Tumors mittels eines CO<sub>2</sub>-Lasers als Schneideinstrument, wobei insofern erforderlich, eine mikroskopisch kontrollierte, stückweise Durchtrennung des Tumors ähnlich einem Mosaik erfolgt, der sogenannten „Piece-Meal-Technik“ (Ambrosch 2003; Ambrosch et al. 1994; Steiner 1988). Zur Optimierung des transoralen Zugangs, der Manövrierbarkeit und Visualisierung sowie des Gewebeschutzes werden verschiedene Zangen, Retraktoren und Laryngo-Pharyngoskope eingesetzt (Ambrosch 2003; Canis et al. 2015; Steiner et al. 2003). Die stetige Einsehbarkeit des Operationsgebiets stellt dabei eine wichtige Voraussetzung für die notwendige (Jackel et al. 2007; Strong und Jako 1972) intraoperative Darstellung und Inspektion der lateralen und basalen Karzinomausdehnung dar. Das Ziel ist eine vollständige Entfernung unter Wahrung des Sicherheitsabstands und gleichzeitiger maximaler Schonung des nicht-befallenen Gewebes zu ermöglichen (Ambrosch et al. 1994; Steiner et al. 2001). Eine präzisere Gewebedifferenzierung wird dabei durch die mikroskopische Evaluation des Schneideverhaltens des Lasers (unter anderem stärkere Karbonisation bei der Durchtrennung von Tumorgewebe) erzielt (Ambrosch et al. 1994; Steiner et al. 2001). Zudem führt die thermische Wirkung des Lasers durch die simultane Verödung kleiner Gefäße nicht nur zu blutärmeren Operationsbedingungen (Ambrosch 2003; Strong und Jako 1972) und damit mitunter optimierten Visualisierung des Operationsgebiets (Mihashi et al. 1976; Steiner 1988), sondern scheint auch zur Verhinderung der metastatischen Dissemination von Tumorzellen zu verhindern (Mihashi et al. 1976; Wiegand et al. 2013).

Eine offene, nicht durch eine Lappenplastik verschlossene Abtragungsstelle ermöglicht eine vergleichsweise unkomplizierte bedarfsgerechte Erweiterung des Resektionsausmaßes bei primär unzureichenden Resektionsrändern (Ambrosch et al. 1994; Jackel et al. 2007; Steiner et al. 2003). Der auch bei einer größeren Wundhöhle angestrebte primärer Wundschluss geht zwar mit einem höheren postoperativen Blutungsrisiko einher, verspricht jedoch auch zu einem besseren Funktionserhalt beizutragen (Ambrosch 2003; Steiner et al. 2003). Nichtsdestotrotz lässt sich die Tumorsektion mittels TLM auch mit Verfahren der Rekonstruktionschirurgie kombinieren (Spiegel et al. 2019).

Als weiteres minimalinvasives Verfahren hat die transorale roboterassistierte Chirurgie (*transoral robotic surgery*, TORS) Einzug in die operativen Therapiemöglichkeiten bei OPSCCs gefunden. Verfügbare Daten zur TORS beziehen sich vor allem auf die Ergebnisse bei lokal begrenzten Tumoren (Golusinski und Golusinska-Kardach 2019; Ibrahim et al. 2019). Roboterassistierte Operationssysteme werden in Europa bisher vorrangig in spezialisierten Zentren angeboten (Bohm et al. 2021).

### 1.1.5.2 Adjuvante Therapie

Eine adjuvante Radio(chemo)therapie (aR(C)T) erfolgt vorrangig bei Karzinomen mit fortgeschrittener lokaler Ausdehnung, Lymphknotenmetastasierung und/oder prognostisch ungünstigen Merkmalen wie positivem R-Status und/oder ECS (Ang et al. 2001; Bernier et al. 2005; Harari et al. 2014; Koyfman et al. 2019; Quon et al. 2017). Eine konkomitante, vorzugsweise platinbasierte Chemotherapie wird dabei im Sinne einer Radiosensibilisierung (Pfister et al. 2020) zur Verbesserung der lokoregionären Kontrolle sowie zur Verbesserung des Gesamtüberlebens und progressionsfreien Überlebens eingesetzt (Bernier et al. 2004; Quon et al. 2017).

Demonstriert wurde die Effektivität einer aR(C)T in prospektiv randomisierten Studien bei HNSCCs im Stadium III – IV (Bernier et al. 2004; Cooper et al. 2004). Demgegenüber fundiert sich die wissenschaftliche Evidenz rationaler Therapieempfehlungen zur aR(C)T bei Karzinomen mit umschriebener lokaler Ausdehnung (pT1 – 2), einer einzigen ipsilateralen Lymphknotenmetastase (pN1) und ohne ECS (ECS-negativ) bisher im Wesentlichen auf eine begrenzte Zahl ausschließlich retrospektiver Arbeiten (Barry et al. 2017; Chen MM et al. 2016; Chen TC et al. 2010; Jackel et al. 2008; Kadletz et al. 2018; Shrime et al. 2010). Dementsprechend existiert für diese Fälle bisher weder eine starke Empfehlung für noch gegen eine aR(C)T (Koyfman et al. 2019; Roman et al. 2017).

### 1.1.5.3 Funktionelle Ergebnisse

Der Ororopharynx ist als Teil des oberen Aerodigestivtrakts einerseits bei einer Raumforderung durch den Primärtumor selbst (Khalid et al. 2019) und andererseits bei therapieassoziierten Nebenwirkungen wie einer ödematöse Schwellung für funktionelle Probleme prädisponiert (Xu S et al. 2021). Dies kann wiederum Malnutrition, Behandlungsunterbrechung und Morbidität mitbedingen und so zur Limitierung des therapeutischen Ergebnisses einschließlich der Lebensqualität der Patienten beitragen (Pfister et al. 2020). Als Indikatoren für die funktionellen Ergebnisse verschiedener Therapiemodalitäten werden durchgeführte Tracheotomien und Informationen zum Ernährungsmanagement wie beispielsweise Erfordernis und Dauer von Ernährungssonden herangezogen (Ibrahim et al. 2019; Moore et al. 2012; Van Abel et al. 2019). Eine Atemwegssicherung mittels Tracheotomie kommt dabei im Kontext von Tumoroperationen in der Kopf-Hals-Region nicht nur zur Therapie, sondern auch zur primären Prävention einer potentiell letalen und nur bedingt zu prognostizierenden postoperativen Atemwegsobstruktion durch Schwellung oder Blutung zum Einsatz (Nichols et al. 2019; Xu S et al. 2021). Darüber hinaus kann eine Tracheotomie auch die Rehabilitation einer gestörten Schluckfunktion erleichtern (Stelmes et al. 2019). Die präventive Anlage einer Ernährungssonde wird bei Risikofaktoren wie einem prätherapeutisch starken Gewichtsverlust, erheblicher Aspirationsneigung und/oder Dysphagie empfohlen (Pfister et al. 2020), wohingegen sie in anderen Fällen reaktiv durchgeführt werden sollte (Pfister et al.

2020). Die Platzierung einer Magensonde erfolgt vorrangig bei temporär (< 28 Tagen) zu erwartenden funktionellen Problemen wie beispielsweise nach der Resektion eines lokal fortgeschrittenen Karzinoms und einem dementsprechend größeren Resektionsvolumen insbesondere in der Phase der Wundheilung. Demgegenüber findet eine endoskopisch perkutan durch die Bauchdecke platzierte Ernährungssonde (PEG-Sonde) typischerweise bei einer längerfristig (> 28 – 56 Tage) bestehenden oder zu erwartenden Malnutrition Anwendung (Ackerman et al. 2018).

### 1.1.6 Prognose

Die altersstandardisierte Fünf-Jahres-Überlebensrate ist basierend auf Krebsregisterdaten für Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome insgesamt in Deutschland über die Diagnosejahre 1999 – 2017 um etwa sieben Prozent für Männer und vier Prozent für Frauen auf 53,2 % respektive 63,3 % gestiegen (Jansen et al. 2021). Dabei liegen die altersstandardisierten Fünf-Jahres-Überlebensraten bei Tonsillenkarcinomen mit 60,6 % bei Männern und 67,7 % bei Frauen deutlich über jenen von Zungengrundkarzinomen (Männer und Frauen jeweils 52,8 %) und jener bei Karzinomen anderer oropharyngealer Sublokalisationen (Männer: 37,3%; Frauen: 42,6 %) (Jansen et al. 2021). Die günstigere Prognose von Tonsillenkarcinomen wird auch im Kontext mit der in Abschnitt 1.1.3 erläuterten Prädisposition dieser Sublokalisation für eine HPV-Assoziation diskutiert (Pulte und Brenner 2010). Trotz häufigerer und mitunter ausgedehnterer Metastasierung (Ang et al. 2010; O'Sullivan et al. 2016), schlechter oder fehlender Differenzierung der Karzinomzellen (Andl et al. 1998) werden diese gegenüber nicht HPV-assoziierten, typischerweise mit stärkerem Tabakkonsum assoziierten HNSCCs als prognostisch günstiger erachtet (Andl et al. 1998; Ang et al. 2010; Fakhry et al. 2008; Fakhry et al. 2014; Gillison et al. 2008; Kreimer et al. 2020; Lewis et al. 2018). Eine Studie aus den USA beschrieb ein Drei-Jahres-Gesamtüberleben von 82,4 % bei HPV-positiven und von 57,1 % bei HPV-negativen OPSCCs (Ang et al. 2010). Ferner ergab sich in einer Studie aus Deutschland für Patienten mit OPSCCs insgesamt ein Fünf-Jahres-Gesamtüberleben von 54,5 % und nach Stratifizierung entsprechend der HPV-Assoziation von 82,8 % bei OPSCCs mit positivem p16- und HPV-Status respektive von 45,5 % bei jenen mit p16- und/oder HPV-negativem Status (Wurdemann et al. 2017).

Die bessere Prognose HPV-assoziiertter OPSCCs könnte dabei mitunter sowohl auf patientenassoziierte (unter anderem geringeres Alter, geringere Noxenexposition) (Ang et al. 2010) als auch auf tumorassoziierte Charakteristika wie beispielsweise ein initial lokal begrenzterer Primärtumor (O'Sullivan et al. 2016) und ein besseres Ansprechen gegenüber Radiochemotherapie (Fakhry et al. 2008) infolge einer meist höheren Expression des Apoptose induzierenden Tumorsuppressor-Proteins p53 (Kimple et al. 2013) zurückzuführen sein (Kreimer et al. 2020; Paver et al. 2020). Die typischen Patientencharakteristika und das überlegene Langzeitüberleben dürften aktuell und zukünftig



eine besondere Bedeutung einer Toxizitätsreduktion unter Wahrung oder Verbesserung guter onkologischer Resultate insbesondere bei HPV-assoziierten OPSCCs mitbegründen (Kreimer et al. 2020; Paver et al. 2020).

Es wird jedoch auch auf die Möglichkeit eines untypischen und sehr aggressives Krankheitsverhaltens HPV-assoziiierter OPSCCs hingewiesen (Alabi und O'Neill 2020). Beispielsweise sind bestimmte HPV-Genotypen (Chatfield-Reed et al. 2020; No et al. 2015), ECS (Shevach et al. 2017), Tabak- (Ang et al. 2010; Hoffmann et al. 2018; Lin et al. 2013) und Alkoholkonsum (Lin et al. 2013) bei HPV-assoziierten HNSCCs/OPSCCs mit einer Prognoseeinschränkung assoziiert. Im Sinne einer zukünftig adäquaten prognostischen und individuellen Adaptation der Behandlungsintensität resultiert die Notwendigkeit der Identifikation zusätzlicher prognostischer Determinanten und Marker, welche eine weitere Präzisierung und prognostische Stratifizierung erlauben (Kreimer et al. 2020).

## 1.2 Molekulare Biomarker

Molekulare Biomarker sind objektiv quantifizierbare biologische Indikatoren physiologischer, pathologischer und/oder durch eine Intervention induzierter Prozesse. Dienen sie prätherapeutisch ohne Berücksichtigung einer Behandlung zur prognostischen Einordnung des wahrscheinlichen Krankheitsverhaltens, werden sie als prognostische Biomarker bezeichnet (Antoniou et al. 2016).

### 1.2.1 p16-/HPV-Status

Die Einführung des Markers p16 in die achte Auflage der Algorithmen der UICC (Brierley et al. 2017)/AJCC (Amin et al. 2017) steht im Einklang mit den erläuterten demographischen (Abschnitt 1.1.1), molekularen (Abschnitt 1.1.2), klinischen (Abschnitt 1.1.3) und prognostischen (Abschnitt 1.1.6) Unterschieden zwischen HPV-assoziierten und nicht HPV-assoziierten OPSCCs (Lydiatt et al. 2017).

Arbeiten legen darüber hinaus verschiedene Konstellationen, welche sich aus der Kombination beider Marker, dem HPV-Status und dessen eigentlichen Surrogats p16 ergeben, als eine mögliche Option zur Identifizierung weiterer, potentiell prognostisch relevanter Untergruppen von OPSCCs nahe (Albers et al. 2017; Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Park K et al. 2013; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019).

### 1.2.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs, miRs) stellen ebenfalls potentielle Marker dar, welche die Implementierung einer gezielteren und stärker personalisierten, onkologischen Betreuung von Patienten mit OPSCCs unterstützen könnten. Sie könnten darüber hinaus detailliertere Informationen über die Diversität (Abschnitt 1.2.1) zwischen HPV/p16-positiven und HPV/p16-negativen OPSCCs geben (Bersani et al. 2018; Emmett et al. 2018; Gao et al. 2013; Iorio und Croce 2012; Quabius et al. 2017; Saleh et al. 2019; Yi et al. 2020).

Bei miRNAs handelt es sich dabei um etwa 22 Nukleotide lange RNA-Einzelstränge (Griffiths-Jones 2004; Iorio und Croce 2012). Diese werden entsprechend ihrer Herkunft vom 3'- oder 5'-Sequenzarm ihres Vorläufers (*Precursors*) mit „-3p“ oder „-5p“ hinter ihrer numerischen Bezeichnung gekennzeichnet. Die numerische Bezeichnung folgt dabei wesentlich entsprechend der sequenziellen Entdeckungsabfolge und Sequenz-übereinstimmung mit zuvor entdeckten miRNAs. Sequenzen mit maximal zwei unterscheidenden Nukleotiden werden mit alphabetischen Suffixen gekennzeichnet (beispielsweise miR-29a, miR-29b, miR-29c) (Griffiths-Jones 2004).

Funktionell vermögen miRNAs durch Hybridisierung mit komplementären Sequenzen von mRNAs epigenetisch die Expression mehrerer Gene und somit zellbiologische Prozesse wie beispielsweise Differenzierung, Stress-Ansprechen, Proliferation und Apoptose zu beeinflussen (Iorio und Croce 2012).

Abweichungen in der Expression bestimmter miRNAs sind dabei mit der Karzinogenese, Progression, dem immunologischen und therapeutischen Verhalten von Malignomen (Iorio und Croce 2012; Yi et al. 2020), aber auch mit viralen Infektionen wie beispielsweise mit HPV (Chen J et al. 2019; McKenna et al. 2014) assoziiert.

Gemeinsam mit ihrer stabilen gewebespezifischen Expression, zuverlässigen Quantifizierbarkeit in klinischen Proben und bereits gezeigter möglicher diagnostischer, prognostischer und prädiktiver Implikationen stellen sie für diverse Karzinome, darunter OPSCCs, attraktive potenzielle therapeutische Ziele und Biomarker da (Hess AK et al. 2017; Hess J et al. 2019; Iorio und Croce 2012; Jakob et al. 2019; Yu et al. 2017).

Für miR-223 wurde beispielsweise eine Korrelation mit dem HPV-Status von OPSCCs (Gao et al. 2013), eine inverse Assoziation mit der Vaskularisierung von Tumorgewebe sowie eine Assoziation mit einer Resistenz gegenüber den bei HSNCCs gängigen Chemotherapeutika Cisplatin, Doxetaxel, 5-Fluorouracil (Pfister et al. 2020) sowie den therapeutischen Antikörper Cetuximab (Bozec et al. 2017) beschrieben. Somit könnte die Modulation dieser miRNA ein potentielles pharmakologisches Ziel und ihre Quantifizierung im klinischen Management einen Biomarker darstellen. Darüber hinaus wurden als potentielle Marker für eine günstigere Prognose beispielsweise bereits folgende miRNAs identifiziert: miR-29c-3p für das rezidivfreie Überleben (*recurrence-free survival*, RFS) bei HNSCCs (Hudcova et al. 2016), miR-30e-5p für das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS), das krankheitsspezifische Überleben (*disease-specific survival*, DSS), bei HNSCCs, vor allem OPSCCs (Saleh et al. 2019), miR-34c-5p für das DSS und Rezidivaufreten bei LSCCs (Re et al. 2017), miR-99a-5p und miR-143-3p jeweils für das OS bei OSCCs (Jakob et al. 2019), miR-146a für das OS bei OPSCCs (Gao et al. 2013; Wong et al. 2016) sowie das OS nach pRCT bei OPSCCs (Hess AK et al. 2017), miR-149 für das OS bei LSCCs (Xu Y et al. 2016) sowie miR-182 kombiniert mit miR-107, miR-151, miR-361 und Herabregulation von miR-20b für das DSS bei OPSCCs (Hui et al. 2013). Demgegenüber deuteten vorausgehenden Studien für verschiedene miRNAs auf eine potentielle Relevanz als Marker für eine signifikant schlechtere Prognose hin. Exemplarisch gilt dies für miR-21-5p in Bezug auf das DSS bei HPV-negativen OSCCs/OPSCCs (Ko et al. 2014), das Vorliegen einer Perineuralscheideninfiltration und das DSS bei OSCCs (Yu et al. 2017), für miR-200b in Bezug auf das OS nach einer pRCT mit 5-Fluorouracil/Mitomycin C basierter Chemotherapie (Hess AK et al. 2017) und für miR-205-5p in Bezug auf RFS bei HNSCCs (Ganci et al. 2013) sowie das OS bei OSCCs (Berania et al. 2017).

Insgesamt hat bisher nur eine sehr limitierte Anzahl von Studien die Assoziation von miRNAs im Kontext von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und insbesondere des p16-/HPV-Status und der Prognose innerhalb eines einheitlichen OPSCC-Kollektivs analysiert (Bersani et al. 2018; Emmett et al. 2018; Gao et al. 2013; Harris et al. 2012; Hess AK et al. 2017; Hui et al. 2013; Lubov et al. 2017; Quabius et al. 2017; Saleh et al. 2019; Wong et al. 2016). Keine der Studien konzentrierte sich bisher auf miR-182 oder

miR-205, für welche vielversprechende, wenn auch teilweise divergierende Ergebnisse in Bezug auf onkologische Fragestellungen beschrieben wurden (Berania et al. 2017; Brito et al. 2016; Cao MQ et al. 2018; Casanova-Salas et al. 2014; Chou et al. 2018; Ganci et al. 2013; Gulei et al. 2018; Guo et al. 2020; Hagman et al. 2013; Jiang L et al. 2010; Kolenda et al. 2019; Li J et al. 2017; Li JH et al. 2017; Li et al. 2018; Lv et al. 2019; Nagai et al. 2018; Pan et al. 2017; Qu et al. 2012; Rapti et al. 2014; Stenvold et al. 2014; Tian et al. 2014; Valenti et al. 2019; Wang F et al. 2015; Wang J et al. 2017; Wang L et al. 2017; Wang S et al. 2014; Wu et al. 2020; Xu S et al. 2019; Yeh et al. 2016; Zhong und Xiong 2015).

### 1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es auf der Basis retrospektiver klinischer Daten die funktionellen und onkologischen Ergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie in der Primärtherapie von Patienten mit Oropharynxkarzinomen in einem kurativ intendierten und an der TNM-Klassifikation der Karzinommanifestation orientierten, multimodalen Therapiekonzept zu untersuchen (TLM-Studie). Ferner sollte herausgearbeitet werden, inwiefern umschriebene, lokal begrenzte (pT1 – 2) Kopf-Hals-Karzinome mit singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastase ohne extrakapsuläres Wachstum von einer zusätzlichen adjuvanten Radiotherapie profitieren (pN1-Studie). Darüber hinaus sollte mit ergänzenden experimentellen Untersuchungen der prognostische Stellenwert der Biomarker p16-Expression und HPV-Nachweis (p16-HPV-Studie) sowie spezifischer miRNAs (miRNA-Studie) im Kontext der Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika von Patienten mit kurativer Intention behandelten Oropharynxkarzinomen analysiert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethik**

Die Studien wurden bei der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Referenznummer: 10/2/16 An, Referenznummer: 9/12/10).

### **2.2 Material**

Alle nicht näher bezeichneten, laborüblichen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Herstellern Carl Roth GmbH + Co. KG, Eppendorf AG, Merck KGaA, F. Hoffmann-La Roche AG bezogen. Die Verwendung und Lagerung aller Reagenzien und Instrumente erfolgte konform zu den Herstellerangaben und -empfehlungen.

## **2.3 Definition der Patientenkollektive (Ein- und Ausschlusskriterien)**

Entsprechend der in Abschnitt 1.3 erläuterten Zielsetzung wurden Patientenkollektive definiert, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

### **2.3.1 Transorale Lasermikrochirurgie zur Primärtherapie von Oropharynxkarzinomen**

In die Analyse der transoralen Lasermikrochirurgie zur Behandlung von OPSCCs (TLM-Studie) wurden 368 Patienten mit zuvor therapienaiven OPSCCs (T1 – 4a, N0 – 2, M0) eingeschlossen, die zwischen 10/1986 und 10/2015 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurden.

Ausgeschlossen wurden Fälle, bei denen Kontraindikationen für die TLM vorlagen und daher ein abweichendes Behandlungskonzept erfolgte. Funktionelle oder technische Kontraindikationen für eine TLM-Resektion des Primärtumors umfassten beispielsweise die Infiltration der Eustachischen Röhre oder der Arteria carotis sowie eine unzureichend mögliche transorale Exposition des Tumors wie beispielsweise auch bei zu geringer Mundöffnung sowie eine ausgedehnte Fixierung der prävertebralen Faszie. Ausgeschlossen wurden insgesamt 606 Patienten, die im Analysezeitraum mit einem malignen oropharyngealen Tumor in der Universitätsmedizin Göttingen vorstellig waren. Diese umfassten Patienten mit einem nicht plattenepithelial differenzierten Malignom (n = 53), vorausgegangenen Primärtumoren anderer Lokalisation (n = 120), einem synchronen Zweitumor (n = 71), einer Lymphknotenmetastase mit der Größe von über 6 cm (N3) (n = 85), simultaner Fernmetastasierung (n = 25), Rezidiv eines primär extern (daher nicht an der Universitätsmedizin Göttingen) therapierten OPSCC (n = 35), externem Therapiebeginn (n = 11) oder Patienten, die offen chirurgisch über eine laterale Pharyngotomie kombiniert mit TLM (n = 4), lateraler Pharyngotomie mit oder ohne TLM gefolgt von rekonstruktionschirurgischen Eingriffen (n = 17) oder mit einer primär palliativen Therapieintention (n = 4) behandelt wurden. Das Alter war kein Ausschlusskriterium für ein TLM-basiertes Therapiekonzept.

### **2.3.2 Adjuvante Radio(chemo)therapie in einem TLM-basierten Therapiekonzept für pT1 – 2 pN1 ECS-negative HNSCCs**

In die pN1-Studie erfolgte der Einschluss von 65 Patienten mit lokal begrenzten Karzinomen (pT1 – 2) mit einer einzigen ipsilateralen Lymphknotenmetastase (pN1) ohne extrakapsuläre Ausbreitung (ECS-negativ). Das Kollektiv der TLM-Studie wurde dazu um Patienten mit OSCCs oder HPSCCs erweitert, die zwischen 08/1986 und 10/2015 ebenso in einem TLM-basierten, kurativ intendierten Therapiekonzept in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurden.

In Anlehnung an die TLM-Studie erfolgte der Ausschluss von Patienten mit nicht plattenepithelialen, vorausgehenden oder simultanen Malignomen, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vorliegenden Fernmetastasen, und/oder vorbehandelten, durch konventionelle Chirurgie, Rekonstruktion mittels Gewebetransfer, pR(C)T oder mit palliativer Intention therapierten Karzinome (siehe Abschnitt 0). Von den verbleibenden 807 Patienten, die sich im Einschlusszeitraum für pT1 – 4a klassifizierte OSCCs, HPSCCs oder OPSCCs einem TLM-basierten, kurativ intendierten Therapiekonzept unterzogen hatten, wiesen initial 430 (53,3 %) Patienten pT1 – 2 klassifizierte HNSCCs auf. Von den Letzteren zeigte sich bei 76 (17,7 %) in den entnommen regionalen Lymphknoten eine singuläre ipsilaterale Lymphknotenmetastase mit einem Durchmesser von < 6 cm (pN1). Diese stellte sich bei 11 Patienten als ECS-positiv da. Diese Fälle wurden ebenfalls aus der pN1-Studie ausgeschlossen. Die verbleibenden 65 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien und umfassten das finale Kollektiv der pN1-Studie. Ein Teil der klinischen Daten wurde bereits im Rahmen anderer Fragestellungen erarbeitet (Canis et al. 2014; Jackel et al. 2008; Weiss et al. 2017) und in Studien zur TLM-basierten Primärtherapie integriert (Canis et al. 2014; Jackel et al. 2008; Weiss et al. 2017; Weiss et al. 2019b).

### **2.3.3 p16- und HPV-Status**

Das Kollektiv der p16-HPV-Studie umfasste 102 zuvor bereits in die TLM-Studie eingeschlossene Patienten, die aufgrund eines OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium (III – IVa) zwischen 01/2000 und 10/2015 therapiert wurden. Dabei wurden von 126 initial identifizierten Patienten 24 Patienten aufgrund von nicht ausreichend verfügbarem paraffineingebetteten Gewebematerial für die, im Rahmen der Untersuchungen erfolgte, p16-Immunhistochemie und HPV-Genotypisierung ausgeschlossen.

### **2.3.4 miRNAs als Biomarker bei primären OPSCCs**

In das Kollektiv der miRNA-Studie umfasste 45 Patienten mit OPSCCs, die in kurativer Intention zwischen 07/2011 und 04/2016 an der Universitätsmedizin Göttingen therapiert wurden. Zur Analyse der miRNA-Expression im Kontext der Gewebedignität wurde oropharyngeales Gewebe von 18 Nicht-Malignompatienten mit therapeutischer Tonsillektomie als Kontrollgruppe herangezogen.

Zur Untersuchung potentieller diagnostischer und prognostischer Implikationen von miRNAs bei Patienten mit primären OPSCCs, die in kurativer Intention therapiert wurden, erfolgte der Ausschluss folgender Patienten: drei Patienten aufgrund einer Therapie in palliativer Intention, ein Patient aufgrund vollständiger Ablehnung einer Therapie und zwei Patienten aufgrund eines Nachbeobachtungszeitraums von weniger als zwölf Monaten nach der Erstdiagnose. Weiterhin wurden 34 Patienten ohne ausreichendes oder geeignetes Material zur Bestimmung des p16-Status und/oder der miRNA-Expression von der miRNA-Studie ausgeschlossen.



#### 2.3.4.1 Kollektiv zur Validierung

Zur Validierung der Ergebnisse der miRNA-Studie, wurde eine Untergruppe des HNSCC-Datensatzes des The Cancer Genome Atlas (TCGA) definiert. Insgesamt bezogen sich von initial 279 Fällen des verfügbaren HNSCC-Datensatzes des TCGA 33 (11,8 %) auf Malignome des Oropharynx (Cancer Genome Atlas 2015). In Anlehnung an die Definition des miRNA-Studienkollektivs wurden davon ein Patient (3,0 %) aufgrund einer Fernmetastasierung sowie weitere sechs Patienten (18,2 %) aufgrund positiver pathologischer Resektionsränder ausgeschlossen. Die verbleibenden 26 OPSCC-Fälle bildeten das TCGA-Vergleichskollektiv, welches im Folgenden als TCGA-Gesamtkollektiv bezeichnet wurde. Daten der vorprozessierten und normalisierten miRNA-Sequenzierungs-Expression wurden unter Verwendung des TCGAbiolinks R-Pakets vom Genomic Data Commons Data Portal bezogen (Colaprico et al. 2016). Die klinischen Daten wurden dem cBioportal (Version April 2018) (Cerami et al. 2012) und der TCGA-Publikation (Cancer Genome Atlas 2015) entnommen. Für die Ereigniszeitanalysen des TCGA-Datensatzes wurde eine Adjustierung der klinischen Nachbeobachtungszeit an jene (fünfjährige) des Kollektivs der miRNA-Studie vorgenommen.

## **2.4 Erhebung klinischer Daten und Behandlungskonzepte der untersuchten Patientenkollektive**

Die Identifikation einzuschließender Patienten und Erhebung klinischer Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der prospektiv geführten Tumordokumentationsdatenbank der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Die bestehenden klinischen Daten wurden zusätzlich durch die bis 10/2017 (TLM-Studie, pN1-Studie, p16-HPV-Studie) respektive bis 12/2017 (miRNA-Studie) verfügbare medizinische Dokumentation ergänzt und retrospektiv ausgewertet.

### **2.4.1 Prätherapeutische Untersuchungen und Stadieneinteilung**

Die klinischen Daten basierten auf den vorausgegangenen Untersuchungen im Rahmen der Ausdehnungsbestimmung der Tumorerkrankung. Die dazu notwendigen prätherapeutischen Untersuchungen beinhalteten eine starre oder flexible Pharyngoskopie und Laryngoskopie sowie zur Beurteilung der Tumorextension und des Lymphknotenstatus eine Untersuchung des Halses mittels Sonographie und Computertomographie (CT-Untersuchung) oder Magnetresonanztomographie (MRT-Untersuchung). Zum Ausschluss von Fernmetastasen und/oder synchronen Zweitneoplasien erfolgte eine Röntgen-, später CT-Untersuchung des Thorax, eine sonografische Untersuchung des Abdomens sowie präoperativ eine Panendoskopie des oberen Aerodigestivtrakts in Allgemeinanästhesie.

Die Primärlokalisation von Karzinomen mit Extension auf anatomisch angrenzende Regionen wie beispielsweise den Epi- oder Hypopharynx, wurde vom Operateur entsprechend der vorherrschenden Ausdehnung einer Hauptlokalisierung zugeordnet. Die Diagnose wurde in allen Fällen histopathologisch bestätigt. Im Rahmen der Studien dieser Arbeit wurde eine Einordnung anhand der zehnten Revision der Deutschen Modifikation der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems-10th Revision-German Modification, ICD-10-GM) in der Version von 2017 vorgenommen.

Die Definition der T- und N-Kategorie der TNM-Klassifikation und des prognostischen Stadiums erfolgte basierend auf der siebten Edition der Algorithmen der UICC (Sobin et al. 2010)/AJCC (Edge und American Joint Committee on Cancer. 2010).

### **2.4.2 Therapie**

Alle eingeschlossenen Patienten der TLM-Studie, pN1-Studie sowie p16/HPV-Studie sowie 91,1 % (n = 41) der miRNA-Studie wurde in einem chirurgisch basierten Therapiekonzept behandelt. Dieses umfasste die Resektion des Primärtumors mittels TLM sowie stadien-

abhängig eine ND und aR(C)T. Eine pRCT erfolgte bei 8,9 % (n = 4) der Patienten des miRNA-Studienkollektivs.

Bei allen Patienten basierte die Therapieentscheidung weder auf dem HPV- oder p16-Status noch dem miRNA-Expressionsniveau.

#### 2.4.2.1 Behandlung der Primärtumoren

Die Resektion des Primärtumors erfolgte mittels CO<sub>2</sub>-Laser im kontinuierlichen Superpuls-Modus. Dabei wurden Resektionsabstände zwischen malignem und benignem Gewebe von mindestens 5 mm, wenn möglich 10 mm beabsichtigt. Insbesondere in Fällen, in welchen Resektionsränder von 5-10 mm fraglich eingehalten werden konnten oder Schwierigkeiten bestanden die Infiltrationstiefe intraoperativ einzuschätzen, wurden Gefrierschnitte von Gewebeproben des Tumorbetts angefertigt. Die Entscheidung zur Evaluation von Gefrierschnitten des Tumorbetts wurde vom Operateur individuell getroffen. Insbesondere bei Operationen am Zungengrund, bei der Fibrosierung und die relativ hohe Gewebedichte des lymphatischen Gewebes eine Differenzierung zwischen Tumor und gesundem Gewebe anhand des im Tumor klassischerweise erhöhten Karbonisierungsgrads während der Operation erschwerte, unterstützte die Beurteilung von Gefrierschnitten eine vollständige Resektion. Zur Orientierung von Resektaten ohne angrenzendes Epithel bedurfte die pathologische Beurteilung der in *Piece-Meal*-Technik gewonnenen Resektate eine präzise Kartierung mit gegebenenfalls zusätzlicher farblicher Markierung. Eine finale histopathologische Untersuchung diente zur Verifizierung einer vollständigen Resektion und dementsprechend tumorfreier Resektionsränder (R0) in Fällen mit einem Resektionsabstand von weniger als 3 mm zum gesunden Gewebe wurde großzügig die Indikation zur Nachresektion gestellt.

#### 2.4.2.2 Therapie des regionären Lymphabflussgebiets

Das regionäre Lymphabflussgebiet wurde präoperativ, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, hinsichtlich klinisch evidenter Metastasen untersucht. Bei einem Teil der Patienten mit lokal begrenzten Tumoren und klinisch unauffälligem Befund erfolgten klinische Kontrollen mit Sonographie des Halses alle 3 Monate. Die Indikationen zur Neck-Dissection basierte auf einer lokal fortgeschrittenen Erkrankung (cT3 – 4a), einer Tumordinfiltrationstiefe von über 3 mm oder klinisch evidenten metastasenverdächtigen Lymphknoten. Bei klinisch unauffälligen Lymphknoten (cN0) erfolgte eine selektive ND der Lymphknotenregionen (*Level*) mit größtem Risiko einer regionären Metastasierung. In Fällen mit klinisch auffälligen Lymphknoten (cN+) wurde das Verfahren um die betroffenen *Level* und/oder Strukturen erweitert. Diese wurden in Zusammenschau der präoperativen Bildgebung und des intraoperativen Befunds definiert. Indikationen für eine bilaterale ND stellten klinisch verdächtige bilaterale Lymphknoten, ein fortgeschrittener Primärtumor (T3 – 4) mit

Mittellinienlokalisation und/oder ein lokal begrenzter Primärtumor mit einseitig verdächtigen Lymphknoten dar (Welz et al. 2017).

Die systematische Beschreibung der ND erfolgte auf der Grundlage der vom Subcommittee for Neck Dissection Nomenclature, Committee for Head and Neck Surgery and Oncology der American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery erarbeiteten standardisierten Terminologie und Klassifikation (Robbins et al. 1991). Diese ist in Tabelle 1 dargestellt. Die anatomische Einteilung der Lymphknotenregionen in *Level* ist in der dazugehörigen Legende erläutert.

**Tabelle 1: Terminologie der Neck-Dissection**

ND	Entfernte Strukturen
radikal	Level I – V zuzüglich des Musculus sternocleidomastoideus, der Vena jugularis interna und des Nervus accessorius
erweitert radikal	wie bei der radikalen ND, zuzüglich mindestens einer Lymphknotenregion/nicht lymphatischen Struktur
modifiziert radikal	wie bei der radikalen ND, jedoch Erhalt mindestens einer, sonst entfernter nicht lymphatischen Struktur
selektiv	wie bei der radikalen ND, jedoch Erhalt von mindestens einer Lymphknotenregion der Level I – V

Die Terminologie der Neck-Dissection ist modifiziert nach Robbins et al. (1991) dargestellt (Robbins et al. 1991). Level I bezeichnet die submentalen, Level II die kranijugulären, Level III die mediojugulären, Level IV die kaudojulären Lymphknoten der Kopf-Hals-Region. Level V beinhaltet die Lymphknoten im posterioren Halsdreieck, Level VI jene in der vorderen Halsregion (Robbins et al. 1991).

Abkürzungen: ND = Neck-Dissection.

#### 2.4.2.3 Adjuvante Radio(chemo)therapie

Bedingt durch das retrospektive Design, den langen Einschlusszeitraum und der im Laufe der Jahre erarbeiteten Standardisierung der Empfehlungen zur aR(C)T waren die individuellen Entscheidungsgründe für oder gegen eine aR(C)T nicht in jedem Fall nachzuvollziehen.

Im Allgemeinen erfolgten Therapieentscheidungen basierend auf karzinomassoziierten Faktoren wie Krankheitsstadium, histologisch nachgewiesener Infiltrationstiefe, Zelldifferenzierung, Karzinomtopografie, aber auch patientenassoziierten Faktoren im interdisziplinären Diskurs und im Einklang mit der individuellen Entscheidung des Patienten nach informierter Einwilligung. Im Einklang mit diesen Aspekten und mit der Weiterentwicklung der Radioonkologie unterlagen Techniken und Protokolle dementsprechend verschiedenen Alterationen (Wolff et al. 2016).

Die Durchführung der aR(C)T an der Universitätsmedizin Göttingen wurde von Wolff et al. (2016) und Leu et al. (2021) beschrieben (Leu et al. 2021; Wolff et al. 2016). Von 08/1987 – 12/1993 wurden die Bestrahlungen in zwei, durch sechsstündige Intervalle getrennte, Fraktionen pro Tag durchgeführt. In einem Split-Course-Schema wurde derart über einen Zeitraum von sechs Wochen in Einzelfraktionen von maximal 2,1 Gy (1,25 MV <sup>60</sup>CO) eine Gesamtdosis von 56 und 70 Gy am Primärtumor sowie bilateral am Hals appliziert. Von 01/1994 – 12/2004 erfolgte die Radiotherapie normofraktioniert in

Einzelfraktionen von 2 Gy pro Tag fünfmal pro Woche. Der Primärtumor und assoziierte Lymphabflussgebiete wurden in parallel, gegenüberliegenden seitlichen Bestrahlungsfeldern abgestimmt auf ein einziges vorderes Feld bis zu einer maximalen Dosis von 50 Gy in das Bestrahlungsareal einbezogen. Zur Bestrahlung der unteren Halses und der supraklavikulären Lymphknoten mit einer Dosis von 50 Gy in einer Tiefe von 3 cm diente ein vorderes Feld. Zum Erreichen einer Gesamtdosis von 60 Gy im Zielvolumen und Schonung des umliegenden physiologischen Gewebes wurde eine 3D-konformale und damit eine mittels CT-Untersuchung geplante und an der individuellen Patientenanatomie orientierte, externe Strahlentherapietechnik verwendet. Seit 01/2005 wurde die gesamte aRT als normofraktionierte (2 Gy/Tag, 5 Mal/Woche), 3D-konformale externe Radiotherapie durchgeführt. Zunächst erfolgte die Applikation einer Dosis von 50 Gy am Primärtumor, den beteiligten Lymphknoten und den potenziellen Drainagestellen der beidseitigen Halsregion und der supraklavikulären Region. Anschließend wurde eine Dosissteigerung (sogenannter „Boost“) von bis zu 64 Gy auf den Primärtumor und die beteiligten Lymphknoten durchgeführt (Wolff et al. 2016). Seit 05/2008 bildete die Durchführung der aR(C)T als intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT)/volumetrisch modulierte Rotationsbestrahlung (Volumetric modulated Arc Therapy, VMAT) den Standard in der Universitätsmedizin Göttingen (Leu et al. 2021).

Zur Radiosensibilisierung erfolgte bei einem Teil der Patienten eine konkomitante platinbasierte Chemotherapie angepasst an die Gesamtkörperoberfläche (*total body surface area*, TBSA). Bis 12/2001 wurde die Radiotherapie ohne Chemotherapie oder mit einer Dosis von 50 mg/m<sup>2</sup> Carboplatin intravenös an jedem Bestrahlungstag durchgeführt. Seit 01/2002 erfolgte in der Regel bei ausreichendem Allgemeinzustand und adäquater Nierenfunktion eine Chemotherapie mit Cisplatin entsprechend folgender Standardprotokolle: Cisplatin 100 mg/m<sup>2</sup>/TBSA/Tag an Tag 1, 21, 42 der aRCT; Cisplatin 20 mg/m<sup>2</sup>/TBSA/Tag in der ersten und fünften Woche der aRCT; Cisplatin 6 mg/m<sup>2</sup>/TBSA/Tag an jedem Bestrahlungstag (Wolff et al. 2016); oder Cisplatin 40 mg/m<sup>2</sup>/TBSA/Tag wöchentlich konkomitant zur aRCT (Leu et al. 2021).

Therapiekonzepte und Einschlusszeiträume der Teilstudien der vorliegenden Arbeit sind bezogen auf Standardprotokolle der aR(C)T an der Universitätsmedizin Göttingen Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Therapiekonzepte und eingeschlossene Patienten bezogen auf die Zeiträume der aR(C)T-Standardprotokolle und -Verfahren an der Universitätsmedizin Göttingen**

Therapiekonzepte und aR(C)T-Zeiträume	TLM-Studie	pN1-Studie	p16-HPV-Studie	miRNA-Studie
	[n] [%]	[n] [%]	[n] [%]	[n] [%]
pR(C)T	0 0,0	0 0,0	0 0,0	4 8,9
TLM ± ND	161 43,8	44 67,7	27 26,5	13 28,9
TLM + aR(C)T ± ND	207 14,9	21 32,3	75 43,1	28 62,2
10/1986 – 12/1993	51 24,6	11 52,4	0 0,0	0 0,0
01/1994 – 12/2004	101 48,8	7 33,3	31 41,3	0 0,0
01/2005 – 04/2008	15 7,2	0 0	11 26,2	0 0
05/2008 – 04/2016	40 19,3	3 14,3	33 78,6	28 100
TLM + aRCT ± ND	99 26,9	12 18,5	46 45,1	21 46,7
10/1986 – 12/2001	46 46,5	10 83,3	3 6,5	0 0,0
01/2002 – 04/2016	53 53,5	2 16,7	43 93,5	21 100

Therapiekonzepte und die Anzahl eingeschlossener Patienten in die einzelnen Studienkollektive der vorliegenden Arbeit sind bezogen auf die, von Wolff et al. (2016) und Leu et al. (2021) beschriebene, Standarddurchführung der aR(C)T an der Universitätsmedizin Göttingen dargestellt (Leu et al. 2021; Wolff et al. 2016).

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; ND = Neck-Dissection; pR(C)T = primäre Radio(chemo)therapie; TLM = transorale Lasermikrochirurgie.

### 2.4.3 Funktionelle Ergebnisse, perioperatives Management und Komplikationen der chirurgischen Primärtherapie

Zur Evaluation der funktionellen Ergebnisse der chirurgischen Primärtherapie wurden als Indikatoren für die Schluckfunktion in Anlehnung an vorausgehende Studien die Rate und Dauer einer Ernährungsunterstützung über eine nasogastrale Sonde und perkutan endoskopische Gastrostomiesonde (PEG-Sonde) gewählt (Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Rich et al. 2009). Die Notwendigkeit einer PEG-Sonde wird dabei auf der Functional Outcome Swallowing Scale (FOSS) einer Stufe 4-5 zugeordnet (Haughey et al. 2011; Rich et al. 2009; Salassa 1999). Dabei entspricht die vierte Stufe der FOSS einer enormen Dysfunktion des Schluckens mit einer Gewichtsreduktion von mehr als zehn Prozent in sechs Monaten aufgrund von Dysphagie, Atemwegskomplikationen durch Aspiration und einer Empfehlung zur nicht-oralen Nahrungsaufnahme für den überwiegenden Teil der Nahrung. Die fünfte Stufe der FOSS bezeichnet den vollständigen Bedarf einer nicht-orale Nahrungsaufnahme (Salassa 1999).

Darüber hinaus wurde die Notwendigkeit und Dauer einer Tracheotomie erfasst. Diese diente in Anlehnung an vorausgehende Studien als Surrogat einer gestörten Atemwegs- und/oder Schluckfunktion (Moore et al. 2012; Van Abel et al. 2019). Eine perioperativ durchgeführte temporäre Tracheotomie wurde als Erwartung oder Ausdruck einer passageren Verlegung der Atemwege durch Schwellung und/oder als Funktionseinschränkung des Schluckvermögens mit Aspirationsneigung gewertet. Eine länger anhaltende Notwendigkeit einer Tracheotomie wurde als Indiz einer protrahierten Schluckrehabilitation oder eines anhaltenden Schluckdefizits mit Aspirationsneigung angesehen.

Ebenfalls in Anlehnung an vorausgehende Studien zur chirurgisch-basierten Therapie von OPSCCs erfolgte die Beschreibung der Komplikationen der chirurgischen Therapie des Primärtumors anhand der Zahl und dem darauffolgenden Management aufgetretener Nachblutungen, Wundinfektionen und Fistelbildungen (Dalton et al. 2020; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009).

#### **2.4.4 Nachsorge**

Allen Patienten wurde eine systematische Nachsorge empfohlen. Das reguläre postoperative Tumornachsorgekonzept sah nach sechs Wochen, zwölf Wochen und anschließend alle drei Monate innerhalb der ersten drei Jahre und alle sechs Monate für weitere zwei Jahre eine Anamnese und eine klinische Untersuchung der Kopf-Hals Region vor. Darüber hinaus war eine sonografische Untersuchung des Halses zur bilateralen Erhebung des Lymphknotenstatus vorgesehen. Ergänzende Bildgebung (CT- oder MRT-Untersuchung) von Primärtumorregion respektive Lymphabflussgebiet erfolgte insbesondere bei klinisch schwer einsehbaren Primärtumoren. Feste und standardisierte Intervalle für bildgebende Untersuchungen, die aktuell auch eine CT-Untersuchung des Thorax umfasst, divergierten aufgrund des langen Einschlusszeitraumes der Erhebungen. Die Indikation zu ergänzender Bildgebung und entsprechender Erweiterung der Nachsorge wurde vielmehr individuell anhand der spezifischen klinischen Situation des Patienten gestellt. Nach einer Nachsorge von fünf Jahren ohne erneute Manifestation der Erkrankung wurden als Heilung angesehen, an der Universitätsmedizin Göttingen wurde die Nachsorge in vielen Fällen dennoch fortgeführt.

#### **2.4.5 Alkohol- und Tabakkonsum**

Angaben der Tabak- und Alkoholanamnese wurden der Patientenakte entnommen und dichotom kategorisiert. Patienten, die früheren oder aktuellen Tabakkonsum angegeben hatten, wurden der Gruppe der (Ex-)Raucher zugeordnet. Jene, die jeglichen Tabakkonsum negiert hatten, wurden als Nichtraucher betrachtet. In Bezug auf den Alkoholkonsum wurden der Gruppe mit hohem Konsum jene zugeordnet, die mindestens wöchentlich starken oder einen täglichen Alkoholkonsum angegeben hatten und/oder bei welchen eine mit starkem Alkoholkonsum assoziierte Krankheit (beispielsweise Wernicke-Korsakow-Syndrom) diagnostiziert worden war. Patienten, die gelegentlichen oder keinen Alkoholkonsum angegeben hatten, wurden in der p16-HPV-Studie in die Gruppe der „nie/gelegentlich trinkenden Patienten“ eingeordnet. Fehlten Angaben zur Alkohol- und/oder Tabakanamnese wurden die Fälle aus den Analysen der Untergruppe mit bekannter Anamnese ausgeschlossen.

## 2.5 Experimentelle Datenerhebung, histologische und molekularbiologische

Die histologischen und molekularbiologischen Gewebeanalysen erfolgten in Kooperation mit dem Laborpersonal des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

### 2.5.1 Probengewinnung und Gewebefixierung

Die Gewinnung aller untersuchten OPSCC-Gewebeproben erfolgte im Rahmen der prätherapeutischen Panendoskopie und Biopsie und/oder chirurgischen Tumorthherapie durch die Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen.

Zur p16-Immunhistochemie und HPV-Genotypisierung wurde das im Rahmen der pathologischen Routineaufbereitung mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe (*Fresh-frozen-paraffin-embedded*-, FFPE-Gewebe) verwendet.

Zur miRNA-Quantifizierung wurde Frischgewebe (*Fresh-frozen*-, FF-Gewebe) verwendet. Dieses wurde unmittelbar nach der Probengewinnung in flüssigem Stickstoff (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) schockgefroren und hiermit physikalisch fixiert. Die anschließende Lagerung erfolgte in einem Flüssigstickstoffbehälter (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Zwischen weiteren experimentellen Schritten wurde die Lagerung von FF-Gewebe bei  $-80\text{ °C}$  in der Ultratiefkühltruhe HERAfreeze™ HFC 586 Basic,  $-86\text{ °C}$  (Thermo Scientific™ Herareus™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) sichergestellt.

### 2.5.2 Gewebeschnitte

Gewebeschnitte aus Paraffinblockpräparaten wurden nach 10 – 15-minütigem vollständigen Aushärten bei  $-5,5\text{ °C}$  auf der Kühlplatte pfm Cooling Plate 4100 (pfm medical AG, Köln, Deutschland) mit dem Schlittenmikrotom Leica SM 2000R (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Dem darauffolgenden "Strecken" der Gewebeschnitte erst im kalten, anschließend im  $45\text{ °C}$  warmen Wasserbad (waterbath 1000, pfm medical AG, Köln, Deutschland) schloss sich das Aufziehen auf Süssefrost Objektträger (Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland) an. Abschließend wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet ( $20\text{ – }25\text{ °C}$ ).

Gewebeschnitten aus FF-Gewebe wurden mittels Gefriermikrotom MICROM HM 550 (MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Zur Kryotomie wurden sowohl die Objektaufnahmeeinheit und Kühlkammer des Kryostaten als auch verwendetes Besteck auf  $-20\text{ °C}$  vortemperiert. Zur exakten Anfertigung der Gewebeschnitte wurde ein FF-Gewebsstück auf einen Süssefrost Objektträger (Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland) transferiert und mit dem Kryoeinbettungs- und Haftungs-



medium Tissue-Tek® O.C.T® Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) fixiert. Pro Schnittreihe wurden 21 Schnitte angefertigt. Der mittlere Schnitt wurde mit einer Schnittdicke von 2 µm angefertigt und zur anschließenden Hämatoxylin-Eosin-Färbung und histopathologischen Begutachtung auf einen Süssefrost Objektträger (Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland) aufgezogen. Die verbleibenden Schnitte wurden mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und bis zur weiteren Verarbeitung (RNA-Isolation) in ein separates SafeSeal Reagiergefäß (SARSTEDT AG & Co Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, Deutschland) transferiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.5.3 Übersichtsfärbung und pathologische Routinediagnostik**

Zur Diagnosesicherung und Beurteilung der Resektionsränder wurde im Rahmen der histopathologischen Routineaufarbeitung vertikale 3 – 4 µm-Gewebeschnitte der Biopsien und Resektate der Primärtumoren und ND-Präparate angefertigt und in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) untersucht.

Die HE-Färbung von Paraffinschnitten erfolgte zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen entsprechend dem in Tabelle 3 dargestellten Standardprotokoll mithilfe des Tissue-Tek® Prisma® Färbeautomat Modell E2S (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) und darauffolgender automatisierter Schnitteindeckung mittels des Tissue-Tek® Film® Folieneindecksystems (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland).

Die HE-Färbung von Gefrierschnitten erfolgte zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen unter Verwendung des in Tabelle 4 dargestellten Standardprotokolls in Kombination mit vollautomatischen Färbeautomaten Leica ST4020 (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland).

**Tabelle 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Eindeckung von Paraffinschnitten**

Färbeabschnitt	Reagenz	Inkubationszeit
Trocknung und Entparaffinierung	Paraffinschmelzung bei 65 °C	10 min
	Abkühlen auf Raumtemperatur (20 – 25 °C)	
Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe	Xylol <sup>a</sup>	2 x je 2 min 30 s
	99 % Ethanol <sup>b</sup>	1 min
	96 % Ethanol <sup>c</sup>	1 min
	70 % Ethanol <sup>d</sup>	1 min
Waschung	Leitungswasser	1 min
Färbung basophiler Strukturen	Hämalaun nach Mayer <sup>e</sup>	6 min
Ansäuerung	HCl-Alkohol <sup>f</sup>	5 s
Waschung	Destilliertes Aqua <sup>g</sup>	8 min
Färbung azidophiler Strukturen	Eosin <sup>h</sup>	3 min
Waschung	Leitungswasser	15 s
Dehydrierung	70 % Ethanol <sup>d</sup>	30 s
	96 % Ethanol <sup>c</sup>	1 min 30 s
	99 % Ethanol <sup>b</sup>	2 min
Einbettung	Xylol <sup>a</sup>	2 min
Eindeckung	Folienfilm <sup>i</sup>	

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Folieneindeckung von Paraffinschnitten unter Verwendung des Färbeautomaten Tissue-Tek® Prisma® Modell E2S (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) in Kombination mit dem Folieneindecksystem Tissue-Tek® Film® (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) ist entsprechend des Standardprotokolls des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Stand 07/2017) dargestellt.

Notizen: <sup>a</sup> Xylol, technisch (min. 98,5 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland); <sup>b</sup> Ethanol 99 % vergällt mit MEK und Bitrex® (min. 99,7 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland); <sup>c</sup> Ethanol 96 % vergällt mit MEK und Bitrex® (min. 95,6 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland); <sup>d</sup> Ansatz aus 300 ml destilliertem Aqua + 700 ml Ethanol 99 % vergällt mit MEK und Bitrex® (min. 99,7 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland); <sup>e</sup> Richard-Allan Scientific™ Hematoxylin 722 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); <sup>f</sup> Ansatz aus: 1920 ml Alkohol 75 % + 80 ml Salzsäure (HCl) 25 % (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); <sup>g</sup> Wasseraufbereitung der Universitätsmedizin Göttingen; <sup>h</sup> Shandon™ Eosin-Y, wässrig (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); <sup>i</sup> Tissue-Tek® Film-Eindeckfolie (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland).

**Tabelle 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten**

Färbeabschnitt	Reagenz	Inkubationszeit
Fixierung	Formaldehydlösung <sup>a</sup>	20 s
	Destilliertes Aqua <sup>b</sup>	20 s
Gegenfärbung	Hämalaun nach Mayer <sup>c</sup>	3 x je 20 s
	Leitungswasser	20 s
	Destilliertes Aqua <sup>b</sup>	20 s
Färbung azidophiler Strukturen	Eosin <sup>d</sup>	20 s
	Destilliertes Aqua <sup>b</sup>	20 s
Dehydrierung	96 % Ethanol <sup>e</sup>	4 x je 20 s
Einbettung	Xylol <sup>f</sup>	2 x je 20 s

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten im vollautomatischen Färbeautomat Leica ST4020 (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) ist entsprechend des Standardprotokolls des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Stand 07/2017) dargestellt.

Notizen: <sup>a</sup> Formaldehydlösung 4 % gepuffert, pH 6,9 (etwa 10 % Formalinlösung) für die Histologie (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); <sup>b</sup> Wasseraufbereitung der Universitätsmedizin Göttingen; <sup>c</sup> Richard-Allan Scientific™ Hematoxylin 722 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); <sup>d</sup> Shandon™ Eosin-Y, wässrig (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); <sup>e</sup> Ethanol 96 % vergällt mit MEK und Bitrex® (min. 95,6 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland); <sup>f</sup> Xylol, technisch (min. 98,5 %) (Chemosolute® Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland).

#### 2.5.4 Immunhistochemie zur Bestimmung des p16-Status

Die Bestimmung der p16-Expression und/oder des HPV-Status gehörte insbesondere innerhalb des anfänglichen Einschlusszeitraums nicht zur Routinediagnostik bei OPSCCs. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der p16- beziehungsweise der HPV-Status für OPSCCs des Zeitraums zwischen 01/2000 und 10/2015 (TLM-, p16-HPV-Studie), 08/1986 und 10/2015 (pN1-Studie) sowie 07/2011 und 04/2016 (miRNA-Studie) bei verfügbarem und suffizientem FFPE-Gewebe der Primärtumoren, falls nicht bereits aus der Routinediagnostik vorliegend, nachträglich bestimmt.

Zur Bestimmung des p16-Status wurde zunächst ein 2 µm dicker FFPE-Gewebeschnitt entsprechend dem in Abschnitt 2.5.2 erläuterten Protokoll angefertigt und das Paraffin anschließend bei 59,5 °C für 60 min im Wärmeschrank (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland) ablaufen gelassen.

Die weiteren Prozessschritte erfolgten mithilfe des Reaktionskomplettsystems EnVision™ Flex+, Mouse, High pH (Link) (EnVision Flex+, Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA). Dazu erfolgte zunächst die Deparaffinisierung, Rehydrierung und Hitze-induzierte Freilegung von Epitopen des Gewebes durch Inkubation in der Vorbehandlungslösung EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, pH hoch (pH 9) (Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) im Vorbehandlungsmodul PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Hierzu wurden die Schnitte in das Gerät bei einer auf 85 °C vortemperierte Lösung eingestellt und nach einem Hochheizen auf 97 °C darin für 15 min bei 97 °C inkubiert. Dieser insgesamt etwa 40 min dauernde Vorbehandlungsprozess wurde durch eine anschließende Abkühlphase auf die Einstelltemperatur von 85 °C beendet. Nach der Entnahme wurden die vorbehandelten Schnittpräparate für 1 – 5 min in den auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) temperierten EnVision™ FLEX Wash Buffer eingetaucht.

Die eigentliche Färbung der vorbehandelten Schnitte erfolgte im Autostainer Link 48 (Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) entsprechend dem in Tabelle 5 dargestellten Protokoll. Als Antigen-spezifische Primärantikörper wurden monoklonale Maus-p16-Antikörper (p16 (JC8): sc-56330, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) in einer Verdünnung von 1:50 mit EnVision™ FLEX Antibody Diluent verwendet. Die Visualisierung der Immunpräzipitationen erfolgte mithilfe polymerer Sekundärantikörper, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) (EnVision Flex+, Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) und ein Chromogensubstrat mit Diaminobenzidin (Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA). Zur Gegenfärbung diente die Inkubation mit Hämatoxylin. Die der Färbung anschließende Trocknung frisch gefärbte Schnitte erfolgte unter dem Luftgebläse.

**Tabelle 5: Immunhistochemische Färbung mit Antigen-spezifischen Primärantikörpern**

Prozessschritt	Reagenz	Inkubationszeit
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Blockierung endogener Peroxidase	EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	5 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Antigenspezifischer Primärantikörper	Primärantikörper <sup>b</sup>	30 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Sekundärer <i>Linker</i>	EnVision™ FLEX LINKER Maus	15 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Sekundärantikörperpolymere, gekoppelt an HRP	Dako EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent	20 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	5 min
Chromogensubstrat	EnVision™ FLEX Substrate Working Solution <sup>d</sup>	10 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Gegenfärbung	EnVision™ FLEX Hematoxylin	8 min
Spülen	EnVision™ FLEX Wash Buffer <sup>a</sup>	
Spülen	Destilliertes Wasser <sup>e</sup>	

Die immunhistochemische Färbung im Autostainer Link 48 (Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) unter Verwendung des Reaktionskomplettsystems EnVision Flex+, Mouse, High pH (Link) (EnVision Flex+, Dako, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) in Kombination mit Antigen-spezifischen Primärantikörpern ist dargestellt.

Notizen: <sup>a</sup> Ansatz aus EnVision™ FLEX FLEX Wash Buffer (20x) im Verhältnis 1:20 verdünnt mit destilliertem Wasser; <sup>b</sup> Ansatz aus monoklonale Maus-p16-Antikörper (p16 (JC8): sc-56330, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) in einer Verdünnung von 1:50 mit EnVision™ FLEX Antibody Diluent; <sup>c</sup> Ansatz aus 1 Tropfen konzentrierter DAB-Lösung EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen und 1 Tropfen wasserstoffperoxidhaltiger EnVision™ FLEX Substrate Buffer; <sup>e</sup> Wasseraufbereitung der Universitätsmedizin Göttingen.

Abkürzungen: DAB = Diaminobenzidin; HRP = *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase.

Die abschließende Auswertung der Färbeergebnisse erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Julia Kitz, Oberärztin des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen unter Verwendung eines OLYMPUS BX40-Mikroskops (Olympus K.K. Tokio, Japan). Ausschließlich Proben, welche eine starke ( $\geq 75\%$ ) nukleäre und zytoplasmatische Färbung aufwiesen, wurden als „p16-positiv“ klassifiziert. Alle anderen (fehlende, schwache oder mäßige) Färberesultate wurden hingegen als „p16-negativ“ eingeordnet (Lydiatt et al. 2017; Quabius et al. 2015).

### 2.5.5 DNA-Extraktion und HPV-Genotypisierung

Die Bestimmung des HPV-Status erfolgte mittels Multiplex-Fluoreszenz-PCR. Dazu wurde zunächst das gewünschte Gewebe durch Mikrodissektion ausgehend von einem 5 µm dicken FFPE-Gewebeschnitts des oropharyngealen Primärtumors (TLM-, p16-HPV-Studie) respektive des benignen Gewebes der Kontrollgruppe (miRNA-Studie) angereichert. Anschließend folgte die DNA-Extraktion unter Verwendung des Reaktionkomplettsystems innuPREP FFPE DNA Kit-IPC16 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) in Kombination mit dem Gerät InnuPure<sup>®</sup> C16 touch (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland).

Die folgende Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der isolierten DNA wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt.

Anschließend erfolgte in einem Multiplex-Fluoreszenz-PCR-Verfahren die Amplifizierung der DNA mithilfe eines Reaktionskomplettsystems f-HPV-typing™ Multiplex-Fluoreszenz-PCR-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll (Genomed LTD., Harrow, Middlesex, UK). Dieses wurde für diagnostische Zwecke entwickelt. Für die PCR-Ansätze wurden pro Probe jeweils 5 µl des HPV PCR Master Mix, 15 µl des Primer Mix und 5 µl der extrahierten und eluierten DNA in einem 0,2 ml Reagiergefäß mittels des Schüttlers Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA) gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation mittels der Minizentrifuge Sprout® (Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA) wurden die Ansätze schließlich in den Thermocycler peqSTAR 2X Universal Gradient, mit 2×48-Well Universal-Gradientenblöcken und Standarddeckeln für 48×0,2 ml Tubes (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) überführt. Die PCR erfolgte sodann entsprechend des Herstellerprotokolls. Der Primer-Mix enthielt dabei fluoreszenzmarkierte Primer, welche zur Detektion der E6- und E7-Regionen der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 dienen. Entsprechend der Herstellerangaben und Canadas et al. (2012) sollten diese Regionen auch nach der viralen Integration in die Wirts-DNA weiterhin vorhanden sein (Canadas et al. 2012). Ein integriertes humanes kurzes Tandem-Repeat diente darüber hinaus zur internen Qualitätskontrolle (Canadas et al. 2012).

Die anschließende voll automatisierte fluoreszenz- sowie kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse der PCR-Produkte erfolgte mithilfe des Geräts Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Dabei wurden die in den PCR-Produkte enthaltenen DNA-Fragmente bei einer bis zu einem konstanten Level ansteigenden Spannung in der POP™-Polymermatrix entsprechend ihrer Ladung und Sequenzlänge im elektrischen Feld zwischen Kathode und Anode aufgetrennt. Die einzelnen Probenkapillaren wurden dabei von dem Gerät auf eine konstante Temperatur von 60 °C erhitzt, sodass die DNA-Fragmente während des gesamten Prozesses in denaturierten DNA-Einzelsträngen vorlagen. Kurze, negativ geladene DNA-Fragmente durchliefen dabei im Allgemeinen schneller als längere Fragmente die Polymermatrix. Durch einen Vergleich des Laufverhaltens einer Leiterprobe/Referenzprobe mit bekannter Fragmentlänge und Ladung konnte die Fragmente einer Probe einer Länge und Ladung zugeordnet werden. Zur Detektion der auf diese Weise aufgetrennten Fragmente, passierten diese vor dem Erreichen der Anode einen in das Gerät integrierten Laserstrahl, welcher in einem Fluoreszieren der an die PCR-Primer gebundenen Farbstoffe resultierte. Die Fluoreszenzsignale wurden von der *Charge-coupled-Device*-Kamera (CCD-Kamera) des Geräts registriert und ihre Intensitäten durch die Gerätesoftware 3500 Series Data Collection für jeden Farbstoff in einem Elektropherogramm dargestellt. Die abschließende Auswertung der Ergebnisse und damit Bestimmung des HPV-Status erfolgte unter Verwendung der GeneMapper™ Software 5 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in Kooperation mit Herrn Dr. Stefan Küffer, Laborleiter des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

### 2.5.6 RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und MicroRNA-Quantifizierung

Auf Basis der Ergebnisse vorausgehender Studien (siehe Abschnitt 1.2.2) wurden für die MicroRNA-Analysen die in Tabelle 6 dargestellten miRNAs ausgewählt. Ihre Expressionsniveaus wurden jeweils mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real-time-polymerase chain reaction*, qRT-PCR) bestimmt.

#### 2.5.6.1 Gewebepräparation

Dazu wurde eine Schnittreihe mit 21 FF-Gewebeschnitten wie in Abschnitt 2.5.2 erläutert angefertigt. Der mittlere Schnitt wurde wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben in einer HE-Färbung koloriert und für die repräsentative Schätzung der Menge enthaltener Tumorzellen innerhalb einer Schnittreihe herangezogen. Ausschließlich Schnittreihen mit einem Tumorzellanteil von > 60 % (OPSCCs) respektive 0 % (Kontrollgruppe) wurden in den weiteren Prozess eingespeist. Andernfalls wurde die gesamte Schnittreihe verworfen und insofern noch Gewebe vorhanden war, eine neue Schnittreihe angefertigt und andernfalls der entsprechende Patient wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben aus der miRNA-Studie ausgeschlossen.

#### 2.5.6.2 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte aus den verbleibenden 20 Gefrierschnitten (jeweils 10 µm) einer Schnittreihe in einer sogenannten „single step-Methode“ adaptiert an das Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Der erste Schritt umfasste die Homogenisierung und Lysierung des Gewebes durch 15 min Inkubation mit 1000 µl des, auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) vortemperierten TRIzol™ Reagenz (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) bei simultaner kontinuierlicher mechanischer Homogenisierung durch das repetitive Aufziehen und Ausspritzen mittels BD Eclipse™ Sicherheitsinjektionskanülen mit SmartClip™ Technologie 25G 5/8“ (0,5 mm x 16 mm) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) aufgesteckt auf eine 2 ml Spritze BD Discardit™ II (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Da das im TRIzol®-Reagent enthaltene Guanidinthiocyanat neben der Zerstörung von Plasmamembranen auch die simultane Inaktivierung von Enzymen wie beispielsweise RNAsen bedingt, wurde während des Prozesses einem enzymatischen Abbau der RNA chemisch entgegengewirkt. Der zweite Schritt diente der Separation der RNA von DNA und Proteinen. Dazu wurden 200 µl Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zum bisherigen Ansatz addiert und dieser für 15 s mit der Hand invertiert. Nach einer 2 – 3-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (14000 rpm) in der auf 4 °C vortemperierten Zentrifuge 5430R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Daraufhin wurde die entstandene wässrige, RNA enthaltende Oberphase des Ansatzes in ein neues Mikrolitergefäß transferiert. Die im ursprünglichen Reaktionsgefäß verbliebene DNA enthaltende Interphase und die Proteine enthaltende

organische Phase wurden verworfen. Im dritten Schritt wurde die RNA-Präzipitation aus der überführten wässrigen Phase vorgenommen. Dazu erfolgte die Addition von 500 µl Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), ein kurzes Vermischen des Ansatzes durch Inversion per Hand und schließlich eine 10-minütige Zentrifugation (14000 rpm) in der Zentrifuge 5430R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der anschließende zweite Waschschriff erfolgte, indem das, im Reaktionsgefäß verbliebene, RNA-Pellet mit 1000 µl 75 %-Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und der Ansatz für 8 min in der Zentrifuge 5430R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert wurde. Nachdem das Ethanol ebenfalls durch eine kurze Inversion des Reaktionsgefäßes verworfen wurde, erfolgte die Trocknung des auf den Boden des Reaktionsgefäßes abzentrifugierten RNA-Pellets für maximal 17 min. Je nach dessen Größe erfolgte abschließend dessen Resuspension in 30 – 40 µl RNase freiem Aqua (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland). Isolierte RNA-Proben wurden sodann bis zur weiteren Prozessierung bei -80 °C gelagert.

#### 2.5.6.3 Qualität und -Quantität der RNA-Isolierung

Die Qualität und -Quantität der RNA-Isolierung wurde mit dem Eukaryote Total RNA Nano Assay (Version 2.6) in dem Gerät Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) und dem zugehörigen Geräteequipment in Kombination mit der 2100 Expert Software (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) und dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) bestimmt.

Zur notwendigen Präparation der 1,1 µl Aliquote der RNA-Leiterprobe wurde der Thermocycler ThermoMixer<sup>®</sup> C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; 2 min bei 70 °C) und zur Präparation der 65 µl RNA-Gel-Matrix-Ansätze die Zentrifuge 5430R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; 10 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur) verwendet. Vor jeder Messung wurde ferner die Dekontamination der Messelektroden in 350 µl RNase freiem Aqua (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) sowie in 350 µl RNaseZAP<sup>®</sup> RNA-Dekontaminationslösung (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) jeweils eingefüllt in separate Reinigungschips des Geräteequipments vorgenommen. Zur Präparation des RNA-Farbstoffkonzentrats und der Gel-Farbstoff-Ansätze wurde der Tischschüttler Scientific Industries SI<sup>™</sup> Vortex-Genie<sup>™</sup> 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA) und die Mikrozentrifuge PEQLAB PerfectSpin Mini (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) (RNA-Farbstoffkonzentrat) beziehungsweise die Zentrifuge 5430R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; 10 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur) (Gel-Farbstoff-Ansätze) verwendet.

Pro Messung wurden 1 µl Probe (etwa 50 µl RNA) benötigt, sodass eine ressourcenschonende Untersuchung hinsichtlich etwaiger Degradierung oder Kontamination möglich war. Die Methode basierte dabei auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese in einem Chip,

wobei das Laufmuster einer zu analysierenden RNA-Probe mit dem einer RNA-Leiterprobe als Größen- und Mengenreferenz verglichen wurde.

Während der Analyse durchliefen dazu 1 µl der jeweiligen RNA-Probe die, zuvor durch Überdruck in die Kapillaren des Agilent RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Deutschland) eingepresste, Gel-Farbstoff-Mischung. Die sich dabei ausbildenden Bindungen zwischen RNA und Farbstoffpartikeln wurden durch die integrierten Messelektroden des Geräts (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Deutschland) detektiert und durch die 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Deutschland) in Form eines gelartigen Bandenmusters sowie Punkte (Peaks) eines Elektroprogramms dargestellt. Kontaminationen, wie sie exemplarisch aus einer inadäquaten Aspiration der DNA enthaltenen Interphase während der RNA Isolation resultieren konnten (siehe Abschnitt 2.5.6.2), zeigten sich, bedingt durch eine verspätete Bindung der RNA-Fragmente an die Fluoreszenzfarbstoffpartikel, in einer Zunahme der Retentionszeit der RNA der Probe im Elektrophorogramm. Degradation von RNA manifestierte sich hingegen in einer Dispersion charakteristischer Fluoreszenzpunkte. Insgesamt fungierten als Indikatoren für die Integrität isolierter RNA einerseits der Nachweis möglichst schmaler und intensiver Banden und entsprechender Fluoreszenzhochpunkte ribosomaler RNA mit den Hauptbestandteilen 18S- und 28S-RNA sowie andererseits der Nachweis schmaler und intensiver Banden und entsprechender charakteristischer Fluoreszenzhochpunkte im Bereich kleiner RNA Fragmente bei etwa 23 – 29 s (Masotti et al. 2009). Die Bestimmung der RNA-Konzentration einer Probe erfolgte basierend auf dem automatischen Vergleich des Integrals der Fluoreszenzsignale einer zu analysierenden Probe mit jenem der Referenzprobe mit bekannter Konzentration.

Eingangskriterien für den nachfolgenden Analyseprozess (cDNA-Synthese, siehe Abschnitt 2.5.6.4) waren der Nachweis einer RNA-Konzentration von mindestens 5 ng/µl sowie der Nachweis einer ausreichenden RNA-Integrität wie zuvor beschrieben. Wurden diese nicht erfüllt, erfolgte der Prozess ausgehend von der in Abschnitt 2.5.6.1 erläuterten Gewebepräparation erneut.

#### 2.5.6.4 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA der miRNA erfolgte mithilfe des Applied Biosystems™ TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Bei allen Versuchsschritten erfolgte die Inkubation jeweils in dem peqSTAR 2X Universal Gradient mit 2 × 48-Well Universal-Gradientenblöcken und Standarddeckeln für 48 × 0,2 ml Tubes (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA). Nach jeder Addition neuer Reagenzien wurden die Ansätze ferner unter Verwendung des Schüttler Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA) jeweils 5 – 10 s auf der niedrigsten Stufe schonend gemischt und entstandene Luftblasen durch anschließende Zentrifugation für 5 – 10 s mittels der Zentrifuge PEQLAB PerfectSpin Mini (1,5 ml-Reagiergefäße;



PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) oder der Minizentrifuge Sprout® (0,2 ml-Reagiergefäße; Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA) eliminiert.

Als primäres Transkript der cDNA-Synthese wurde RNA aus RNA-Proben eingesetzt, welche zuvor mit RNase freiem Wasser (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) bis auf eine Konzentration von 5 ng/μl dilutiert wurden.

Der erste Versuchsschritt diente die Polyadenylierung des 3'-Endes der miRNAs. Dazu wurde ein Reagenziengemisch bestehend aus 0,3 μl des Poly(A)Enzyms, 0,5 μl des 10X Poly(A)-Buffers als Umgebungsmedium, 0,5 μl ATP und 2 μl der RNA-Probe als Substrate und 1,7 μl RNase freiem Wasser als Verdünnungslösung angesetzt. Die Reaktion erfolgte während einer 45-minütigen Inkubation bei 37 °C. Die Beendigung der Reaktion wurde durch ein automatisiertes 10-minütiges Erhitzen der Gradientenblöcke auf 65 °C hervorgerufen.

Anschließend wurde eine Adapternukleotidsequenz an das 5'-Endes der miRNAs legiert. Dazu wurden zu den Poly-A-Reaktionsprodukten 1,5 μl RNA Ligase als Enzym, 3 μl 5X DNA Ligase Buffer und 4,5 μl 50 % PEG 8000 als neues Umgebungsmedium, 0,6 μl 25X Ligation Adaptor als weiteres Substrat und 0,4 μl RNase freies Wasser zur Verdünnung hinzugefügt. Die Ligationsreaktion erfolgte während einer 60-minütigen Inkubation bei 16 °C in dem oben genannten Gerät.

Im nächsten Schritt erfolgte die cDNA-Synthese durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT). Dabei ermöglichte das zuvor polyadenylierte 3'-Ende der miRNAs die Hybridisierung der Universal RT Primer, welche als Startpunkt des Enzyms dienten. Für die Reaktion wurde das Produkt der Ligationsreaktion mit 3 μl 10X RT Enzymmix, 6 μl 5X RT Buffer als Umgebungsmedium, 1,2 μl dNTP Mix (je 25 mM) und 1,5 μl 20X Universal RT Primer als weitere Substrate sowie 3,3 μl RNase freiem Wasser als Verdünnungslösung versetzt. Die Reaktion erfolgte während einer 15-minütigen Inkubation bei 42 °C und wurde durch das Erhitzen des Gradientenblocks auf 85 °C für 5 min gestoppt.

Im letzten Schritt wurde zur Sensitivitätssteigerung der PCR eine unspezifische Amplifikation der miRNA-komplementären cDNAs vorgenommen. Dazu wurden zu 5 μl des Produktes der Reverse Transkriptase Reaktion, 25 μl des DNA-Polymerase-Enzym enthaltenden 25X miR-Amp Master Mixes sowie 2,5 μl 20X miR-Amp Primer Mix und 17,5 μl RNase freies Wasser hinzugefügt und in das oben genannte Gerät eingestellt. Einer Enzymaktivierung durch ein-minütige Inkubation bei 95 °C, schlossen sich 14 Zyklen jeweils bestehend aus einer 3 s andauernden Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge bei 5 °C, 30 s andauernder Primer-Anlagerung sowie einer davon ausgehenden Synthese komplementärer Sequenzen bei 60 °C an. Der Reaktionsstopp wurde durch 10 min Erhitzen der Gradientenblöcke auf 99 °C hervorgerufen.

Im nächsten Schritt erfolgte die miRNA-Quantifizierung, welche in Abschnitt 2.5.6.5 näher erläutert wird.

### 2.5.6.5 Quantifizierung der cDNA spezifischer MicroRNAs

Die Analyse der Expression der miRNAs erfolgte nach dem Prinzip einer qRT-PCR unter der Verwendung der TaqMan™ Fast Advanced Master Mix-Technologie in Kombination mit den in Tabelle 6 aufgelisteten spezifischen miRNA-Assays (alle Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA) in dem Gerät Light Cycler 480® Instrument II für 96-Well Platten (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) und der Gerätesoftware LightCycler® 480 Software (Version 1.5; Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz).

Ein Probenansatz beinhaltete 10 µl TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X), 1 µl TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X) verdünnt in 4 µl RNase freiem Wasser und 0,5 µl cDNA-Probe in einer 1:10 Verdünnung mit 4,5 µl RNase freiem Aqua (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland). Jeweils 10 µl dieses Ansatzes wurden in benachbarte Mulden einer Reaktionsplatte (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white; Hoffman-La Roche AG, Basel, Schweiz) pipettiert. Zur Qualitätssicherung wurden die qRT-PCRs stets in Duplikaten durchgeführt. Auf die Reaktionsplatten wurden zum Schutz vor Kontaminationen und Verdunstung anschließend eine LightCycler® Folie (Light Cycler® 480 Sealing Foils; Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) mit einem 3M™ Universal Montagerakel (3M, Maplewood, MN, USA) aufgebracht. Anschließend wurden die Reaktionsplatten in den Light Cycler 480® Instrument II für 96-Well Platten (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) eingestellt. In diesem erfolgte (1.) eine 20 s andauernde Enzymaktivierung bei 95 °C, gefolgt von (2.) 40 Zyklen bestehend aus 3 s Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95 °C und (3.) anschließender 30 s andauernder Hybridisierung und Elongation der Primer basierend auf den entstandenen Einzelsträngen als Matrize bei 60 °C.

Im Allgemeinen galt, umso mehr cDNA-Moleküle einer miRNA zum Beginn in der Probenlösung vorhanden waren, desto mehr mittels eines *Reporter*-Farbstoffs fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Sonden konnten mit diesen hybridisieren und während der Polymerisierungszyklen von der Reversen Transkriptase umgesetzt werden. Daraus resultierte eine Entfernung des ebenfalls zu Beginn sondengebundenen *Quencher*-Farbstoffs vom *Reporter*-Farbstoff, wodurch nach Anregung durch den Laser ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ermöglicht wurde. Der Zyklus, bei welchem es zur Überschreitung des Schwellenwerts dieses Signals kam, wurde von der Software als Wert des Schwellenzyklus (*cycle threshold*, Ct) ausgegeben. Ausschließlich bei einer Diskrepanz von weniger als einem Zyklus zwischen den Duplikaten eines Ansatzes, wurde der Mittelwert der Ct-Werte in der weiteren Analyse berücksichtigt. In allen anderen Fällen wurde die qRT-PCR wiederholt. Unter allen Proben betrug der maximal ermittelte Ct-Wert 35 von 40 Gesamtzyklen. Entsprechend der Empfehlungen des Assay-Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) wurde die miRNA-Expression auf die individuelle Expression von miR-103a-3p normalisiert ( $\Delta$ Ct-Wert). Aus dem statistischen Vergleich der  $\Delta$ Ct-Werte der Proben der Vergleichsgruppen wurde der Unterschied, der zum Beginn der Amplifikationsreaktion enthaltenen miRNA-spezifischen cDNAs ermittelt (Livak und

Schmittgen 2001; Schmittgen und Livak 2008). Die weitere Datenverarbeitung wird in Abschnitt 2.6 erläutert.

**Tabelle 6: Untersuchte miRNAs**

<b>Assay-Bezeichnung</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Zielsequenz</b>
miR-21-5p	477975_mir	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-29c-3p	479229_mir	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miR-30e-5p	479235_mir	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG
miR-34c-5p	478052_mir	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
miR-99a-5p	478519_mir	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
miR-103a-3p <sup>a</sup>	478253_mir	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
miR-143-3p	477912_mir	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
miR-146a-5p	478399_mir	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-182-5p	477935_mir	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU
miR-200b-5p	478753_mir	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA
miR-205-5p	477967_mir	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG
miR-223-3p	477983_mir	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

In der miRNA-Studie untersuchte miRNAs sind nach den Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA aufgelistet.

Notizen: <sup>a</sup> miR-103a-3p wurde zur Normalisierung genutzt.

## 2.6 Statistik

Zur deskriptiven Datenanalyse wurden der Mittelwert mit der korrespondierenden Standardabweichung, der Median und absolute sowie relative Häufigkeiten bestimmt. Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen klinisch-pathologischer Charakteristika wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson untersucht.

Von allen Patienten waren Nachsorgedaten verfügbar. Zur Analyse onkologischer Ergebnisse wurde als Startpunkt der Intervallkalkulationen das Datum der primären chirurgischen Resektion (TLM-Studie, pN1-Studie, p16-HPV-Studie) respektive das Datum der initialen Panendoskopie mit pathologischer Diagnosesicherung (miRNA-Studie) definiert.

Dem Primärtumor zugerechnet, wurde jegliche Manifestation der gleichen Tumorentität an identischer Lokalisation und/oder innerhalb des gleichen regionären Lymphabflussgebiets des Primärtumors, welche innerhalb von 60 Monaten nach dem Startpunkt diagnostiziert wurde. Als Residualtumor wurde eine Manifestation der gleichen Tumorentität an identischer Lokalisation definiert, die innerhalb der ersten drei Monate nach dem Startpunkt auftrat. Hingegen wurde als Rezidiv die Diagnose einer solchen Erkrankung mehr als drei Monate nach dem Startpunkt definiert. Als regionäre Rezidive wurden Rezidive bezeichnet, welche innerhalb des, im TNM-Atlas definierten Lymphabflussgebiet ohne den Nachweis eines Lokalrezidivs diagnostiziert wurden. Als Spätmetastasen wurden regionale Lymphknotenmetastase eingeordnet, die bei initial negativem Lymphknotenstatus (c/pN0) mehr als drei Monate nach dem Startpunkt nachgewiesen wurden. Als Rezidivmetastasen wurden hingegen jene Lymphknotenmetastasen bezeichnet, die bei bereits initialer regionaler Lymphknotenmetastasierung (pN+) mehr als drei Monate nach dem Startpunkt auftraten.

Als prognostische Endpunkte der Ereigniszeitanalysen wurden Gesamtüberleben (*overall survival*, OS), das krankheitsspezifische Überleben (*disease-specific survival*, DSS), das rezidivfreie Überleben (*recurrence-free survival*, RFS) sowie die lokale Kontrollrate (*local control rate*, LCR) und in der miRNA-Studie zusätzlich das progressionsfreie Überleben (*progression-free survival*, PFS) bestimmt. Die Definition erfolgte in Anlehnung an Punt et al. (2007) wie in Tabelle 7 angegeben (Punt et al. 2007). Die Berechnung der Schätzwerte erfolgte mithilfe der Methode nach Kaplan-Meier (Kaplan und Meier). Falls nicht anders vermerkt, wurden diese nach 60 Monaten angegeben. Zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen Vergleichsgruppen diente der Log-Rang-Test. Zur grafischen Illustration der Ereigniszeitanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven angefertigt und die Anzahl der jeweils in ein 30-monatiges Zeitintervall eintretenden Patienten (Patienten unter Risiko) unter der Abszisse dargestellt. Darüber hinaus wurde zur Analyse potentieller Assoziationen zwischen Variablen und dem relativen Risiko eines Ereignisses Cox-Regression-Proportional-Hazard-Modelle berechnet. Die jeweils resultierende Hazard Ratio (HR) wurde mit dem 95 %-Konfidenzintervall (*confidence intervall*, CI) angegeben. Im Rahmen der multivariaten Analysen der p16-HPV-

Studie wurden der p16- und HPV-Status jeweils als separate Kovariate oder als Kombination beider Marker zusammen mit den Variablen Geschlecht, Alter (kontinuierlich), pT-Kategorie (gruppiert; T1 – 2 vs. T3 – 4), Lymphknotenmetastasen (N0 vs. N+), ECS (N0/N+ ECS- vs. N+ ECS+), prognostisches Stadium (III vs. IVa), Differenzierungsgrad (hoch/moderat vs. schlecht), Behandlung (TLM ± ND vs. TLM + ND + aR(C)T) analysiert. Im Kollektiv mit dokumentierter Alkohol- und Tabakanamnese wurden darüber hinaus auch diese Variablen berücksichtigt.

Um in der miRNA-Studie relative Unterschiede des miRNA-Expressionsniveaus zwischen Tumoren und benignen Kontrollen zu ermitteln, wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet (Livak und Schmittgen 2001). Die Signifikanzbeurteilung erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung potentieller Assoziationen zwischen miRNA-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen innerhalb des OPSCC-Datensatzes für kategoriale Variablen mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test und für kontinuierliche Variablen mit der Spearman-Rangkorrelation. Zur Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der ausgewählten miRNAs diente der Median der miRNA-Expression als Grenzwert für die dichotome Unterteilung in OPSCCs mit relativ höherer ( $\Delta Ct \geq \text{Median}$ ) respektive niedriger Expressionen ( $\Delta Ct < \text{Median}$ ) innerhalb der jeweiligen Gruppen (miRNA-Studienkollektiv: insgesamt, p16-stratifizierte Untergruppen; TCGA-Kollektiv: insgesamt, HPV-stratifizierte Untergruppen).

Bei allen Analysen wurde ein Ergebnis mit einem P-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant erachtet. Als statistischer Trend wurde ein P-Wert zwischen  $0,05$  und  $0,1$  interpretiert.

Die Software Statistica Version 12 (TLM-Studie) respektive Version 13.3 (pN1-, p16-HPV-, miRNA-Studie) (Dell Inc., Round Rock, TX, USA) wurde zur Berechnung der mit der Spearman-Rangkorrelation, des Mann-Whitney-U-Tests, des Kruskal-Wallis-Tests, des Pearson Chi-Quadrat-Tests sowie zur Kalkulation der Kaplan-Meier-Schätzungen und Log-Rang-Tests verwendet. Das Programm wurde ferner zur Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven genutzt (TLM-, pN1- und p16-HPV-Studie). Die Analyse und Visualisierung prognostischer Ereigniszeitanalysen erfolgte im Rahmen der miRNA-Studie mit Hilfe der statistischen R-Plattform (R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Version 3.5.1 [2. Juli 2018]) in Kombination mit den Survival- und Survminer R-Paketen in Kooperation mit Herr PD Dr. Christian Unger (Forschungsbereich Strahlenzytogenetik und Klinische Kooperationsgruppe "Personalisierte Strahlentherapie bei Kopf- und Halstumoren" des Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) und Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität.

Zur Anpassung potenziell relevanter Kovariaten wurde weiterhin eine multivariate Regressionsanalyse nach Cox (vorwärtsschrittweise) unter Verwendung der Software IBM

SPSS® Statistics, Version 26.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) durchgeführt (p16-HPV-Studie).

Die Erstellung von Box-Plots erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 7.0e (Graph Pad Software Inc., San Diego). Eine abschließende Bearbeitung von Illustrationen wurde mit der Software Adobe Illustrator® CC, Version 18.1 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) vorgenommen.

**Tabelle 7: Definition prognostischer Endpunkte**

Ereignis	Prognostischer Endpunkt				
	OS	DSS	PFS	RFS	LCR
Rezidiv, lokal <sup>a</sup>	Z	Z	E	E	E
Rezidiv, regionär <sup>a</sup>	Z	Z	E	E	Z
Rezidiv, lokoregionär <sup>a</sup>	Z	Z	E	E	Z
Fernmetastasierung <sup>a</sup>	Z	Z	E	E	Z
Zweitmalignom <sup>b</sup>	Z	Z	Z	Z	Z
Tod aufgrund des Indexkarzinoms	E	E	E	E	Z
Interkurrenter Tod	E	Z	E	Z	Z
Therapieassoziierter Tod	E	Z	E	Z	Z
Ende der Nachbeobachtung	Z	Z	Z	Z	Z

Die Definition prognostischer Endpunkte der Ereigniszeitanalysen ist in Anlehnung an Punt et al. (2007) dargestellt (Punt et al. 2007). Als Startpunkt der Intervallkalkulationen wurde das Datum der primären chirurgischen Resektion (TLM-Studie, pN1-Studie, p16-HPV-Studie) respektive jenes der initialen Panendoskopie mit pathologischer Sicherung der Erstdiagnose (miRNA-Studie) definiert.

Notizen: <sup>a</sup> 3 – 60 Monate nach Erstdiagnose/Therapiestart. Patienten mit initial oder innerhalb der ersten drei Monate nach der Erstdiagnose/dem Therapiestart diagnostizierter Fernmetastasierung wurden von den Analysen ausgeschlossen (siehe dazu Abschnitt 2.3); <sup>b</sup> Malignom anderer Tumorentität oder Topografie < 60 Monate nach Erstdiagnose/Therapiestart des Indexkarzinoms oder jedes Malignoms > 60 Monaten ohne Manifestation des Indexkarzinoms. In der TLM-, pN1-, p16-HPV-Studie wurden Patienten mit vorherigen oder innerhalb der ersten drei Monate nach dem Start der Primärtherapie des Indexkarzinoms diagnostizierten Zweitumoren von den Analysen ausgeschlossen (siehe dazu Abschnitt 2.3).

Abkürzungen: DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; E = Ereignis; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben; Z = Zensurierung.

### 3 Ergebnisse

Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Ergebnisse beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf die Patienten des Gesamtkollektivs der jeweiligen Studie. Auf Untersuchungen von Untergruppen wird entsprechend hingewiesen.

#### 3.1 Ergebnisse der TLM-Studie: Funktionelle und onkologische Ergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie in der Primärtherapie von Oropharynxkarzinomen

##### 3.1.1 Patienten

368 Patienten mit der Erstdiagnose eines OPSCCs erfüllten die in Abschnitt 0 erläuterten Einschlusskriterien und bildeten das Gesamtkollektiv der TLM-Studie (TLM-Kollektiv: 72 Frauen (19,6 %), 296 Männer (80,4 %)). Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Tumorresektion betrug  $57,0 \pm 10,0$  Jahre (Median 55,7 Jahre; Minimum 29,2 Jahre; Maximum 91,4 Jahre). Die Primärtumoren wurden vom Operateur den folgenden oropharyngealen Sublokalisationen zugeordnet: bei 35,3 % (n = 130) der Patienten den Tonsillen, bei 24,2 % (n = 89) dem Zungengrund, bei 11,4 % (n = 42) dem Weichgaumen, bei 9,2 % (n = 34) der Valleculla, bei 5,7 % (n = 21) der Uvula, bei 6,0 % (n = 22) der Hinterwand, bei 4,1 % (n = 15) der Seitenwand, in 3,8 % (n = 14) Glossotonsillarfurche und Gaumenbögen und bei 0,3 % (n = 1) der Fossa tonsillaris.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bei 9,0 % (n = 33) der Patienten ein prognostisches Stadium I, bei 12,2 % (n = 45) ein Stadium II, bei 22,3 % (n = 82) ein Stadium III und bei 56,5 % (n = 208) ein Stadium IVa vor. Die Verteilung der T- und N-Kategorien ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Verteilung von T- und N-Kategorie bei primär transoral lasermikrochirurgisch therapierten OPSCCs**

	c/pN0		pN1		pN2a		pN2b		pN2c		Gesamt	
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
<b>pT1</b>	33	9,0	14	3,8	4	1,1	17	4,6	2	0,5	70	19,0
<b>pT2</b>	45	12,2	20	5,4	3	0,8	40	10,9	7	1,9	115	31,3
<b>pT3</b>	37	10,1	13	3,5	2	0,5	36	9,8	11	3,0	99	26,9
<b>pT4a</b>	27	7,3	13	3,5	5	1,4	26	7,1	13	3,5	84	22,8
<b>Gesamt</b>	142	38,6	60	16,3	14	3,8	119	32,3	33	9,0	368	100,0

Die Verteilung der T- und N-Kategorie ist in Bezug zueinander modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie.

Abkürzungen: c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation.

### 3.1.2 TLM-basiertes Therapiekonzept

Die Resektion des Primärtumors erfolgte bei allen Patienten mittels TLM. Die TLM bildete bei 10,1 % (n = 37) der Patienten die alleinige Therapie. Bei 33,7 % (n = 124) wurde zusätzlich eine uni- oder bilaterale ND durchgeführt. Eine multimodale Therapie mit aR(C)T erfolgte bei dem überwiegenden Teil der Patienten (n = 207; 56,3 %). Bei 51,9 % (n = 191) der Patienten beinhaltete diese sowohl eine ND als auch die aR(C)T. Bei 4,3 % (n = 16) wurde die TLM ohne ND durch eine aR(C)T ergänzt.

Das exakte Startdatum der aR(C)T war bei 91,3 % (n = 198 von 207) der bestrahlten Patienten anhand der verfügbaren Dokumente ermittelbar. Das Datum lag bei diesen im Durchschnitt 48,3 Tage (Median 47,5 Tage, Minimum 13; Maximum 148 Tage) nach der chirurgischen Resektion des Primarius. Die Radiotherapie wurde bei 47,8 % (n = 99 von 207) in Kombination mit einer Chemotherapie durchgeführt. Bei 97,0 % (n = 96 von 99) dieser Patienten war das genaue Startdatum der Chemotherapie in den verfügbaren Dokumenten vermerkt. Dieses war bei 93,8 % (n = 90) identisch zum Datum des ersten Bestrahlungstags. Bei den verbleibenden sechs Patienten, wick das Startdatum der Systemtherapie vom ersten Bestrahlungstag ab (Mittelwert 4,5 Tage, Spanne -30 bis +8 Tage).

Eine ND wurde bei insgesamt 85,6 % (n = 315) der Patienten durchgeführt. Diese erfolgte bei 52,4 % (n = 165) unilateral und bei 47,6 % (n = 150) bilateral. Von insgesamt 465 behandelten Halsseiten wurde bei 92,2 % (n = 452) ein selektives, bei 1,7 % (n = 8) ein radikales und bei 1,1 % (n = 5) ein modifiziert radikales Vorgehen gewählt. Die Level II – III wurden lediglich bei 1,3 % (n = 6) der therapierten Halsseiten nicht disseziert. Ergänzend zu Level II – III wurden bei den insgesamt 465 behandelten Halsseiten bei 22,2 % (n = 103) das Level I, bei 35,3 % (n = 164) das Level IV und bei 21,1 % (n = 98) das Level V in die ND eingeschlossen. Eine regionale Metastasierung wurde bei 61,4 % (n = 226) der Patienten (pN+) im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung nachgewiesen. Bilaterale Lymphknotenmetastasen wurden bei 14,6 % (n = 33 von 226) dieser Patienten diagnostiziert. Bei 37,2 % (n = 84 von 226) lag mindestens eine Lymphknotenmetastase mit ECS vor.

### 3.1.3 Onkologische Ergebnisse

Die mittlere Nachbeobachtungszeit bis zum letzten lebenden Kontakt oder Tod betrug im Mittel  $69,6 \pm 52,5$  Monate (Median 54,6 Monate; Minimum 2,6 Monate; Maximum 253 Monate). Bei 47,0 % (n = 73) überstieg die Nachbeobachtungszeit fünf Jahre.

Während der Nachbeobachtungszeit wurde bei 29,1 % (n = 107) der Patienten nach einer mittleren Dauer von  $15,6 \pm 12,1$  Monaten ein lokales und/oder regionäres Rezidiv diagnostiziert. Ein Lokalrezidiv wurde bei 15,7 % (n = 58) der Patienten, ein lokoregionäres Rezidiv bei 3,8 % (n = 14) diagnostiziert. Im regionären Lymphabflussgebiet manifestierte



sich bei weiteren 5,2 % (n = 19) mindestens eine Spät-, respektive bei 4,3 % (n = 16) eine Rezidivmetastase. Somit war bei 19,6 % (n = 72) in der Primärtumorregion und bei 13,2 % (n = 49) im regionären Lymphabflussgebiet ein Rezidiv zu verzeichnen.

Zum letzten Nachbeobachtungszeitpunkt lebten 47,8 % (n = 176) der Patienten ohne und 1,1 % (n = 4) mit einer Manifestation des OPSCCs. Bei 51,1 % (n = 188) war der Tod das letzte dokumentierte Ereignis. Der Todeseintritt erfolgte bei insgesamt 16,0 % (n = 59) interkurrent und daher ohne bekannte Assoziation zu dem primären Tumorleiden. Weitere 21,5 % (n = 79) verstarben im Kontext der ursprünglichen Tumorerkrankung, während bei 13,6 % (n = 50) der Tod am ehesten im Zusammenhang mit einem Zweitmalignom eintrat.

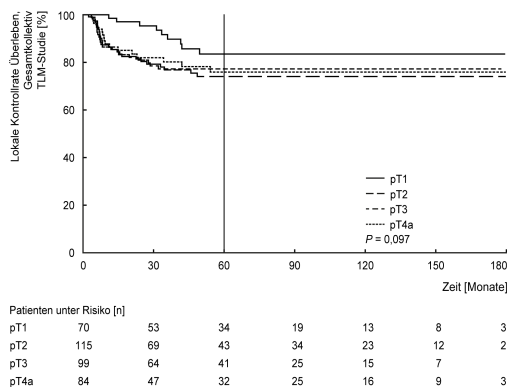
Die Ergebnisse der Ereigniszeitanalysen des OS, DSS, RFS und der LCR sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach der lokalen Tumorausdehnung (pT-Kategorien) und prognostischen Stadien Tabelle 9 zu entnehmen. Die Kaplan-Meier-Kurve der LCR ist in Bezug auf die pT-Kategorie in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Das OS, DSS und RFS der jeweiligen prognostischen Stadien ist in Abbildung 2 illustriert.

**Tabelle 9: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach pT-Kategorien und prognostischen Stadien**

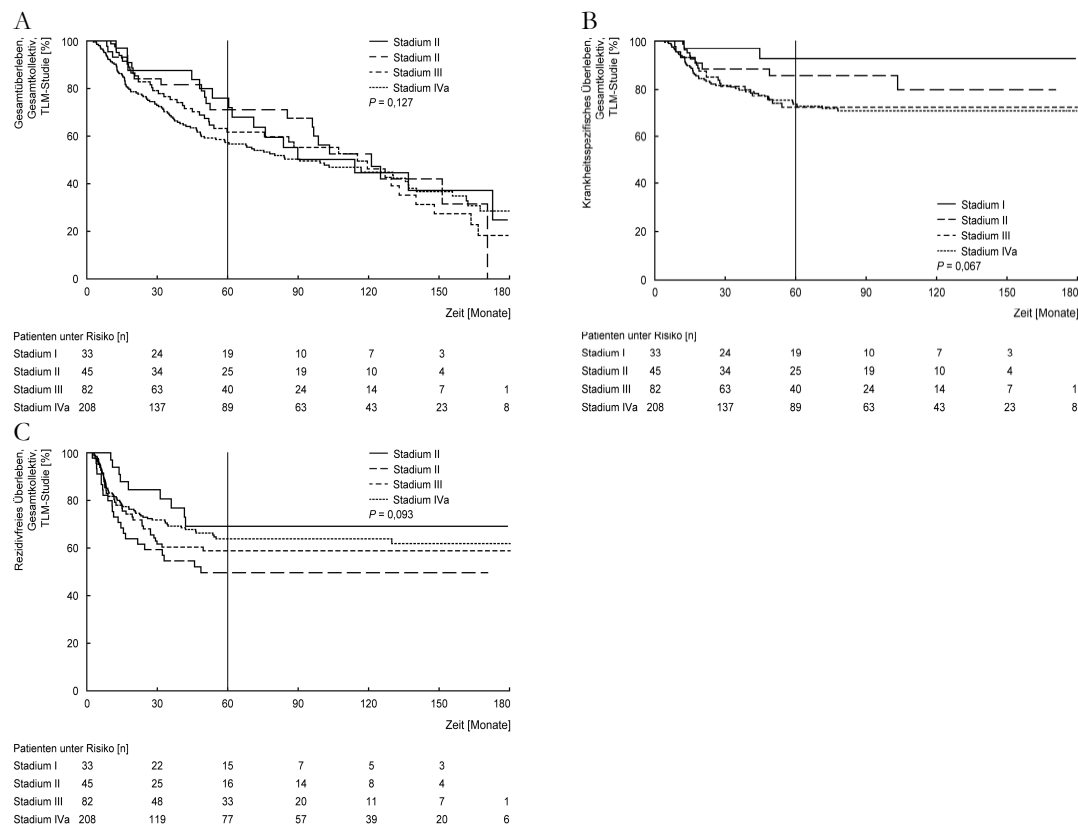
Klassifikation	Endpunkt			
	OS [%]	DSS [%]	RFS [%]	LCR [%]
pT1	68,5	85,1	67,5	83,5
Stadium I	76,0	92,8	69,1	77,7
pT2	60,0	74,3	54,7	74,1
Stadium II	71,1	85,7	49,6	63,7
pT3	62,4	72,7	64,8	77,3
Stadium III	61,7	72,5	58,8	74,1
pT4a	56,5	77,0	61,0	76,0
Stadium IVa	57,3	73,7	63,9	82,0
pT1 – 4a	61,5	76,5	61,3	77,2

Die Fünf-Jahres-Kaplan-Meier-Schätzungen sind stratifiziert nach den pT-Kategorien und den prognostischen Stadien und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie.

Abkürzungen: DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Abbildung 1: Lokale Kontrollrate bei OPSCCs stratifiziert nach den pT-Kategorien.** Die Kaplan-Meier-Kurven der lokalen Kontrollrate für das Gesamtkollektiv der TLM-Studie sind stratifiziert nach den pT-Kategorien und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



**Abbildung 2: Gesamt-, krankheitsspezifisches und rezidivfreies Überleben bei OPSCCs stratifiziert nach prognostischen Stadien.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische und C, das rezidivfreie Überleben sind für das Gesamtkollektiv der TLM-Studie modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 3.1.4 Adjuvante Radio(chemo)therapie

Um den Einfluss der adjuvanten Radio(chemo)therapie auf die onkologischen Langzeitergebnisse zu untersuchen, wurde eine Untergruppe von 290 Patienten mit OPSCCs fortgeschrittener Erkrankungsstadien (Stadium III – IVa; pT3 – 4a und/oder pN+) definiert. Hierbei beinhaltete das Therapiekonzept zu 66,6 % (n = 193) eine aR(C)T. Die Gruppe der Patienten, die mit aR(C)T behandelt wurden, zeigte eine signifikante Assoziation mit höherem RFS und besserer LCR (RFS: 68,9 % vs. 50,1 % P = 0,001; LCR: 85,1 % vs. 69,4 % P = 0,004). Auch unter alleiniger Berücksichtigung der fortgeschrittenen Lokaltumoren (pT3 – 4a; n = 183) zeigte die Gruppe mit einer aR(C)T (65,0 %, n = 119) gegenüber der Gruppe von alleinig chirurgisch und daher unimodal therapierten Patienten (35,0 %, n = 64) ein signifikant höheres RFS (70,2 % vs. 51,1 % P = 0,009) sowie eine signifikant günstigere LCR (83,9 % vs. 64,6 % P = 0,007).

In Tabelle 10 sind die Distribution und die Kaplan-Meier-Schätzungen (OS, DSS, RFS, LCR) sowie Ergebnisse des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T dargestellt. Die Kaplan-Meier Kurven der Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien sind für das RFS in Abbildung 3A und für die LCR in Abbildung 3B illustriert.

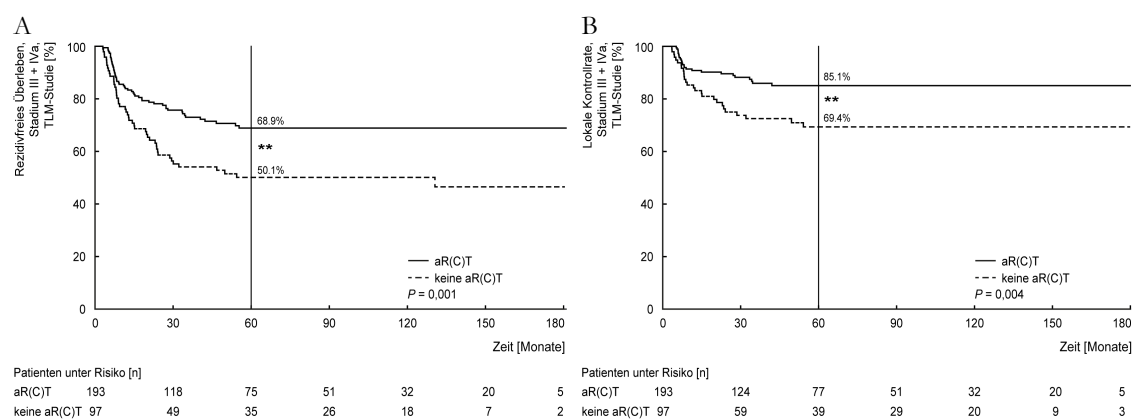
**Tabelle 10: Distribution und Kaplan-Meier-Schätzungen bei fortgeschrittenen OPSCCs und Indikation zur adjuvanten Radio(chemo)therapie (pN+; pT3 – 4)**

Untergruppe	Patienten	OS	DSS	RFS	LCR
	N [%]	[%] <sup>a</sup> P <sup>b</sup>	[%] <sup>a</sup> P <sup>b</sup>	[%] <sup>a</sup> P <sup>b</sup>	[%] <sup>a</sup> P <sup>b</sup>
III – IVa					
Gesamt	290 100	58,5	73,2	62,4	79,5
aR(C)T	193 66,4	57,9 0,318	75,0 0,761	68,9 <b>0,001</b>	85,1 <b>0,004</b>
Keine aR(C)T	97 33,4	59,7	70,3	50,1	69,4
pT3 – 4a					
Gesamt	183 100	59,7	74,5	63,2	76,7
aR(C)T	119 65,0	60,2 0,875	76,2 0,978	70,2 <b>0,009</b>	83,9 <b>0,007</b>
Keine aR(C)T	64 35	59,4	72,2	51,1	64,6

Die Distribution und die Fünf-Jahres-Kaplan-Meier-Schätzungen [%] des OS, DSS, RFS und LCR von Patienten mit OPSCCs fortgeschrittener lokaler Ausdehnung (pT3 – 4a) respektive fortgeschrittener Stadien (III – IVa) sind im Kontext der Durchführung einer aR(C)T modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die P-Werte des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T im primären Therapiekonzept sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Gruppe, die eine aR(C)T erhielt, zeigte eine signifikant höhere LCR sowie ein signifikant höheres RFS verglichen zu Patienten, die keine aR(C)T erhielten. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Fünf-Jahres-Kaplan-Meier-Schätzungen; <sup>b</sup> P-Wert des Log-Rang-Tests des Vergleichs der Patientengruppen mit und ohne aR(C)T im Therapiekonzept.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Abbildung 3: Rezidivfreies Überleben und lokale Kontrollrate bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das rezidivfreie Überleben und B, die lokale Kontrollrate bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium III – IVa sind für das TLM-Kollektiv stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 3.1.5 Funktionelle Ergebnisse, Komplikationen und postoperatives Management

Das postoperative Management beinhaltete bei 66,6 % der Patienten (n = 245) die enterale Ernährung über eine nasogastrale Ernährungssonde. Die mediane Liegedauer betrug 8,5 Tage (Minimum 1 Tag; Maximum 131 Tage). Von diesen Patienten wiesen 64,1 % (n = 157) fortgeschrittene Lokaltumoren (pT3 – 4a) und 84,9 % (n = 208) fortgeschrittene Erkrankungsstadien (III – IVa) auf. Im Rahmen des mittel- und langfristigen Ernährungsmanagements erfolgte bei 13,0 % (n = 48) der Patienten die Anlage einer PEG-Sonde. Von diesen Patienten wiesen wiederum 64,6 % (n = 31) einen Tumor mit fortgeschrittener lokaler Ausdehnung (pT3 – 4a) respektive 93,8 % (n = 45) ein OPSCC in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (III – IVa) auf. Bei 87,5 % (n = 42) von ihnen, war eine aR(C)T Teil des primären Therapiekonzepts. Die Notwendigkeit einer PEG-Sonde bestand bei 6,5 % (n = 24) der Patienten temporär, wobei die medianen Lagedauer 5,2 Monate (Minimum 0,4 Monate; Maximum 26,1 Monate) betrug. Bei 6,5 % (n = 24) aller Patienten persistierte die PEG-Sonde bis zum Tod oder bis zum letzten Kontakt im Rahmen der Nachbeobachtung. Die Anlage der PEG-Sonde erfolgte im Median 46,5 Tage nach der Resektion des Primärtumors (Mittelwert  $74,0 \pm 94,7$  Tage; Minimum 0 Tage; Maximum 431 Tage). Die Verteilung des postoperativen Bedarfs einer supportiven Ernährungstherapie über eine nasogastrale oder PEG-Sonde ist jeweils bezogen auf die lokale Tumorausdehnung, die Erkrankungsstadien und die Durchführung einer aR(C)T in Tabelle 11 zusammengefasst. Wie dargestellt, zeigte sich jeweils eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Applikation von nasogastralen und PEG-Sonden in Bezug auf alle diese drei Charakteristika (Tabelle 11, jeweils  $P < 0,05$ ).

Im Rahmen des Atemwegsmanagements erfolgte bei 3,8 % (n = 14) der Patienten eine Tracheotomie. Prä- oder intraoperativ erfolgte dieser Eingriff bei 1,6 % (n = 6) der Patienten. Bei weiteren 1,4 % (n = 5) wurde eine Tracheotomie innerhalb der ersten dreißig postoperativen Tage im Rahmen von Therapiekomplicationen wie beispielsweise therapie-assoziiertes Blutung oder Schwellung durchgeführt. Bei 0,5 % (n = 2) erfolgte eine Tracheotomie nach dem Beginn der aR(C)T.

Komplicationen wie Blutung, Fistel- und/oder Abszessausbildung traten im Rahmen der chirurgischen Therapie des Primärtumors bei insgesamt 12,0 % (n = 44) der Patienten auf. Von diesen betrafen 65,9 % (n = 29 von 44) Patienten mit fortgeschrittenen OPSCCs (pT3 – 4), wohingegen bei 34,1 % (n = 15 von 44) lokal begrenzte Karzinome vorlagen (P = 0,022). Details über Art, Häufigkeit und korrespondierende Behandlung von Blutungen, Fistel- und/oder Abszessausbildungen sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 11: Postoperative Ernährungstherapie über nasogastrale und PEG-Sonden**

Untergruppe	Nasogastrale Sonde			PEG-Sonde		
	erhalten N [%]	nicht erhalten N [%]	P <sup>a</sup>	erhalten N [%]	nicht erhalten N [%]	P <sup>a</sup>
pT-Kategorie						
pT1 – 2	88 35,9	97 78,9	<b>&lt; 0,001</b>	17 35,4	168 52,5	<b>0,027</b>
pT3 – 4a	157 64,1	26 21,1		31 64,6	152 47,5	
Stadium						
I – II	37 15,1	41 33,3	<b>&lt; 0,001</b>	3 6,3	75 23,4	<b>0,007</b>
III – IVa	208 84,9	82 66,7		45 93,8	245 76,6	
aR(C)T						
Ja	153 62,4	54 43,9	<b>0,001</b>	42 87,5	165 51,6	<b>&lt; 0,001</b>
Nein	92 37,6	69 56,1		6 12,5	155 48,4	

Die Verteilung der Anlage nasogastraler Sonden beziehungsweise PEG-Sonden ist jeweils im Kontext der lokalen Tumorausdehnung (pT1 – 2 vs. pT3 – 4a), prognostischer Stadien (I – II vs. III – IVa) und Durchführung einer aR(C)T dargestellt. Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten mit und ohne Erhalt einer jeweiligen Sondenanlage sind aufgeführt. Signifikante P-Werte (P ≤ 0,05) sind fettgedruckt dargestellt.

Notizen: <sup>a</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; PEG-Sonde = perkutane endoskopische Gastrostomiesonde; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation.

**Tabelle 12: Postoperative Komplikationen und anschließende Intervention**

Blutung/Fistel/Abszessausbildung und anschließende Therapie	Gesamt, n = 368	pT1 – 2, n = 185	pT3 – 4a, n = 183
	n [%]	n [%]	n [%]
Nein	324 88,0	170 91,9	154 84,2
Ja	44 12,0	15 8,1	29 15,8
Blutung, n = 42 (11,4 %)			
Elektrokauterisation/Gefäßklemmen	38 10,3	15 8,1	23 12,6
Ligation eines Astes der A. carotis externa	4 1,1	0 0,0	4 2,2
Fistel, n = 1 <sup>a</sup> (0,3 %)			
Defektdeckung mit lokalem Muskellappen	1 <sup>a</sup> 0,3	0 0,0	1 <sup>a</sup> 0,5
Abszess, n = 1 (0,3 %)			
Chirurgische Drainage	1 0,3	0 0,0	1 0,5

Die Verteilung aufgetretener Komplikationen in Form von Blutungen, Ausbildung von Fisteln und/oder Abszessen ist für das Gesamtkollektiv sowie im Kontext der lokalen Tumorausdehnung (pT1 – 2 vs. pT3 – 4a) modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Zwischen Patienten mit lokal begrenzten und fortgeschrittenen Tumoren zeigte sich insgesamt eine signifikant unterschiedliche Verteilung (Pearson Chi-Quadrat-Test, P = 0,022). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Auftreten während einer initialen Tumoresektion mit simultaner Neck-Dissection.

### 3.1.6 p16-Status

Zur Analyse der onkologischen Ergebnisse einer TLM-basierten Primärtherapie im Kontext einer p16-Überexpression, wurde eine Untergruppe von Patienten mit Resektionsdatum zwischen 2000 und 2015 definiert. Der p16-Status von 125, der insgesamt 161 in diesem Zeitraum resezierten Primärtumoren konnte ermittelt werden. Von diesen stellten sich 44,0 % (n = 55) als p16-positiv und 56,0 % (n = 70) als p16-negativ da.

Eine Übersicht über die Distribution von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten sowie das Auftreten von Rezidiven innerhalb dieser Untergruppe ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Der überwiegende Teil wies ein OPSCC im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (III – IVa) auf (81,6 %, n = 102). Der p16-Status zeigte in dieser Gruppe eine relativ homogene Verteilung (III – IVa; p16-positiv: n = 50, p16-negativ: n = 52) und die Ereigniszeitanalysen demonstrierten für die Gruppe mit einem p16-positivem Karzinom ein signifikant besseres OS (83,2 % vs. 63,1 % P = 0,019)-sowie einen Trend zu besserem DSS (84,9 % vs. 71,3 % P = 0,075) und RFS (77,2 % vs. 62,5 % P = 0,087) (Tabelle 14, Abbildung 4).

**Tabelle 13: Klinisch-pathologische Charakteristika bei p16-positiven und p16-negativen OPSCCs**

Charakteristikum	Gesamt, n = 125	p16-positiv, n = 55	p16-negativ, n = 70	P
	n [%]	n [%]	n [%]	
Alter [Jahren]				
Mittelwert ± SD	57,9 ± 10,0	58,5 ± 11,1	57,4 ± 8,9	
Median (Min. – Max.)	55,5 (29,2 – 91,4)	56,0 (29,2 – 91,4)	55,0 (40,3 – 76,4)	
Geschlecht				
Männlich	100 80,0	43 78,2	57 81,4	0,652
Weiblich	25 20,0	12 21,8	13 18,6	
pT-Kategorie				
pT1	20 16,0	8 14,5	12 17,1	0,135
pT2	41 32,8	23 41,8	18 25,7	
pT3	41 32,8	18 32,7	23 32,9	
pT4a	23 18,4	6 10,9	17 24,3	
N-Kategorie				
c/pN0	39 31,2	10 18,2	29 41,4	0,058
pN1	22 17,6	12 21,8	10 14,3	
pN2a	3 2,4	2 3,6	1 1,4	
pN2b	48 38,4	26 47,3	22 31,4	
pN2c	13 10,4	5 9,1	8 11,4	
Stadieneinteilung				
I	9 7,2	0 0,0	9 12,9	0,037
II	14 11,2	5 9,1	9 12,9	
III	29 23,2	14 25,5	15 21,4	
IVa	73 58,4	36 65,5	37 52,9	
Therapie				
TLM	12 9,6	2 3,6	10 14,29	0,230 <sup>a</sup>
TLM + ND	35 28,0	16 29,1	19 27,14	
TLM + ND + aRT	29 23,2	13 23,6	16 22,86	
TLM + ND + aRCT	46 36,8	23 41,8	23 32,86	
TLM + aRT	2 1,6	1 1,8	1 1,43	
TLM + aRCT	1 0,8	0 0,0	1 1,43	
Rezidiv				
Nein	97 77,6	46 83,6	51 72,9	0,151
Ja	28 22,4	9 16,4	19 27,1	
Lokal	17 13,6	5 9,1	12 17,1	
Lokoregionär	2 1,6	1 1,8	1 1,4	
Regioär	9 7,2	3 5,5	6 8,6	
Fernmetastase im Verlauf				
Nein	111 88,8	50 90,9	61 87,1	0,507
Ja	14 11,2	5 9,1	9 12,9	

Die Distribution von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und des Auftretens von Rezidiven und Fernmetastasen ist für die gesamte Untergruppe sowie stratifiziert nach dem p16-Status der OPSCCs modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten mit p16-positivem und p16-negativen OPSCCs sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie, die zwischen 2000 und 2015 therapiert wurden und bei denen der p16-Status des Primärtumors ermittelt werden konnte ( $n = 125$ ).

Notizen: <sup>a</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen TLM vs. TLM + ND vs. TLM + aR(C)T vs. TLM + ND + aR(C)T.

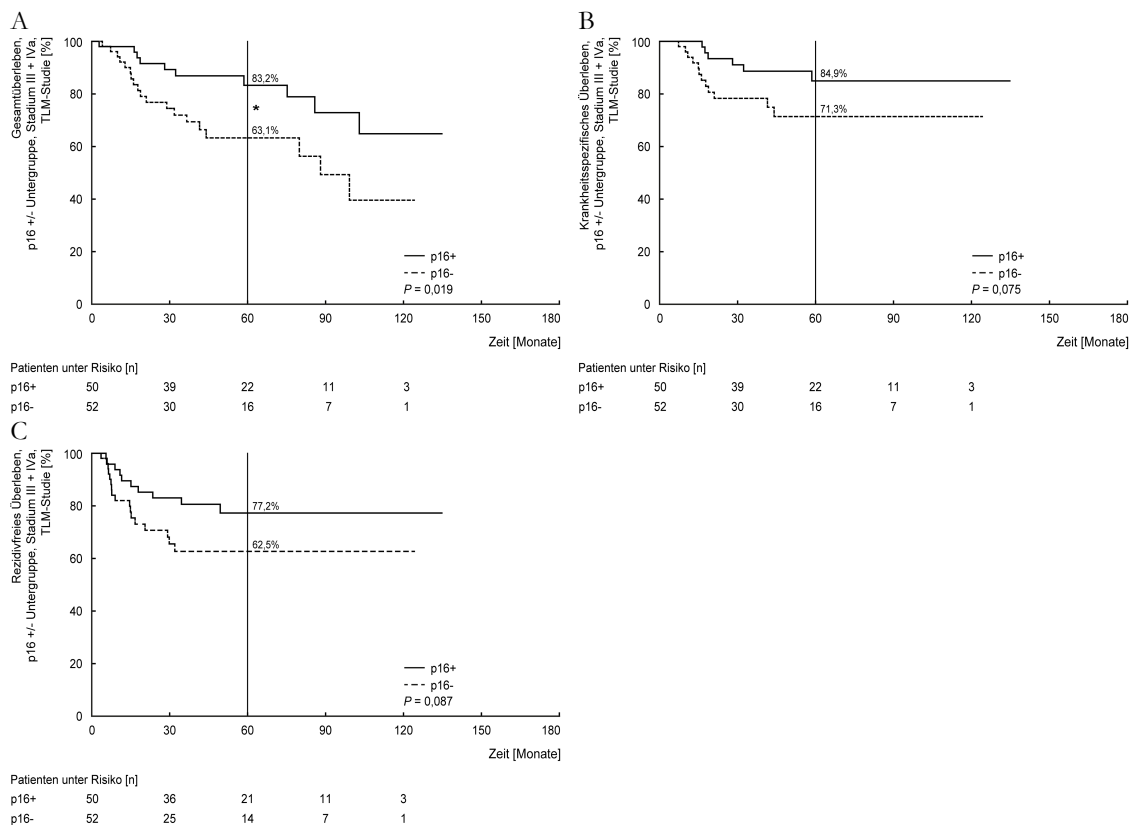
Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; ND = Neck-Dissection; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; TLM = transorale Lasermikrochirurgie;

**Tabelle 14: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs fortgeschrittener Erkrankungsstadien III – IVa, stratifiziert nach dem p16-Status**

Endpunkt	Oropharynxkarzinom im Stadium III – IVa			P
	Gesamt, n = 102	p16-positiv, n = 50	p16-negativ, n = 52	
OS [%]	73,3	83,2	63,1	<b>0,019</b>
DSS [%]	78,3	84,9	71,3	0,075
RFS [%]	69,9	77,2	62,5	0,087
LCR [%]	85,6	89,5	82,4	0,169

Die Fünf-Jahres-Kaplan-Meier-Schätzungen bei OPSCCs fortgeschrittener Erkrankungsstadien (Stadium III – IVa) sind für die gesamte Untergruppe sowie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die P-Werte des Log-Rang-Tests zwischen den onkologischen Ergebnissen von Patienten mit p16-positiven und p16-negativen OPSCCs sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der TLM-Studie, die zwischen 2000 und 2015 therapiert wurden und bei denen der p16-Status des Primärtumors ermittelt werden konnte ( $n = 125$ ).

Abkürzungen: DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Abbildung 4: Gesamtüberleben, krankheitsspezifisches und rezidivfreies Überleben bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem p16-Status.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische und C, das rezidivfreie Überleben sind für OPSCCs der fortgeschrittenen Stadien III – IVa der TLM-Studie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



### **3.1.7 Aktuelle Literatur zu den gängigen Therapiestrategien für OPSCCs**

Eine Übersicht über die Ergebnisse der TLM-Studie sowie die Ergebnisse aktueller Studien, die onkologische Langzeitergebnisse unterschiedlicher Therapiestrategien mit kurativer Intention für OPSCCs analysierten, ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Studien zu Langzeitergebnissen kurativer Therapiestrategien bei OPSCCs

Studie	Th.	N	Bemerkung	p16	Edition	UICC Stadien	TNM	OS [%]	DSS [%]	RFS [%]	LCR [%]
TLM-Studie der vorliegenden Arbeit (Weiss et al. 2019b)	1	368		15 % p16+; 19 % p16-; 66 % p16 N/A	7. (2009)	I – IVa (79 % III – IVa)	pT1 – 4	I 76, II 71, III 62, IVa 57; I – IVa 62 II 100 III 92, IVa 80; II – IVa 85; III – IVa 83 I 86, II 71, III 66, IVa 62; I – IVa 67; III – IVa 63	I 93, II 86, III 72, IVa 74; I – IVa 77 II 100 III 92, IVa 82; II – IVa 86; III – IVa 85 I 86, II 89, III 66, IVa 75; I – IVa 76; III – IVa 71	I 69, II 50, III 59, IVa 64; I – IVa 61 II 53 III 61, IVa 84; II – IVa 75; III – IVa 77 I 63, II 42, III 53, IVa 70; I – IVa 59; III – IVa 62	pT1 84, pT2 74, pT3 77, pT4a 76; pT4a 77 pT1 86, pT2 83, pT3 88; pT4a 100; pT1 – 4a 86 pT1 69, pT2 82 pT3 80, pT4a 82; pT1 – 4a 78
	1	55 <sup>b</sup>		100 % p16+	7. (2009)	II – IVa (91 % III – IVa)	pT1 – 4 (44 % pT3 – 4)				
	1	70 <sup>b</sup>		100 % p16-	7. (2009)	I – IVa (74 % III – IVa)	pT1 – 4				
(Dalton et al. 2020)	1	264	61% p16+ HPV-ISH +	≥ 66 % p16+	7. (2009)	I – IVa (77 % III – IVa)	N/A	75	86	N/A	N/A
	1	264	61 % p16+ HPV-ISH +	≥ 66 % p16+	8. (2017)	I – IV (26 % III – IV)	T1 – 4 N0 – 3 (21 % T3 – 4)	75	86	N/A	N/A
	1	173	100 % p16+ HPV-ISH +	100 % p16+	7. (2009)	I – IV (86 % III – IV)	N/A	86	94	N/A	N/A
	1	173	100 % p16+ HPV-ISH +	100 % p16+	8. (2017)	I – IV (7 % III – IV)	T1 – 4 N0 – 2 (24 % T3 – 4)	86	94	N/A	N/A
	1	91	p16- oder HPV-ISH -	N/A	7. (2009)	I – IV (62 % III – IV)	N/A	53	71	N/A	N/A
	1	91	p16- oder HPV-ISH -	N/A	8. (2017)	I – IV (63 % III – IV)	T1 – 4 N0 – 3 (15 % T3 – 4)	53	71	N/A	N/A
(Rogers et al. 2016)	1	162	55 % HPV+; 31 % HPV-; 14 % HPV N/A	N/A	N/A	I – IV (79 % III – IV)	NA	68	N/A	N/A	N/A

Studie	Th.	N	Bemerkung	p16	UICC		OS [%]	DSS [%]	RFS [%]	LCR [%]	
					Edition	Stadien					TNM
(Karatzanis et al. 2012)	1	53	.	N/A	6. (2002)	N/A	pT1 Nx	N/A	89	N/A	pT1 95
	2	170	.	N/A	6. (2002)	N/A	pT1 Nx	N/A	87	N/A	pT1 91
(Iro et al. 2011)	1	59	.	N/A	7. (2009)	N/A	pT1 Nx	74	86	N/A	pT1 91,7
	1	75	.	N/A	7. (2009)	N/A	pT2 Nx	74	72	N/A	pT2 86,7
(Haughey et al. 2011)	1	204	multizentrisch; 62 % HPV-ISH+; 22 % HPV-ISH-; 17 % HPV N/A	82 % p16+; 9 % p16-; 9 % p16 N/A	N/A	III – IV	pT1 – 4 N0 – 3 (34 % T3 – 4)	78	84	74	N/A
(Rich et al. 2009)	1	84	.	82 % p16+; 5 % p16-; 13 % p16 N/A	N/A	III – IV	pT1 – 4 (26 % T3 – 4)	T1 – 2 92, T3 – 4 68; T1 – 4 88	T1 – 2 96, T3 – 4 82; T1 – 4 92	N/A	N/A
	1	69	.	100 p16+	N/A	III – IV	pT1 – 4 pN0 – 3	90	94	N/A	N/A
	1	4	.	100 p16-	N/A	III – IV	pT2 – 3 pN1 – 3	25	50	N/A	N/A
(Grant et al. 2009)	3	25	.	N/A	N/A	I – II	pT1 – 2 N0	79	88	N/A	N/A
	3	44	.	N/A	N/A	III – IV	NA	86	86	N/A	N/A
(Sinha et al. 2017)	4	20	.	95 % p16+; 5 % p16-	N/A	N/A	cT2 – 4b cN0 – 3	83	87	N/A	N/A
(Dhanireddy et al. 2019)	5	65	100 % T1 – 2; 100 % Karanofsky-Index ≤ 70%	80 % p16+; 15 % p16-; 5 % p16 N/A	7. (2009)	N/A	cT1 – 2 pN0 – 3	70	N/A	N/A	N/A
	6	54	100 % T1 – 2; 100 % Karanofsky-Index ≤ 70 %	46 % p16+; 6 % p16-; 48 % p16 N/A	7. (2009)	N/A	cT1 – 2 cN0 – 3	81	N/A	N/A	N/A
(Moore et al. 2018)	5	314	91 % HPV/p16; 7 % HPV/p16-; 2 % HPV/p16 N/A	N/A	7. (2009)	I – IV (82 % III – IV)	pT1 – 4 (12 % T3 – 4; 1 % TNA)	86	94	N/A	LRC 92
(Park YM et al. 2017)	7	80	.	59 % p16+; 41 % p16-	7. (2009)	III – IV	pT1 – 4 N0 – 3 (36 % pT3 – 4)	III 92, IV 83, III – IV 89	III 92; IV 90; III – IV 90	N/A	N/A
	7	47	.	100 % p16+	7. (2009)	III – IV	pT1 – 4 N1 – 2	N/A	93	N/A	N/A
	7	47	.	100 % p16+	8. (2017)	I – III	T1 – 4 N1 – 2	N/A	93	N/A	N/A
	7	33	.	100 % p16-	7. (2009)	N/A	N/A	N/A	89	N/A	N/A
(Moncrieff et al. 2009)	8	92	.	p16 N/A	N/A	N/A	pT1 – 2 pN0 – 3	N/A	pT1 96, pT2 78; pT1 – 2 83	N/A	87

Studie	Th.	N	Bemerkung	p16	UICC		OS [%]	DSS [%]	RFS [%]	LCR [%]	
					Edition	Stadien					TNM
(Laccourreya et al. 2005)	9	166	.	p16 N/A	5. (1997)	I – IV (31 % III – IV)	pT1 – 3 pN0 – 3	58			pT1 89, pT2 82, pT3 63; pT1 – 3 82
(Rahmati et al. 2015)	10	88	.	55 % p16+; 20 % p16-; 25 % N/A	N/A	I – IV (83 % III – IV)	pT1 – 4 N0 – 2 (25 % T3 – 4)	pT1 81, pT2 70, pT3 40, pT4 37; pT1 – 4 66	pT1 92, pT2 78, pT3 50, pT4 69; pT1 – 4 82	N/A	89
	10	48	.	100 % p16+	N/A	N/A	N/A	74	89	N/A	N/A
	10	18	.	0 % p16+	N/A	N/A	N/A	47	66	N/A	N/A
(Culie et al. 2021)	11	278	multizentrisch	100 % p16-	7. (2009)	I – IV (84 % III – IV)	T1 – 4a ≤N2c	50	62	43	N/A
	11	45	multizentrisch	100 % p16-	7. (2009)	I – II	NA	66	82	50	NA
	11	233	multizentrisch	100 % p16-	7. (2009)	III – IV	NA	50	58	42	NA
(Denis et al. 2004)	12	112	.	N/A	N/A	III – IV	T1 – 4 (86 % T3 – 4)	16	N/A	N/A	LRC: 25
	6	108	.	N/A	N/A	III – IV	T1 – 4 (86 % T3 – 4)	22	N/A	N/A	LRC: 48
(Mendenhall et al. 2006b)	13	503	100 % Tonsille	N/A	6. (2002)	I – IV (19 % III; 37 % IVa; 24 % IVb)	T1 – 4 N0 – 3	I 54, II 61, III 62, IVa 57, IVb 33; I – IV 53	I 100, II 86, III 84, IVa 73, IVb 46; I – IV 72	N/A	T1 88, T2 84, T3 78, T4 61; T1 – 4 79
(Mendenhall et al. 2006a)	13	333	100 % Zungengrund	N/A	6. (2002)	I – IV (17 % II; 37 % IV a; 38 % IVb)	T1 – 4 N0 – 3	I – II 67, III 66, IVa 67, IVb 33; I – IV 54	I – II 91, III 77, IVa 84, IVb 45; I – IV 68	N/A	T1 98, T2 92, T3 82, T4 53; T1 – 4 82

---

Studien zu Langzeitergebnissen gängiger kurativer Therapiestrategien bei OPSCCs sind als Übersicht und modifiziert nach Weiss et al. (2019b) dargestellt (Weiss et al. 2019b). Im oberen Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des gesamten Kollektivs der vorliegenden Arbeit sowie der p16-stratifizierten Untergruppen der TLM-Studie aufgeführt.

Notizen: <sup>a</sup> Einschlusszeitraum 1986 – 2015; <sup>b</sup> Einschlusszeitraum 2000 – 2015 (Fälle mit verfügbarem in Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe).

Legende der Therapiestrategien: 1 = TLM ± ND ± aR(C)T; 2 = transorale Elektroauterisation ± ND ± aR(C)T; 3 = TLM ± ND; 4 = TLM ± zusätzliche konventionelle transzervikale Tumorresektion + Pharyngotomie zur weiteren Rekonstruktion ± aR(C)T; 5 = TORS + ND ± aR(C)T; 6 = konkomitante pRCT; 7 = TORS ± ND ± neoadjuvante CTx ± aR(C)T; 8 = konventionelle Chirurgie (transorale oder *lipsplit* Mandibulotomie) ± ND ± aR(C)T; 9 = konventionelle Chirurgie (transorale laterale Oropharyngektomie) ± ND ± preoperative Induktions-CTx ± RT; 10 = Konventionelle Chirurgie ± Rekonstruktion ± ND ± aR(C)T; 11 = intensitätsmodulierte pRT ± Induktions-CTx oder konkomitante CTx oder Cetuximab); 12 = pRT; 13 = pRT ± (Induktions- und/oder konkomitante) CTx ± ND.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; c/pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; CTx = Chemotherapie; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; HPV = Humaner Papillomavirus; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; LRC = *loco-regional control*, lokoregionale Kontrollrate; N/A = *not available*, nicht verfügbar; ND = Neck-Dissection; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; pR(C)T = primäre Radio(chemo)therapie; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben; Th. = Therapiestrategie; TLM = transorale Lasermikrochirurgie; TORS = *transoral robotic surgery*, transorale roboterassistierte Chirurgie; UICC = Union Internationale Contre le Cancer.

## 3.2 Ergebnisse der pN1-Studie: Adjuvante Radio(chemo)therapie bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten, ECS-negativen Kopf-Hals-Karzinomen

### 3.2.1 Patienten und Therapiekonzepte

65 Patienten mit einem pT1 – 2 pN1 M0 ECS-negativ klassifizierten Kopf-Hals-Karzinom erfüllten die, in Abschnitt 2.3.2 erläuterten Einschlusskriterien und bildeten das Gesamtkollektiv der pN1-Studie (pN1-Kollektiv). Die Hauptlokalisation der Tumore befand sich zu 27,7 % (n = 18) in der Mundhöhle, zu 46,2 % (n = 30) im Oropharynx und zu 26,2 % (n = 17) im Hypopharynx.

Bei allen Patienten wurde eine Resektion des lokalen Primärtumors mittels TLM und eine selektive ND durchgeführt. Die ND erfolgte bei 70,8 % (n = 46) unilateral und bei 29,2 % (n = 19) bilateral. Die Level II und III wurden bei allen bis auf einen Patienten (98,5 %; n = 64) in die ND eingeschlossen. Unter Berücksichtigung der insgesamt 84 behandelten Halsseiten erfolgte die Ausräumung von Level I zu 32,1 % (n = 27), Level IV zu 27,4 % (n = 23) und Level V zu 11,9 % (n = 10). Entsprechend der Einschlusskriterien wurde im Rahmen der histopathologischen Beurteilung der Präparate bei allen Patienten eine singuläre ipsilaterale Lymphknotenmetastase mit einem Durchmesser von maximal drei Zentimeter ohne extrakapsuläre Ausbreitung diagnostiziert. Bei Patienten mit OSCCs war diese bei 27,8 % (n = 5) in Level I, bei 27,8 % (n = 5) in Level II, bei 33,3 % (n = 6) in Level II – III und 5,6 % (n = 1) in Level III lokalisiert. Bei 5,6 % (n = 1) der Patienten mit OSCCs wurde die Lokalisation der Lymphknotenmetastase im Kontext einer Ausräumung der Level I – IV als en-block-Resektat nicht näher dokumentiert. Innerhalb der Patienten mit OPSCCs wurde die Lymphknotenmetastase in 26,7 % (n = 8) in Level II und in 50,0 % (n = 15) in Level II – III nachgewiesen. Bei 23,3 % (n = 7) der Patienten mit OPSCC, bei denen eine en-block-Resektion von drei bis fünf Leveln erfolgte, wurde die Lokalisation der Lymphknotenmetastase nicht näher präzisiert. Bezogen auf Patienten mit HPSCCs war die Lymphknotenmetastase bei 35,3 % (n = 6) in Level II, bei 11,8 % (n = 2) in Level III und bei 41,2 % (n = 7) in Level II – III lokalisiert. Bei zwei (11,8 %) Patienten mit HPSCCs, bei denen die ND Level II – IV umfasste, wurde die Lokalisation der Lymphknotenmetastase nicht näher präzisiert.

Das Therapiekonzept umfasste bei 32,3 % (n = 21 von 65) Patienten eine aR(C)T. Bezogen auf die Primärlokalisation der Tumoren erfolgte diese bei 22,2 % (n = 4) der 18 Patienten mit OSCCs, bei 46,7 % (n = 14) der 30 Patienten mit OPSCCs und 17,6 % (n = 3) von 17 Patienten mit HPSCCs. Ergänzend zur Radiotherapie wurde bei insgesamt 57,1 % der Patienten (n = 12) eine Chemotherapie durchgeführt.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit bis zum Tod oder letzten Kontakt betrug im pN1-Kollektiv  $80,7 \pm 50,7$  Monate mit einem Maximum von 208 Monaten. Bei 58,8 % ( $n = 38$ ) wurde die Nachsorge nach mehr als fünf Jahren fortgeführt. Klinisch-pathologische Charakteristika sowie Nachsorgeinformationen sind für das Gesamtkollektiv der pN1-Studie sowie die entsprechend der Durchführung einer aR(C)T stratifizierten Behandlungsgruppen in Tabelle 16 dargestellt. Zwischen beiden Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der analysierten Charakteristika (P-Werte  $> 0,05$ ; Tabelle 16).

**Tabelle 16: Klinisch-pathologische Charakteristika und Nachsorgedaten bei pT1–2 pN1 ECS-negativen OSCCs, OPSCCs oder HPSCCs stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T**

Charakteristikum	Gesamt, n = 65	aR(C)T, n = 21	keine aR(C)T, n = 44	P <sup>a</sup>
	n [%]	n [%]	n [%]	
Jahr der Erstdiagnose				
1986 – 2000	46 70,8	14 66,7	32 72,7	0,615
2001 – 2015	19 29,2	7 33,3	12 27,3	
Geschlecht				
Männlich	53 81,5	17 81,0	36 81,8	0,933
Weiblich	12 18,5	4 19,0	8 18,2	
Alter [Jahre]				
Mittelwert ± SD	56,5 ± 7,9	57,7 ± 7,5	55,9 ± 8,1	
Median (Min. – Max.)	57,0 (39,0 – 77,3)	59,1 (42,8 – 68,3)	55,3 (39,0 – 77,3)	
< 57	33 50,8	8 38,1	25 56,8	0,158
> 57	32 49,2	13 61,9	19 43,2	
Topografie der Primärtumoren				
OSCCs	18 27,7	4 19,0	14 31,8	0,069
HPSCCs	17 26,2	3 14,3	14 31,8	
OPSCCs	30 46,2	14 66,7	16 36,4	
p16-unbekannt	17 56,7	9 64,3	8 50,0	0,569
p16-positiv	9 30,0	3 21,4	6 37,5	
p16-negativ	4 13,3	2 14,3	2 12,5	
pT-Kategorie				
pT1	28 43,1	8 38,1	20 45,5	0,575
pT2	37 56,9	13 61,9	24 54,5	
Differenzierungsgrad				
Hoch (Grad 1)	1 1,5	1 4,8	0 0,0	0,285
Moderat (Grad 2)	48 73,8	14 66,7	34 77,3	
Schlecht (Grad 3)	16 24,6	6 28,6	10 22,7	
Größe der Lymphknotenmetase				
Mikrometastase	10 15,4	1 4,8	9 20,5	0,123 <sup>b</sup>
Makrometastase	34 52,3	12 57,1	22 50,0	
Keine Information	21 32,3	8 38,1	13 29,5	
Nachbeobachtung [Monate]				
Mittelwert ± SD	80,7 ± 50,7	93,4 ± 48,5	74,6 ± 51,2	
Median (Min. – Max.)	75,7 (10,3 – 208,5)	88,3 (10,3 – 208,5)	64,4 (12,5 – 190,7)	

Informationen über Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und die Nachsorge bei pT1–2 pN1 ECS-negativen HNSCCs (OSCCs, OPSCCs, HPSCCs) sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T im primären Therapiekonzept sind aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der pN1-Studie.

Notizen <sup>a</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Test zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T im primären Therapiekonzept; <sup>b</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests unter Ausschluss der Patienten ohne verfügbare Information.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HPSCC = *hypopharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OSCC = *oral squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation.



### 3.2.2 Onkologische Ergebnisse

In Bezug auf die onkologischen Ergebnisse wurden das Auftreten von Rezidiven, Fernmetastasen und Zweitmalignomen analysiert sowie Ereigniszeitanalysen durchgeführt.

Ein Rezidiv manifestierte sich bei insgesamt 9,5 % ( $n = 2$ ) der Patienten, die mit aR(C)T behandelt wurden, wohingegen bei 54,5 % ( $n = 24$ ) der Patienten ohne aR(C)T im Therapie-konzept der Primärtherapie ein Rezidiv auftrat ( $P = 0,001$ ). Von diesen Patienten wurde bei 11,4 % ( $n = 5$ ) im weiteren Verlauf ein zweites Rezidiv diagnostiziert, wohingegen sich bei keinem der adjuvant bestrahlten Patienten ein zweites Rezidiv manifestierte. ( $P = 0,108$ ).

Wenngleich die Anzahl im Verlauf der Nachsorge diagnostizierter Fernmetastasen zwischen beiden Behandlungsgruppen keine signifikante Abweichung aufwies, traten Fernmetastasen häufiger bei Patienten ohne aR(C)T auf (15,9 % vs. 4,8 %  $P = 0,201$ ). Von insgesamt acht Patienten mit einer späteren Fernmetastasierung gehörte einer (12,5 %) zur Gruppe postoperativ bestrahlter Patienten. Dieser entwickelte kein lokales oder regionäres Rezidiv, präsentierte sich jedoch 27,2 Monaten nach der Tumorresektion mit einer ausgedehnten Fernmetastasierung in Knochen, Lunge und weiteren Organen. Die verbleibenden sieben (87,5 %) Fernmetastasierungen wurden bei Patienten ohne aR(C)T nach einem mittleren Zeitraum von  $36,7 \pm 33,7$  Monaten nach Tumorresektion nachgewiesen. Diese manifestierten sich nach einem mittleren Zeitabstand von  $28,3 \pm 33,4$  Monate nach dem Auftreten eines lokalen (42,9 %,  $n = 3$ ) oder regionären (57,1 %,  $n = 4$ ) Rezidivs.

Das Auftreten von Zweitmalignomen in der Kopf-Hals-Region war zwischen den Patienten-gruppen, die mit oder ohne aR(C)T behandelt wurden, vergleichbar verteilt (14,3 % ( $n = 3$ ) bei aR(C)T vs. 13,6 % ( $n = 6$ ) ohne aR(C)T,  $P = 0,943$ ).

Eine Übersicht über die onkologischen Langzeitergebnisse beider Behandlungsgruppen ist in Tabelle 17 gezeigt.

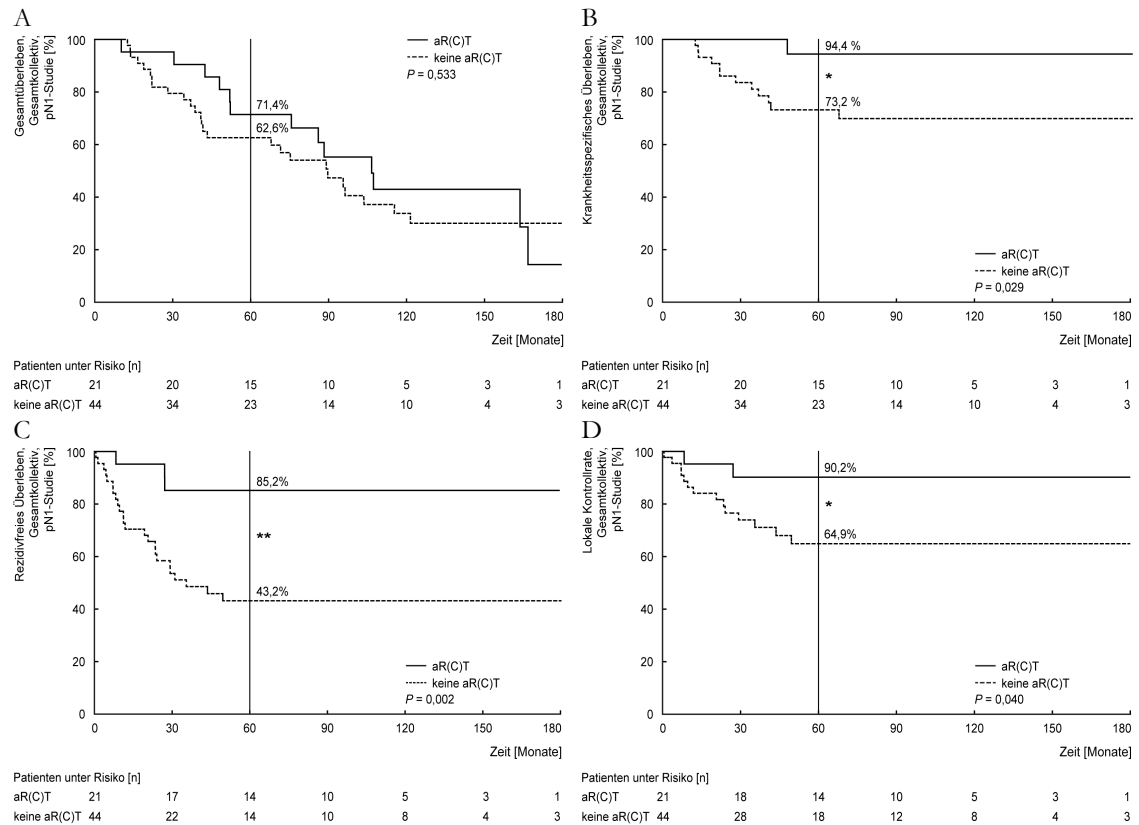
Die Ereigniszeitanalysen ergaben bezogen auf das gesamte pN1-Kollektiv für das Fünf-Jahres-OS 65,5 %, -DSS 80,0 %, -RFS 56,9 % und die Fünf-Jahres-LCR 73,4 % als prognostische Schätzwerte. Der Log-Rank-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T in Bezug auf das OS (71,4 % vs. 62,6 %  $P = 0,533$ ). Für das DSS und RFS sowie die LCR wiesen Patienten mit aR(C)T jeweils signifikant höhere Schätzungen auf (DSS: 94,4 % vs. 73,2 %  $P = 0,029$ ; RFS: 85,2 % vs. 43,2 %  $P = 0,002$ ; LCR: 90,2 % vs. 64,9 %  $P = 0,042$ ). Die Kaplan-Meier-Kurven des OS, DSS, RFS und der LCR sind jeweils stratifiziert nach Behandlungsgruppen in Abbildung 5 veranschaulicht.

**Tabelle 17: Onkologische Langzeitergebnisse bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativ klassifizierten HNSCCs stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T**

Charakteristikum	Gesamt, n = 65	aR(C)T, n = 21	keine aR(C)T, n = 44	P <sup>a</sup>
	n [%]	n [%]	n [%]	
Lokales und/oder regionales Rezidiv				
Nein	39 60,0	19 90,5	20 45,5	<b>0,001</b>
Ja	26 40,0	2 9,5	24 54,5	
Zeit initiale Tumorresektion bis Rezidiv; Mittelwert ± SD [Monate]	17,7 ± 13,3	16,7 ± 13,9	17,5 ± 13,3	
Fernmetastase				
Nein	57 87,7	20 95,2	37 84,1	0,201
Ja	8 12,3	1 4,8	7 15,9	
Zeit initiale Tumorresektion bis Fernmetastasen; Mittelwert ± SD [Monate]	35,5 ± 31,4	27,2 ± 0,0	36,7 ± 33,7	
letzter Nachbeobachtungsstatus				
Lebend ohne Manifestation des Primärtumors	26 40,0	8 38,1	18 40,9	0,111
Tumorassoziierter Tod	13 20,0	1 4,8	12 27,3	
Tod in Verbindung mit Zweitmalignom	5 7,7	2 9,5	3 6,8	
Interkurrenter Tod	21 32,3	10 47,6	11 25,0	

Die onkologische Langzeitergebnisse bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen HNSCCs (OSCCs, OPSCCs, HPSCCs) sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten mit und ohne aR(C)T im primären Therapiekonzept sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der pN1-Studie.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HNSCC = *head and neck squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region; HPSCC = *hypopharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OSCC = *oral squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle.



**Abbildung 5: Ereigniszeitanalysen bei pT1–2 pN1 ECS-negativen HNSCCs stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, Gesamtüberleben, B, krankheitsspezifisches und C, rezidivfreies Überleben und D, die lokale Kontrollrate sind bezogen auf das Kollektiv der pN1-Studie stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 3.2.3 Untergruppenanalysen

#### 3.2.3.1 pT-Kategorien

Zur möglichst exakten Analyse potentieller prognostischer Unterschiede und Präsentation möglichst detaillierter Daten als Vergleichsbasis für andere Studien wurden weitere Analysen separiert nach pT-Kategorien durchgeführt.

Bei insgesamt 28 Patienten mit pT1-Karzinom war bei 28,6 % (n = 8) eine aR(C)T Teil des primären Therapiekonzepts. Insgesamt betrug in dieser Gruppe das OS 74,4 %, das DSS 92,7 %, das RFS 63,7 % und die LCR 76,7 %. Wenngleich nicht statistisch signifikant, wiesen die mit aR(C)T behandelten Patienten gegenüber Patienten ohne aR(C)T (71,4 %, n = 20) ein höheres OS und DSS auf (OS: 87,5 % vs. 69,1 % P = 0,282; DSS: 100 % vs. 89,7 % P = 0,234). Ein signifikant höheres Überleben der aR(C)T-Gruppe bei pT1-Karzinom demonstrierte die Analyse des RFS (100 % vs. 48,5 % P = 0,013). Darüber hinaus zeigten diese einen Trend zu einer höheren LCR (100 % vs. 65,9 % P = 0,06).

Innerhalb der 37 Patienten mit pT2-Karzinom erhielten 35,1 % (n = 13) eine aR(C)T. Insgesamt betrug in dieser Gruppe das OS 58,6 %, das DSS 70,3 %, das RFS 51,3 % und die LCR 71,1 %. Vergleichbar mit der pT1-Gruppe zeigten die Schätzungen des OS zwischen Patienten mit oder ohne aR(C)T jeweils keine signifikante Abweichung, wenngleich die Schätzwerte für die aR(C)T-Gruppe höher lagen (OS: 61,5 % vs. 57,2 % P = 0,922; LCR: 83,9 % vs. 64,2 % P = 0,229). Ein signifikant höheres RFS zeigte sich auch bei Patienten mit pT2-Karzinomen mit aR(C)T im Therapiekonzept (75,5 % vs. 38,5 % P = 0,04). Die höheren Schätzungen der LCR für die aR(C)T-Gruppe waren nicht signifikant (LCR: 83,9 % vs. 64,2 % P = 0,229). Ein Trend zeigte sich für das DSS (90,0 % vs. 59,9 % P = 0,053).

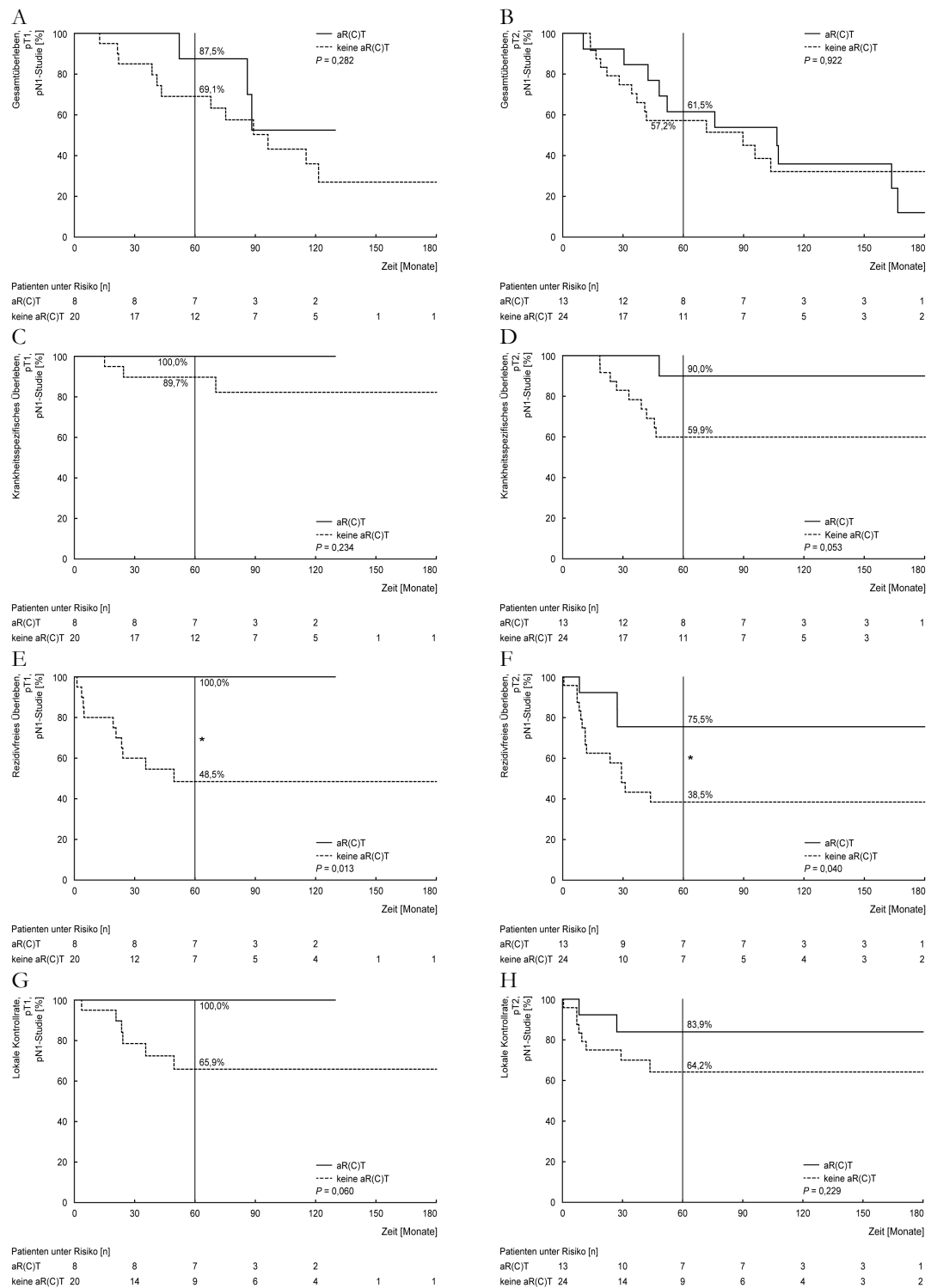
Separiert nach Gruppen mit pT1- und pT2-Karzinomen sind die Kaplan-Meier-Kurven des OS, DSS, RFS und der LCR stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T in Abbildung 6 dargestellt. Die Ereigniszeitanalysen der prognostischen Endpunkte des gesamten pN1-Kollektivs sowie der assoziierten Untergruppenanalysen sind dem oberen Teil von Tabelle 18 zu entnehmen.

#### 3.2.3.2 Hauptlokalisation der Primärtumoren

In der pN1-Studie wies der größte Teil der eingeschlossenen Patienten ein OPSCC auf (46,2 %, n = 30). Der Anteil mit beziehungsweise ohne aR(C)T war vergleichbar (46,7 % (n = 14) vs. 53,3 % (n = 16)). In den Ereigniszeitanalysen der Gruppe mit OPSCC demonstrierten jene mit aR(C)T ein signifikant höheres RFS und einen Trend zu einem überlegenen DSS (RFS: 77,4 % vs. 31,3 % P = 0,011; DSS: 91,7 % vs. 62,5 % P = 0,060). Wenngleich nicht statistisch signifikant, wiesen diese auch ein höhere Werte für das OS und die LCR auf (OS: 64,3 % vs. 62,5 P = 0,409, LCR: 85,1 % vs. 65,7 % P = 0,253 für mit vs. ohne aR(C)T). Die Ergebnisse der Ereigniszeitanalysen sind jeweils für Patienten mit OSCCs, OPSCCs und HPSCCs stratifiziert nach Behandlungsgruppen grafisch in Abbildung

A. 1 im Anhang und tabellarisch im oberen Teil von Tabelle 18 dargestellt. Die Häufigkeiten des Auftretens von Rezidiven und Fernmetastasen ist für jede der drei Hauptlokalisationen stratifiziert nach den Behandlungsgruppen in Tabelle 19 aufgeführt.

Die Bestimmung des p16-Status wurde entsprechend der Empfehlung der American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Fakhry et al. 2018) und des College of American Pathologists (Lewis et al. 2018) sowie in Anlehnung an vorangehende Studien (Ang et al. 2010) auf OPSCCs begrenzt. Der p16-Status konnte bei 43,3 % (n = 13) der OPSCCs ermittelt werden. Für die verbleibenden Fälle war kein Biomaterial für die Bestimmung verfügbar. Innerhalb der beiden Behandlungsgruppen zeigte sich eine relativ homogene Verteilung des p16-Status (P = 0,569; Tabelle 16). Die Ereigniszeitanalysen zeigten für Patienten mit p16-positiven und p16-negativen OPSCCs folgende Ergebnisse: OS 88,9 % vs. 50,0 % (P = 0,101); DSS 88,9 % vs. 66,7 (P = 0,381); RFS 55,6 % vs. 33,3 % (P = 0,587); LCR 76,2 % vs. 100 % (P = 0,530). Aufgrund der geringen Fallzahl mit bekanntem p16-Status wurde auf eine weitere Stratifizierung nach Behandlungsgruppen verzichtet.



**Abbildung 6: Ereigniszeitanalysen bei pT1 pN1 und pT2 pN1, ECS-negativen HNSCCs stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T.** Die Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A, B), krankheitsspezifischen Überlebens (C, D), rezidivfreien Überlebens (E, F) und der lokale Kontrollrate (G, H) bei pT1 pN1 (A, C, E, G) und pT2 pN1 (B, D, F, H) ECS-negativen HNSCCs der Mundhöhle, des Oro- und des Hypopharynx sind für die pN1-Studie stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### **3.2.4 Aktuelle Literatur**

Eine Übersicht über Studien zu onkologischen Langzeitergebnissen von Patienten mit pT1 – 2 pN1 klassifizierten HNSCCs ist unter Angabe der jeweils eingeschlossenen Hauptlokalisationen in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18: Studien zu onkologischen Langzeitresultaten bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten HNSCCs mit oder ohne aR(C)T im primären Behandlungskonzept**

Studie	Datenquelle	ECS	R	N	HNSCCs [%]	aR(C)T	pT1 [n, (%)]	pT2 [n, (%)]	Fünf-Jahres-Schätzungen [%]							
									OS	DSS	RFS	LCR				
pN1-Studie der vorliegenden Arbeit (Weiss et al. 2020b)	einzelne Institution 1986 – 2015	ECS-	R0	65	27,2 O; 46,2 OP; 26,2 HP	Ja	8 (29)	13 (35)	71,4	<b>94,4</b>	<b>85,2</b>	<b>90,2</b>				
						Nein	20 (71)	24 (65)	62,6	<b>73,2</b>	<b>43,2</b>	<b>64,9</b>				
						Gesamt	28 (100)	37 (100)	65,5	80,0	56,9	73,4				
						ECS-	R0	28	28,6 O; 46,4 OP; 25,0 HP	Ja	8 (29)	0 (0)	87,5	100	<b>100</b>	100
										Nein	20 (71)	0 (0)	69,1	89,7	<b>48,5</b>	65,9
										Gesamt	28 (100)	0 (0)	74,4	92,7	63,7	76,7
						ECS-	R0	37	27,0 O; 45,9 OP; 27,0 HP	Ja	0 (0,0)	13 (35)	61,5	90,0	<b>75,5</b>	83,9
										Nein	0 (0)	24 (65)	57,2	59,9	<b>38,5</b>	64,2
										Gesamt	0 (0)	37 (100)	58,6	70,3	51,3	71,1
						ECS-	R0	18	100 O	Ja	2 (25)	2 (20)	100	100	100	100
										Nein	6 (75)	8 (80)	47,6	64,9	54,4	70,7
										Gesamt	8 (100)	10 (100)	59,8	74,3	65,3	77,4
						ECS-	R0	30	100 OP	Ja	5 (38,5)	9 (53)	64,3	91,7	<b>77,4</b>	85,1
										Nein	8 (61,5)	8 (47)	62,5	62,5	<b>31,3</b>	65,7
Gesamt	13 (100)	17 (100)	63,3	75,6	52,2					74,9						
ECS-	R0	17	100 HP	Ja	1 (14)	2 (20)	66,7	100	100	100						
				Nein	6 (86)	8 (80)	76,9	92,3	48,2	61,1						
				Gesamt	7 (100)	10 (100)	75,0	93,8	57,4	67,9						
(Kadletz et al. 2018)	multizentrisch 2000 – 2012	ECS-	R0	31	100 O	Ja	15 (48)	0 (0,0)	92,9	N/A	<b>100</b>	N/A				
						Nein	16 (52)	0 (0,0)	100	N/A	<b>44,9</b>	N/A				
(Chen MM et al. 2016)	Datenbank 2004 – 2013	ECS-	R0	1467	100 O	Ja	332 (45)	408 (56)	<b>58,8</b>	N/A	N/A	N/A				
						Nein	400 (55)	327 (45)	<b>54,4</b>	N/A	N/A	N/A				
		ECS-	R0	790	100 OP	Ja	263 (57)	186 (56)	<b>85,1</b>	N/A	N/A	N/A				
						Nein	196 (43)	145 (44)	<b>74,7</b>	N/A	N/A	N/A				
(Shrime et al. 2010)	Datenbank 1983 – 2004	N/A	N/A	1539	100 O	Ja	442 (78)	767 (79)	<b>54,2</b>	72,1	N/A	N/A				
						Nein	123 (22)	207 (21)	<b>41,4</b>	64,3	N/A	N/A				
						N/A	N/A	565	100 O	Ja	442 (78)	0 (0,0)	63,4	76,6	N/A	N/A
										Nein	123 (22)	0 (0,0)	56,5	75,3	N/A	N/A
						N/A	N/A	974	100 O	Ja	0 (0,0)	767 (79)	<b>48,8</b>	<b>69,5</b>	N/A	N/A
										Nein	0 (0,0)	207 (21)	<b>32,5</b>	<b>57,0</b>	N/A	N/A
(Chen TC et al. 2010)	einzelne Institution 1980 – 2002	ECS+ /ECS-	R0/ R+	59	100 O (Zunge)	Ja	12 (44)	16 (50)	77,0	<b>81,2</b>	N/A	N/A				
						Nein	15 (56)	16 (50)	70,5	<b>53,0</b>	N/A	N/A				
						ECS-	R0	39	100 O (Zunge)	Ja	20 (51)		<b>92,3</b>	<b>95,0</b>	N/A	N/A
										Nein	19 (49)		<b>54,9</b>	<b>54,7</b>	N/A	N/A
(Jackel et al. 2008)	einzelne Institution 1986 – 2002	ECS-	R0	55	20 O; 38,2 OP; 34,5 HP; 7,2 Lx	Ja	5 (25)	11 (31)	63,6	N/A	N/A	N/A				
						Nein	15 (75)	24 (69)	60,7	N/A	N/A	N/A				

Studien, die onkologische Fünf-Jahres-Ergebnisse bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten HNSCCs und mit/ohne aR(C)T im primären Behandlungskonzept untersuchten sind modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Dem oberen Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Gesamtkollektivs sowie der Untergruppen der pN1-Studie zu entnehmen. Signifikante Gruppendifferenzen (P-Werte  $\leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HNSCC = *head and neck squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region; HP = Hypopharynx; Lx = Larynx; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; L0 = keine Lymphgefäßinvasion; N/A = *not available*, nicht verfügbar; OP = Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; O = Mundhöhle; Pn0 = keine perineurale Invasion; R0/R+ = Nachweis von Residualtumor am Resektionsrand negativ (R0)/positiv (R+); RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Tabelle 19: Therapieversagen stratifiziert nach Hauptlokalisierung der Tumoren und Durchführung einer aR(C)T**

Endpunkt	OSCCs		OPSCCs		HPSCCs		Gesamt	
	aR(C)T-J (n = 4)	aR(C)T-N (n = 14)	aR(C)T-J (n = 14)	aR(C)T-N (n = 16)	aR(C)T-J (n = 3)	aR(C)T-N (n = 14)	aR(C)T-J (n = 21)	aR(C)T-N (n = 44)
Rezidiv								
Lokal	0	4	1	3	0	5	1	12
Lokoregionär	0	0	1	2	0	0	1	2
Regionär	0	2	0	6	0	2	0	10
Gesamt	0	6	2	11	0	7	2	24
	0,0 %	42,9 %	14,3 %	68,8 %	0 %	50,0 %	9,5 %	54,5 %
Fernmetastasen	0	1	1	3	0	3	1	7

Das Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen sind als Indizien eines Therapieversagens bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen HNSCCs (OSCCs, OPSCCs, HPSCCs) für das Gesamtkollektiv sowie für die Untergruppen der einzelnen Lokalisationen stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der pN1-Studie.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie, HNSCC = *head and neck squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region; HPSCC = *hypopharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx; J = Ja; N = Nein; OSCC = *oral squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.

### 3.3 Ergebnisse der p16-HPV-Studie: p16-Status und HPV-DNA-Nachweis bei OPSCCs

#### 3.3.1 Patienten und Therapiekonzepte

102 Patienten mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium (pT3 – 4a und/oder pN+; Stadium III – IVa) erfüllten die, in Abschnitt 2.3.3 erläuterten Einschlusskriterien und bildeten das Gesamtkollektiv der p16-HPV-Studie (p16-HPV-Kollektiv).

Entsprechend der Beurteilung des Operateurs hatte der Lokaltumor folgenden Ursprung: bei 40,2 % (n = 41) im Bereich der Tonsillen, bei 25,5 % (n = 26) des Zungengrundes, bei 3,9 % (n = 4) des Weichgaumens, bei 12,7 % (n = 13) der Vallecula, bei 3,9 % (n = 4) der Hinterwand, bei 3,9 % (n = 4) der Seitenwand, bei 5,9 % (n = 6) der Glossotonsillarfurche und Gaumenbogen, bei 2,9 % (n = 3) der Uvula und bei 1 % (n = 1) im Bereich der Fossa tonsillaris.

Entsprechend der Zielsetzung der TLM-Studie erfolgte die Behandlung aller Patienten im Rahmen eines primär TLM-basierten Therapiekonzepts. Die chirurgische Primärtherapie wurde bei 96,1 % (n = 98) ergänzt durch eine ND und bei 73,5 % (n = 75) durch eine aR(C)T. Die Zeit bis zur letzten Nachbeobachtung oder zum Tod betrug im Mittel  $52,3 \pm 35,0$  Monate (Minimum 2,6 Monate Maximum 135,0 Monate; Median 45,2 Monate).

#### 3.3.2 p16-Expression und HPV-Typisierungsergebnisse

Eine p16-Überexpression zeigten 49,0 % (n = 50) der OPSCCs. Ein positiver Nachweis von HPV-DNA zeigte sich bei 40,2 % (n = 41). Die Verteilung des p16- und HPV-Status sowie die Ergebnisse der HPV-Typisierung sind Tabelle 20 zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der Gesamtheit HPV-DNA-positiver OPSCCs wurden die folgenden Genotypen in folgenden Häufigkeiten nachgewiesen: HPV16 bei 80,5 % (n = 33), HPV18 bei 7,3 % (n = 3), HPV33 bei 26,8 % (n = 11), HPV51 bei 2,4 % (n = 1) und HPV59 bei 19,5 % (n = 8). Überwiegend fanden sich Monoinfektionen mit einem einzigen HPV-Genotyp (n = 31; 75,6 %), wobei HPV16 (n = 23; 56,1 %) prädominierte. Der Großteil der OPSCCs (n = 20; 87,0 %) mit einer HPV16-Monoinfektion wies eine p16-Überexpression auf. Mehrfachinfektionen zeigten 24,4 % (n = 10) der HPV-positiven OPSCCs. Bei allen mehrfachinfizierten OPSCCs wurde auch eine Infektion mit HPV16 nachgewiesen, jedoch zeigten lediglich 30,0 % (n = 3) eine p16-Überexpression.

Der p16-Status stimmte bei 63,7 % (n = 65) mit dem HPV-Status überein. Diese OPSCCs waren entweder p16-positiv und HPV-positiv (n = 27; 26,5 %) oder p16-negativ und HPV-negativ (n = 38; 37,3 %). Gegensätzliche Ergebnisse wiesen 36,3 % (n = 37) der OPSCCs auf. In diesen Fällen zeigte sich entweder ein positiver p16-Status bei fehlendem HPV-Nachweis (n = 23; 22,5 %; p16-positiv/HPV-negativ) oder ein negativer p16-Status bei positivem HPV-Nachweis (n = 14; 13,7 %; p16-negativ/HPV-positiv).

**Tabelle 20: HPV-Status und -Typisierung von OPSCCs stratifiziert nach dem p16-Status**

HPV-Status und -Typisierung	Gesamt, n = 102		p16-Immunhistochemie			
			p16-positiv, n = 50		p16-negativ, n = 52	
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
HPV-negativ	61	59,8	23	46,0	38	73,1
HPV-positiv	41	40,2	27	54,0	14	26,9
Monoinfektion	31	75,6	24	88,9	7	50,0
HPV16	23	56,1	20	74,1	3	21,4
HPV18	1	2,4	1	3,7	0	0,0
HPV33	3	7,3	2	7,4	1	7,1
HPV59	4	9,8	1	3,7	3	21,4
Multiple Infektionen	10	24,4	3	11,1	7	50,0
HPV16, HPV18, HPV33	1	2,4	0	0,0	1	7,1
HPV16, HPV18, HPV51	1	2,4	0	0,0	1	7,1
HPV16, HPV33, HPV59	3	7,3	0	0,0	3	21,4
HPV16, HPV33	4	9,8	2	7,4	2	14,3
HPV16, HPV59	1	2,4	1	3,7	0	0,0

Ergebnisse der HPV-Typisierung der OPSCCs sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Abkürzungen: HPV = Humaner Papillomavirus; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.

### 3.3.2.1 Klinisch-pathologische Charakteristika

Klinisch-pathologische Charakteristika sowie Informationen über die Therapie und Nachbeobachtung des p16-HPV-Kollektivs sowie der Untergruppen, welche aus der Berücksichtigung des p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker resultierten, sind in Tabelle 21 aufgeführt. Weder eine Stratifizierung (1) nach p16-Status oder (2) HPV-Status oder (3) der Kombination beider Marker zeigte eine signifikant abweichende Häufigkeitsverteilung hinsichtlich Geschlecht, N-Kategorie, Lymphknotenmetastasen mit ECS, prognostischem Stadium und Therapiecharakteristika (siehe Tabelle 21; Pearson Chi-Quadrat-Test jeweils  $P > 0,1$ ). Eine signifikante Abweichung zeigte sich bei der Verteilung der pT-Kategorie sowohl in der Stratifikation nach dem p16-Status ( $P < 0,01$ ) als auch in der kombinierten Betrachtung beider Marker ( $P = 0,02$ ). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zeigten sich p16-negative Tumoren häufiger als p16-positive OPSCCs lokal fortgeschritten ( $n = 40$  von 52 vs.  $n = 24$  von 50; 76,9 % vs. 48,0 %). Im Einklang damit handelte es sich bei einheitlich p16-negativen/HPV-negativen OPSCCs häufiger um Tumoren der Kategorien pT3 – 4a (pT3 – 4a:  $n = 29$  von 38; 76,3 %), wohingegen einheitlich p16-positive/HPV-positive OPSCCs größtenteils eine lokal umschriebene Ausdehnung der Kategorien pT1 – 2 aufwiesen (pT1 – 2:  $n = 16$  von 27; 59,3 %). Auch die Verteilung der Differenzierungsgrade zeigte zwischen p16-positiven und p16-negativen Karzinomen eine signifikante Abweichung (hoch/moderat vs. schlecht:  $P = 0,01$ ). Dabei ging ein negativer p16-Status häufiger mit einem hohen oder mäßigen Differenzierungsgrad einher ( $n = 46$  von 52; 88,5 %), während bei dem überwiegenden Anteil der schlecht differenzierten OPSCCs eine p16-Überexpression nachgewiesen wurde ( $n = 16$  von 22; 72,7 %).

### 3.3.2.2 Tabak- und Alkoholkonsum

Der Konsum von Tabakrauch beziehungsweise Alkohol zeigte jeweils entsprechend dem p16-Status eine signifikant abweichende Häufigkeitsverteilung (Tabak  $P < 0,01$ ; Alkohol  $P < 0,01$ ). Nichtraucher wiesen häufiger p16-positive OPSCCs ( $n = 21$  von  $26$ ;  $80,8\%$ ) auf, wohingegen sich die OPSCCs von (Ex-) Rauchern häufiger als p16-negativ demonstrierten ( $n = 43$  von  $62$ ;  $69,4\%$ ). Ebenso hatten Patienten mit einem verneinten, begrenzten oder gelegentlichen Alkoholkonsum in den meisten Fällen p16-positive OPSCCs ( $n = 34$  von  $53$ ;  $64,2\%$ ), während sich innerhalb der Patienten mit starkem Alkoholkonsum eine erhöhte Rate p16-negativer Tumore fand ( $n = 28$  von  $33$ ;  $84,8\%$ ). Der HPV-Status der OPSCCs zeigte keine signifikant abweichende Verteilung in Bezug auf den Tabak- ( $P = 0,49$ ) oder Alkoholkonsum ( $P = 0,11$ ).

Tabelle 21: Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten bei OPSCCs stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status

Charakteristikum	Gesamt		p16-positiv		p16-negativ		P <sup>a</sup>	HPV-positiv		HPV-negativ		P <sup>a</sup>	p16-positiv HPV-positiv		p16-negativ HPV-negativ		P <sup>a</sup>				
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]		
	Gesamt	102	100,0	50	100,0	52		100,0		41	100,0		61	100,0		27		100,0	23	100,0	14
Geschlecht																					
Männlich	82	80,4	39	78,0	43	82,7	0,55	32	78	50	82,0	0,63	21	77,8	18	78,3	11	78,6	32	84,2	0,90
Weiblich	20	19,6	11	22,0	9	17,3		9	22	11	18,0		6	22,2	5	21,7	3	21,4	6	15,8	
Alter [Jahre]																					
Mittelwert ± SD	57,5 ± 10,1		58,0 ± 11,1		57,1 ± 9,1			57,3 ± 10,5		57,7 ± 9,8			59,0 ± 11,3		56,8 ± 11,0		54,1 ± 8,3		58,3 ± 9,2		
Median	55,0		56,5		54,9			57,0		54,8			59,2		52,5		54,2		55,2		
(Min. – Max.)	(29,2 – 91,4)		(29,2 – 91,4)		(40,3 – 76,4)			(29,2 – 91,4)		(37,8 – 79,4)			(29,2 – 91,4)		(37,8 – 79,4)		(41,3 – 65,6)		(40,3 – 76,4)		
pT-Kategorie																					
pT1	11	10,8	8	16,0	3	5,8	<b>&lt;0,01</b>	5	12,2	6	9,8	0,12 <sup>b</sup>	4	14,8	4	17,4	1	7,1	2	5,3	<b>0,01<sup>b</sup></b>
pT2	27	26,5	18	36,0	9	17,3	<sup>b</sup>	14	34,1	13	21,3		12	44,4	6	26,1	2	14,3	7	18,4	
pT3	41	40,2	18	36,0	23	44,2		14	34,1	27	44,3		10	37	8	34,8	4	28,6	19	50,0	
pT4a	23	22,5	6	12,0	17	32,7		8	19,5	15	24,6		1	3,7	5	21,7	7	50	10	26,3	
c/pN-Kategorie																					
c/pN0	16	15,7	5	10,0	11	21,2	0,43	5	12,2	11	18,0	0,48	2	7,4	3	13	3	21,4	8	21,1	0,78
pN1	21	20,6	12	24,0	9	17,3		9	22	12	19,7		6	22,2	6	26,1	3	21,4	6	15,8	
pN2a	3	2,9	2	4,0	1	1,9		2	4,9	1	1,6		1	3,7	1	4,3	1	7,1	0	0	
pN2b	49	48	26	52,0	23	44,2		22	53,7	27	44,3		16	59,3	10	43,5	6	42,9	17	44,7	
pN2c	13	12,7	5	10,0	8	15,4		3	7,3	10	16,4		2	7,4	3	13,0	1	7,1	7	18,4	
ECS																					
Positiv	36	35,3	17	34,0	19	36,5	0,79	17	41,5	19	31,1	0,29	11	40,7	6	26,1	6	42,9	13	34,2	0,67
Negativ oder c/pN0	66	64,7	33	66,0	33	63,5		24	58,5	42	68,9		16	59,3	17	73,9	8	57,1	25	65,8	
Stadieneinteilung																					
III	28	27,5	14	28,0	14	26,9	0,90	10	24,4	18	29,5	0,57	7	25,9	7	30,4	3	21,4	11	28,9	0,93
IVa	74	72,5	36	72,0	38	73,1		31	75,6	43	70,5		20	74,1	16	69,6	11	78,6	27	71,1	
Differenzierungsgrad																					
Hoch (Grad 1)	1	1	0	0,0	1	1,9	<b>0,01<sup>c</sup></b>	0	0	1	1,6	0,29 <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	1	2,6	<b>0,06<sup>c</sup></b>
Moderat (Grad 2)	79	77,5	34	68,0	45	86,5		30	73,2	49	80,3		17	63	17	73,9	13	92,9	32	84,2	
Schlecht (Grad 3)	22	21,6	16	32,0	6	11,5		11	26,8	11	18		10	37	6	26,1	1	7,1	5	13,2	

Charakteristikum	Gesamt		p16-positiv		P <sup>a</sup>	HPV-positiv		P <sup>a</sup>	p16-positiv HPV-positiv		p16-positiv HPV-negativ		P <sup>a</sup>								
	[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]						
Therapie																					
TLM	4	3,9	2	4,0	2	3,8	0,96	2	4,9	2	3,3	0,70	1	3,7	1	4,3	1	7,1	1	2,6	0,91
TLM + ND	23	22,5	12	24,0	11	21,2		8	19,5	15	24,6		5	18,5	7	30,4	3	21,4	8	21,1	
TLM + ND + aRT	29	28,4	13	26,0	16	30,8		14	34,1	15	24,6		8	29,6	5	21,7	6	42,9	10	26,3	
TLM + ND + aRCT	46	45,1	23	46,0	23	44,2		17	41,5	29	47,5		13	48,1	10	43,5	4	28,6	19	50,0	
Nachsorge [Monate]																					
Mittelwert ± SD	52,3 ± 35		60,8 ± 35,8		44,1 ± 32,5		48,2 ± 31,5		55,0 ± 37,2		50,7 ± 30,5		72,8 ± 38,4		43,5 ± 33,9		44,3 ± 32,5				
Median	45,2		55,5		38,8		44,2		46,3		45,5		80,1		34,2		40,7				
(Min. – Max.)	(2,9 – 135,0)		(2,9 – 135,0)		(3,6 – 124,4)		(2,9 – 118,7)		(3,6 – 135,0)		(2,9 – 118,7)		(9,8 – 135,0)		(10,9 – 110,6)		(3,6 – 124,4)				
Tabakkonsum																					
Keine Information	14	13,7	10	20,0	4	7,7		2	4,9	12	19,7		1	3,7	9	39,1	1	7,1	3	7,9	
Nie	26	25,5	21	42,0	5	9,6	<0,01 <sup>d</sup>	13	31,7	13	21,3	0,49 <sup>d</sup>	12	44,4	9	39,1	1	7,1	4	10,5	<0,01 <sup>d</sup>
Ehemalig/aktuell	62	60,8	19	38,0	43	82,7		26	63,4	36	59,0		14	51,9	5	21,7	12	85,7	31	81,6	
Alkoholkonsum																					
Keine Information	16	15,7	11	22,0	5	9,6		3	7,3	13	21,3		2	7,4	9	39,1	1	7,1	4	10,5	
Nie/gelegentlich	53	52	34	68,0	19	36,5	<0,01 <sup>d</sup>	27	65,9	26	42,6	0,11 <sup>d</sup>	22	81,5	12	52,2	5	35,7	14	36,8	<0,01 <sup>d</sup>
Stark	33	32,4	5	10,0	28	53,8		11	26,8	22	36,1		3	11,1	2	8,7	8	57,1	20	52,6	

Klinisch-pathologische Charakteristika und Informationen über Therapie und Nachsorge bei OPSCCs sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test; <sup>b</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Test für die Verteilung lokal umschriebener (pT1 – 2) versus lokal fortgeschrittener (pT3 – 4a) Karzinome; <sup>c</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Test für die Verteilung hoher/moderater versus schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>d</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Test unter Ausschluss von Patienten ohne verfügbare Information.

Abkürzungen: c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HPV = Humaner Papillomavirus; ND = Neck-Dissection; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; aRCT = adjuvante Radiochemotherapie; aRT = adjuvante Radiotherapie; TLM = Transorale Lasermikrochirurgie.

### 3.3.3 Onkologische Ergebnisse

#### 3.3.3.1 Therapieversagen

Lokale und/oder regionale Rezidive traten bei 18,6 % (n = 19) aller Patienten auf. Einzelheiten bezüglich der Manifestation von lokalen und/oder regionären Rezidiven, Fernmetastasen sowie Zweittumoren sind stratifiziert entsprechend dem p16- und HPV-Status und der Kombination beider Marker in Tabelle 22 dargestellt. Die Analyse der Häufigkeitsverteilung zeigte keine signifikante Abweichung bezogen auf die Manifestation eines lokalen und/oder regionalen Rezidivs zwischen Patienten mit p16-positiven und p16-negativen (P = 0,24) respektive HPV-positiven und HPV-negativen (P = 0,48) OPSCCs. Unter Berücksichtigung der Kombination beider Marker zeigte sich ebenfalls keine signifikant abweichende Verteilung (P = 0,08).

Tabelle 22: Rezidive, Fernmetastasen und Zweittumoren bei OPSCCs stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status

Charakteristikum	Gesamt		p16-positiv		p16-negativ	P <sup>a</sup>	HPV-positiv		HPV-negativ	P <sup>a</sup>	p16-positiv		p16-negativ		P <sup>a</sup>						
	[n]	[%]	[n]	[%]			[n]	[%]			[n]	[%]	HPV-positiv			HPV-negativ					
					[n]	[%]			[n]	[%]			[n]	[%]	[n]	[%]					
Gesamt	102	100,0	50	100,0	52	100,0	41	100,0	61	100,0	27	100,0	23	100,0	14	100,0	38	100,0			
Rezidiv																					
Nein	83	81,4	43	86,0	40	76,9	0,24	32	78	51	83,6	0,48	24	88,9	19	82,6	8	57,1	32	84,2	0,08
Ja	19	18,6	7	14,0	12	23,1		9	22	10	16,4		3	11,1	4	17,4	6	42,9	6	15,8	
Lokal	10	9,8	3	6,0	7	13,5		4	9,8	6	9,8		1	3,7	2	8,7	3	21,4	4	10,5	
Lokoregionär	2	2,0	1	2,0	1	1,9		0	0,0	2	3,3		0	0,0	1	4,3	0	0,0	1	2,6	
Regionär	7	6,9	3	6,0	4	7,7		5	12,2	2	3,3		2	7,4	1	4,3	3	21,4	1	2,6	
Zeit bis zum Rezidiv; Mittelwert ± SD [Monate]	16,7 ± 13,1		20,5 ± 16,6		14,4 ± 10,7			14,1 ± 11,2		19,0 ± 14,7			16,4 ± 15,9		23,5 ± 18,8		12,9 ± 9,7		15,9 ± 12,2		
Fernmetastasen im Verlauf																					
Nein	89	87,3	45	90,0	44	84,6	0,41	35	85,4	54	88,5	0,64	25	92,6	20	87,0	10	84,6	34	84,6	0,26
Ja	13	12,7	5	10,0	8	15,4		6	14,6	7	11,5		2	7,4	3	13,0	4	15,4	4	15,4	
Zeit bis zur Metastase; Mittelwert ± SD [Monate]	16,4 ± 10,1		18,4 ± 8,1		15,1 ± 11,4			18,9 ± 12,3		14,2 ± 7,9			19,4 ± 2,0		17,8 ± 11,4		18,7 ± 15,9		11,5 ± 4,1		
Zweitmalignom																					
Nein	91	89,2	47	94,0	44	84,6	0,13	37	90,2	54	88,5	0,78	26	96,3	21	91,3	11	78,6	33	86,8	0,34
Ja	11	10,8	3	6,0	8	15,4		4	9,8	7	11,5		1	3,7	2	8,7	3	21,4	5	13,2	
Kopf-Hals-Region	5	4,9	2	4,0	3	5,8		0	0,0	5	8,2		0	0	2	8,7	0	0	3	7,9	
Außerhalb der Kopf-Hals-Region	6	5,9	1	2,0	5	9,6		4	9,8	2	3,3		1	3,7	0	0,0	3	21,4	2	5,3	

Das Auftreten lokaler und/oder regionaler Rezidive, Fernmetastasen und Zweittumoren bei OPSCCs ist für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test zwischen den Gruppen „Nein“ und „Ja“.

Abkürzungen: HPV = Humaner Papillomavirus; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.



### 3.3.3.2 Ereigniszeitanalysen

Bei allen Patienten der p16-HPV-Studie wurden die OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium (III – IVa) diagnostiziert. Die Fünf-Jahres-Schätzungen des Gesamtkollektivs zeigten die folgenden Ergebnisse: OS 73,3 %, DSS 78,3 %, RFS 69,8 % und LCR 85,6 %.

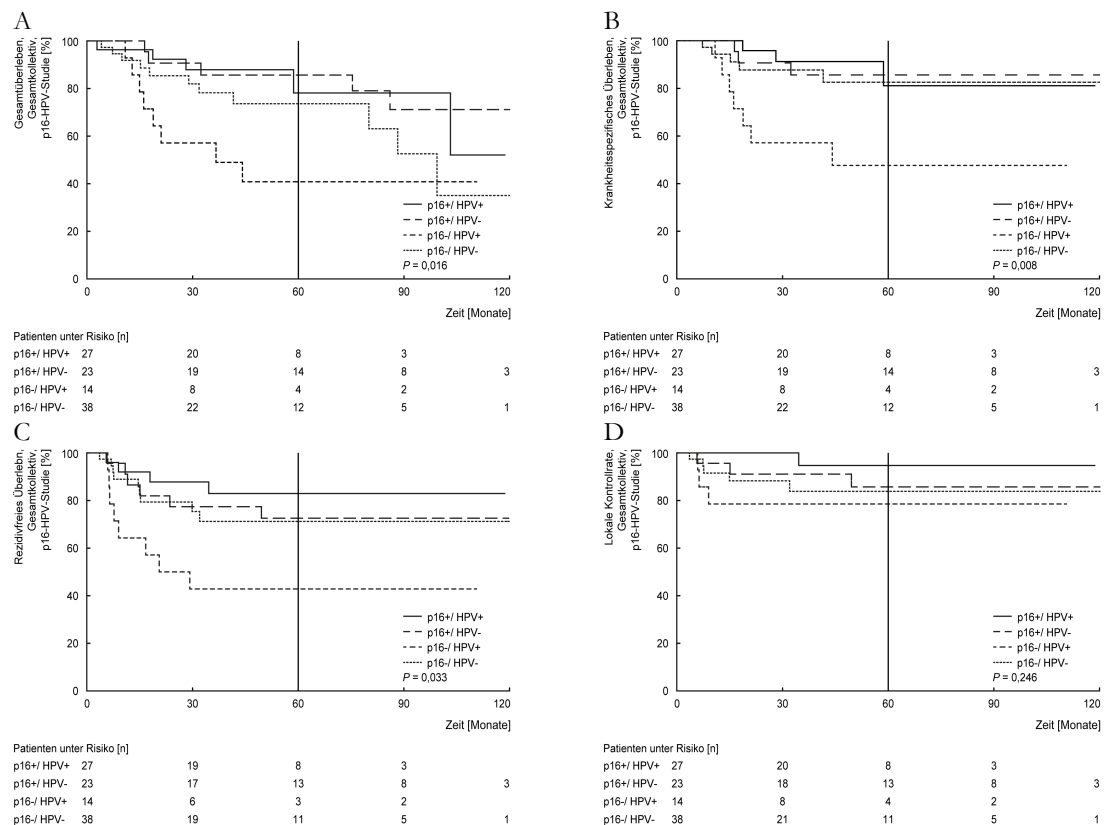
Wie bereits im Rahmen der TLM-Studie beschrieben, zeigten Patienten mit p16-positiven OPSCCs eine prognostische Überlegenheit gegenüber Patienten mit p16-negativen Tumoren (Abschnitt 0). Für den HPV-Status zeigten sich in der p16-HPV-Studie keine signifikanten prognostischen Unterschiede zwischen HPV-DNA-positiven gegenüber HPV-DNA-negativen Tumoren (OS: 64,9 % vs. 78,7 %  $P = 0,46$ ; DSS: 69,3 % vs. 84,0 %  $P = 0,19$ ; RFS: 68,2 % vs. 71,5 %  $P = 0,60$ ; LCR: 88,8 % vs. 84,0 %  $P = 0,65$ ) (Abbildung A. 2 im Anhang). Folglich führte bei der Betrachtung der Marker (p16 und HPV) für sich alleinstehend, der p16-Status, nicht aber der HPV-Status zu einer prognostischen Gruppierung von Patienten mit OPSCCs.

In einer weiteren Analysen erfolgte die Stratifizierung durch Kombination von p16-Status und HPV-Status. Es resultierten Patientengruppen mit p16-positiven/HPV-positiven ( $n = 27$ ; 26,5 %), p16-positiven/HPV-negativen ( $n = 23$ ; 22,5 %), p16-negativen/HPV-positiven ( $n = 14$ ; 13,7 %) und p16-negativen/HPV-negativen ( $n = 38$ ; 37,3 %) OPSCCs.

Innerhalb der Gruppe mit p16-positiven OPSCCs demonstrierten die Gruppen mit unterschiedlichem HPV-Status (p16-positiv/HPV-positive vs. p16-positiv/HPV-negativ) keine signifikant abweichenden prognostischen Schätzungen (OS: 78,1 % vs. 85,6 %  $P = 0,73$ ; DSS: 81,1 % vs. 85,6 %  $P = 0,97$ ; RFS: 82,9 % vs. 72,6 %  $P = 0,48$ ; LCR: 94,7 % vs. 85,7 %  $P = 0,35$ ). Innerhalb der Gruppe mit p16-negativen OPSCCs wiesen jene Patienten mit negativem HPV-Nachweis im Tumor gegenüber jenen mit einem positiven HPV-Status signifikant höhere Schätzungen sowohl für das DSS als auch das RFS auf (DSS: 82,6 % vs. 47,6 %  $P = 0,02$ ; RFS: 71,2 % vs. 42,9 %  $P = 0,04$ ). Obwohl der jeweilige Unterschied nicht signifikant war, zeigte die Gruppe mit p16-negativen/HPV-negativen OPSCCs in Bezug auf das OS und die LCR ebenfalls höhere Schätzungen gegenüber der Gruppe, welche durch OPSCCs mit p16-negativem/HPV-positivem Status charakterisiert wurde: 73,6 % vs. 40,8 %  $P = 0,15$ ; LCR: 83,9 % vs. 78,6 %  $P = 0,50$ ).

In Bezug auf alle vier Untergruppen waren das OS und DSS der Patienten mit diskordant p16-positivem/HPV-negativen OPSCCs (OS: 85,6 %; DSS: 85,6 %) jenem aller anderen Untergruppen prognostisch überlegen, wobei die Untergruppe mit p16-negativen/HPV-positiven Erkrankungen jeweils die geringsten Schätzungen aufwies (OS: 40,8 %; DSS: 47,6 %; A und B in Abbildung 7). Hinsichtlich des RFS und LCR demonstrierte die höchsten Schätzungen die Gruppe mit einheitlich p16-positiven/HPV-positiven OPSCCs (RFS: 82,9 %; LCR: 94,7 %), wohingegen die niedrigsten Werte jeweils für die Gruppe mit diskordant p16-negativen/HPV-positiven OPSCCs berechnet wurden (RFS: 42,9 %; LCR:

78,6 %; C und D in Abbildung 7). Zusammengefasst erzielte in den Ereigniszeitanalysen stets eine Untergruppe mit p16-positiven OPSCCs (p16-positiv/HPV-positiv, p16-positiv/HPV-negativ) die besten Ergebnisse. Geringere, jedoch vergleichbare Schätzungen zeigte die Gruppe mit p16-negativen/HPV-negativen Tumoren. Die geringsten Überlebensraten wies stets die Gruppe mit diskordant p16-negativen/HPV-positiven OPSCCs auf (Tabelle 23, Abbildung 7).



**Abbildung 7: Ereigniszeitanalysen für OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach p16-Status und HPV-Status kombiniert.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische und C, das rezidivfreie Überleben sowie D, der lokalen Kontrollrate sind für Patienten der p16-HPV-Studie stratifiziert nach der Kombination des p16- und HPV-Status der Primärtumoren und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

**Tabelle 23: Studien zu onkologischen Langzeitergebnissen bei OPSCCs mit gegebenem p16- und HPV-Status**

Studie	Gruppe	Stadium [%] <sup>b</sup>	Th. <sup>c</sup>	Gesamt[n]	Fünf-Jahres-Schätzungen [%]			
					OS	DSS	RFS	LCR
p16-HPV-Studie der vorliegenden Arbeit (Weiss et al. 2021)	Gesamtkollektiv	III – IVa 100	1	102	73,3	78,3	69,8	85,6
	p16+			50	83,2	84,9	77,1	89,5
	p16+			52	63,1	71,3	62,5	82,4
	HPV-positiv			41	64,9	69,3	68,2	88,8
	HPV-negativ			61	78,7	84	71,5	84
	p16-positiv/HPV-positiv			27	78,1	81,1	82,9	94,7
	p16-positiv/HPV-negativ			23	85,6	85,6	72,6	85,7
	p16-negativ/HPV-positiv			14	40,8	47,6	42,9	78,6
	p16-negativ/HPV-negativ			38	73,6	82,6	71,2	83,9
	Tabak-/Alkoholkonsum <sup>a</sup>			85	69,8	75,7	61,1	88,7
	Nichtraucher <sup>a</sup>			26	91,7	91,7	74,4	90,5
	(Ex-)Raucher <sup>a</sup> ,			59	59,3	67,5	66,8	88,7
	Nichtraucher <sup>a</sup> , p16-positiv			21	90	90	84,2	94,1
	Nichtraucher <sup>a</sup> , p16-negativ			5	100	100	40	75
	(Ex-)Raucher <sup>a</sup> , p16-positiv			18	63	66,7	68,2	93,8
	(Ex-)Raucher <sup>a</sup> , p16-negativ			41	57,4	67,8	66,0	86,5
	Nichtraucher <sup>a</sup> , HPV-positiv			13	80	80	72,7	90,0
	Nichtraucher <sup>a</sup> , HPV-negativ			13	100	100	75	90,9
	(Ex-)Raucher <sup>a</sup> , HPV-positiv			25	55,6	62,8	64,5	91,3
	(Ex-)Raucher <sup>a</sup> , HPV-negativ			34	62,1	71,2	68,5	100
Nie-/Gelegenheitstrinker <sup>a</sup>			53	71,5	79	66,5	88	
starke Trinker <sup>a</sup>			32	67,2	70,7	73,8	89,9	
(Yamashita et al. 2019)	Gesamtkollektiv	I – II 16; III – IVa 72; IVb 12;	2	100	I 100; II 78,6; III 75,7; IV 69,3; I – IV 73			
	p16-positiv			34	II 100; III 90; IV 94,4; II – IV 93,9			
	p16-negativ			66	62,2			
	< 40 py, p16-positiv			26	96			
	≥ 40 py, p16-positiv			8	87,5			
	HPV-positiv			48	83,1			
	HPV-negativ			52	63,1			
	p16-positiv/HPV-positiv			34	93,9			
	p16-positiv/HPV-negativ			n = 0				
	p16-negativ/HPV-positiv			14	57,1			
	p16-negativ/HPV-negativ			52	63,9			
(Yamamoto et al. 2019)	Gesamtkollektiv	III – IV 100	3	107				
	RT		3.1	43	67			
	RT, p16-positiv/HPV-positiv			19	84			
	RT, p16-positiv/HPV-negativ			7	57			
	RT, p16-negativ/HPV-negativ			17	51			
	RCT		3.2	64	68			
	CRT, p16-positiv/HPV-positiv			26	88			
	RCT, p16-positiv/HPV-negativ			7	71			
RCT, p16-negativ/HPV-negativ			31	51				

Studie	Gruppe	Stadium [%] <sup>b</sup>	Th. <sup>c</sup>	Gesamt[n]	Fünf-Jahres-Schätzungen [%]			
					OS	DSS	RFS	LCR
(Hoffmann et al. 2018)	Gesamtkollektiv	N/A (T1 – 4 N0 – 3)	1	126	63			
	p16-positiv			58	80,7			
	p16-negativ			68	54,4			
	HPV-DNA-positiv			53	80,8			
	HPV-DNA-negativ			73	56,1			
	p16-positiv/HPV-DNA-positiv			48	83			
	p16-positiv/HPV-DNA-negativ			10	70			
	p16-negativ/HPV-DNA-positiv			6	66,7			
	p16-negativ/HPV-DNA-negativ			62	53,2			
	HPV-RNA-positiv = HPV-DNA-positiv/RNA-positiv			47	80,4			
	HPV-RNA-negativ			79	58,2			
	p16-positiv/HPV-RNA-positiv			41	82,5			
	p16-positiv/HPV-RNA-negativ			17	76,5			
	p16-negativ/HPV-RNA-positiv			6	66,7			
	p16-negativ/HPV-RNA-negativ			62	53,2			
	≤10 py			36	83,3			
	> 10 py			90	59,6			
	≤10py, HPV-DNA-positiv			25	96			
	≤10py, HPV-DNA-negativ			11	54,5			
	> 10 py, HPV-DNA-positiv			28	66,7			
> 10 py, HPV-DNA-negativ			62	56,5				
≤10 py, HPV-RNA-positiv			21	100				
≤10 py, HPV-RNA-negativ			15	60				
> 10 py, HPV-RNA-positiv			26	64				
> 10 py, HPV-RNA-negativ			64	57,8				
(Nauta et al. 2018)	Gesamtkollektiv	N/A (cT0 – 4b cN0 – 3)	4	1204				
	p16-positiv			388		I – II 67,7; III 84,6; IV 72,3		
	p16-negativ			816	43,0			
	p16-positiv/HPV-positiv			340	78,5			
	p16-positiv/HPV-negativ			48	46,7			
(Park K et al. 2013)	Gesamtkollektiv	III – IV	5	79	78			
	p16-positiv			63	78			
	p16-negativ			16	63			
	HPV-positiv			54				
	HPV-negativ			25				
	p16-positiv/HPV-positiv			50				
	p16-positiv/HPV-negativ			13				
	p16-negativ/HPV-positiv			4				
p16-negativ/HPV-negativ			12					

Studien zu Langzeitergebnissen mit kurativer Intention therapierter OPSCCs und gegebenem p16- und HPV-Status sind als Übersicht modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Im oberen Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Gesamtkollektivs der p16-HPV-Studie sowie der p16-stratifizierten Untergruppen aufgeführt.

Notizen: <sup>a</sup> Patienten mit dokumentierten Angaben zu Alkohol- und Tabakkonsum; <sup>b</sup> nach Union Internationale Contre le Cancer; <sup>c</sup> Therapiestrategie: 1 = Transorale Lasermikrochirurgie (TLM) ± Neck-Dissection (ND) ± adjuvante R(C)T, 2 = primäre RCT oder kurativ intendierte Resektion, 3 = primäre R(C)T, 3.1 = primäre Radiotherapie, 3.2 = primäre RCT, 4 = primäre Radiotherapie ± Chemotherapie oder Cetuximab oder Brachytherapie ± ND oder Resektion ± RT, 5 = Resektion + ND ± R(C)T oder primäre R(C)T.

Abkürzungen: DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; HPV = Humaner Papillomavirus; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*; Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; N/A = *not available*, nicht verfügbar; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; py = *pack year*, Packungsjahre (1 Packung pro Tag pro Jahr); R(C)T = Radio(chemo)-therapie; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben; Th. = Therapiestrategie.

### 3.3.4 Untergruppenanalysen zum Alkohol- und Tabakkonsum

Eine Tabak- und Alkoholanamnese war für 83,3 % (n = 85) der Patienten der p16-HPV-Studie dokumentiert. Diese Patienten wurden in die folgenden Subanalysen eingeschlossen.

Ein prädominierender Teil dieser Patienten hatte einen ehemaligen oder noch aktiven Tabakkonsum angegeben ((Ex-)Raucher: n = 59 von 85; 69,4 %), wohingegen 30,6 % (n = 26 von 85) der Patienten jeglichen Tabakkonsum negiert hatten (Nichtraucher). Während der Großteil der Nichtraucher p16-positive OPSCCs aufwies (n = 21 von 26; 80,8 %), lagen bei (Ex-) Rauchern meist p16-negative Karzinome vor (n = 41 von 59; 69,5 %;  $P < 0,01$ ). Konträr zum p16-Status zeigte die Verteilung des HPV-Status der OPSCCs zwischen Nichtrauchern und (Ex-) Rauchern keine signifikante Abweichung (n = 13 von 26 vs. n = 25 von 59; 50,0 % vs. 42,4 %  $P = 0,51$ ).

In Bezug auf den Alkoholkonsum wurden 37,6 % (n = 32) der Patienten zur Gruppe der starken Alkoholkonsumenten und 62,4 % (n = 53) zur Gruppe der nie/gelegentlich Alkohol konsumierenden Patienten zugordnet. Letztere wiesen mehrheitlich p16-positive OPSCCs auf (n = 34 von 53; 64,2 %), wohingegen der Großteil der starken Alkoholkonsumenten p16-negative Karzinome hatte (n = 27 von 32; 84,4 %;  $P < 0,01$ ). Die Verteilung des HPV-Status der OPSCCs zeigte im Gegensatz zum p16-Status, keine signifikante Abweichung zwischen nie/gelegentlich Alkohol konsumierenden Patienten und jenen mit starkem Alkoholkonsum (n = 27 von 53 vs. n = 11 von 32; 50,9 % vs. 34,4 %  $P = 0,14$ ).

In der kombinierten Betrachtung von Tabak- und Alkoholkonsum gehörten 71,8 % (n = 61 von 85) der Patienten zur Gruppe der (Ex-)Raucher und/oder starken Alkoholkonsumenten. Der Großteil dieser Patienten wies eine p16-negative Erkrankung auf (n = 41 von 61; 67,2 %). Demgegenüber dominierte bei OPSCCs von nie/gelegentlich Alkohol konsumierenden Nichtrauchern ein positiver p16-Status (n = 19 von 24; 79,2 %;  $P < 0,01$ ). Hinsichtlich des HPV-Status der OPSCCs zeigte sich keine signifikant abweichende Verteilung zwischen nie/gelegentlich Alkohol konsumierenden Nichtrauchern und (Ex-) Rauchern und/oder starken Alkoholkonsumenten (HPV-positiv: 12 von 24 vs. n = 26 von 61; 50,0 % vs. 42,6 %  $P = 0,54$ ).

Zusammengefasst ergab sich eine signifikant unterschiedliche Verteilung des Tabak- und/oder Alkoholkonsums unter Berücksichtigung des p16-Status nicht aber in der selektiven Betrachtung des HPV-Status der OPSCCs.

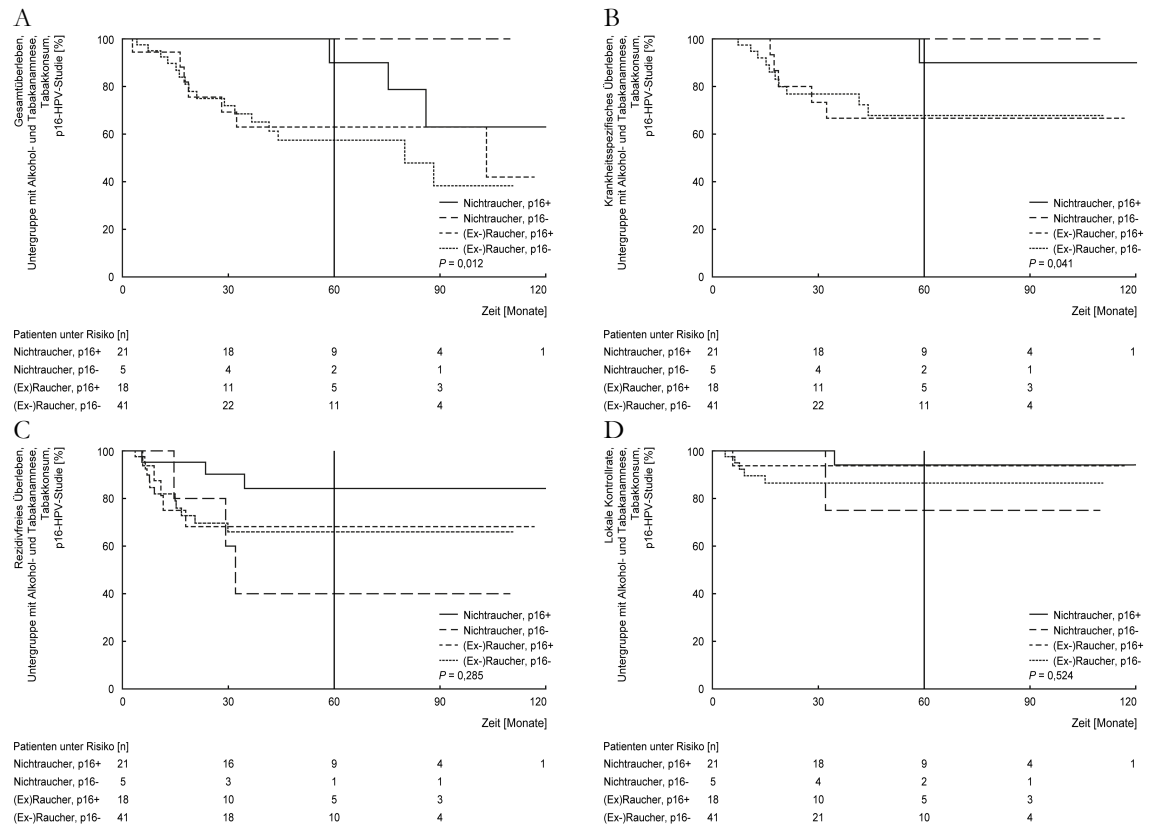
#### 3.3.4.1 Ereigniszeitanalysen unter Berücksichtigung des Alkohol- und Tabakkonsums

Für die gesamte Gruppe von 85 Patienten mit vorliegender Tabak- und Alkoholanamnese betragen die Schätzungen für das OS 69,8 %, das DSS 75,7 %, das RFS 69,1 % und die LCR 88,7 %. Die Nichtraucher demonstrierten gegenüber (Ex-) Rauchern ein signifikant überlegenes OS und DSS (OS: 91,7 % vs. 59,3 %,  $P < 0,01$ ; DSS: 91,7 % vs. 67,5 %,  $P < 0,01$ ). Für das RFS und die LCR wich die prognostische Überlegenheit der Nichtraucher

nicht statistisch signifikant von den Schätzungen der (Ex-)Raucher ab (RFS: 74,4 % vs. 66,8 %  $P = 0,28$ ; LCR 90,5 % vs. 88,7 %  $P = 0,51$ ).

In Bezug auf den p16-Status demonstrierten Nichtraucher mit p16-positiven Karzinomen gegenüber (Ex-)Rauchern mit p16-negativen OPSCCs ein besseres OS, DSS als auch RFS (OS: 90,0 % vs. 57,4 %; DSS: 90,0 % vs. 67,8 %; RFS: 84,2 % vs. 66,0 %). Die Schätzungen der genannten Endpunkte (OS, DSS, RFS) der (Ex-)Raucher mit p16-positiven OPSCCs näherten sich hingegen jenen ungünstigeren der (Ex-)Raucher mit p16-negativen OPSCCs (OS: 63,0 %; DSS: 66,7 %; RFS: 68,2 %; A, B, C in Abbildung 8). In Bezug auf die LCR zeigten sich geringere Abweichungen zwischen den genannten Gruppen (94,1 % vs. 86,5 % vs. 93,8 %; D in Abbildung 8). Unter Berücksichtigung des HPV-Status zeigte sich innerhalb der Gruppen von Nichtrauchern und (Ex-)Rauchern für keinen der Endpunkte eine signifikante Differenz (Abbildung A. 3). Zusammengefasst wiesen Nichtraucher mit p16-positiven OPSCCs die günstigste Prognose auf, wohingegen unabhängig vom p16-Status (Ex-)Raucher eine miteinander vergleichbar reduzierte Prognose aufwiesen.

Die Stratifizierung nach der Alkoholanamnese zeigte zwischen nie/gelegentlichen und starken Alkoholkonsumenten keinen signifikanten prognostischen Unterschied (OS: 71,5 % vs. 67,2 %  $P = 0,741$ ; DSS: 79,0 % vs. 70,7 %  $P = 0,242$ ; RFS: 66,5 % vs. 73,8 %  $P = 0,768$ ; LCR: 88,0 % vs. 89,9 %  $P = 0,953$ ). Infolgedessen wurde auf eine weitere Untergruppenanalyse, stratifiziert nach p16- oder HPV-Status unter Berücksichtigung dieser Variable verzichtet.



**Abbildung 8: Ereigniszeitanalysen für OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach p16-Status und Tabakkonsum.** Die Kaplan-Meier-Kurven sind für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische Überleben, C, das rezidivfreie Überleben und D, die lokale Kontrollrate für Patienten mit bekannter Tabak- und Alkoholanamnese der p16-HPV-Studie stratifiziert nach dem Tabakkonsum der Patienten und des p16-Status der Primärtumoren und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 3.3.5 Analyse weiterer, potenziell prognostisch relevanter Einflussfaktoren und multivariate Cox-Regression

Um weitere, potenziell prognostisch relevante Einflussfaktoren zu identifizieren, wurden Ereigniszeitanalysen auch unter Berücksichtigung von Patienten- und Erkrankungscharakteristika durchgeführt. Die Ergebnisse der univariaten Analysen sind Tabelle 24 zu entnehmen.

**Tabelle 24: Prognostische Assoziationen von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika bei OPSCCs**

Charakteristikum	Gesamtkollektiv, n = 102				Gesamte Untergruppe mit Tabak- und Alkoholanamnese, n = 85			
	OS	DSS	RFS	LCR	OS	DSS	RFS	LCR
p16-Status	<b>0,019</b>	0,075	0,169	0,087	0,156	0,283	0,158	0,175
HPV-Status	0,462	0,194	0,603	0,646	0,942	0,433	0,866	0,615
p16- und HPV- Status kombiniert	<b>0,016</b>	<b>0,008</b>	<b>0,033</b>	0,246	0,136	0,057	0,137	0,497
Geschlecht	0,963	0,697	0,222	0,578	0,760	0,784	0,303	0,793
Alter, < 60 Jahre vs. > 60 Jahre	0,677	0,848	0,621	0,184	0,293	0,898	0,624	0,061
SublokalisationTonsille/Zungengrund vs. Andere	0,506	0,929	0,806	0,138	0,590	0,999	0,779	0,222
pT-Kategorie , T1 vs. T2 vs. T3 vs. T4	0,303	0,263	0,211	0,606	0,417	0,417	0,231	0,321
pT-Kategorie (gruppiert), T1 – 2 vs. T3 – 4a	0,694	0,280	0,262	0,339	0,643	0,328	0,352	0,122
N-Kategorie, c/pN0 vs. pN1 vs. pN2a/b/c	0,501	0,688	0,700	0,493	0,390	0,758	0,736	0,734
Lymphknotenmetastasierung, N0 vs. N+	0,555	0,486	0,804	0,464	0,609	0,604	0,944	0,555
ECS, N0 vs. N+ ECS- vs. N+ ECS+	0,275	0,151	0,431	0,821	0,203	0,073	0,291	0,649
ECS, N0/N+ ECS- vs. N+ ECS+	<b>0,046</b>	<b>0,031</b>	0,191	0,984	<b>0,019</b>	<b>0,015</b>	0,092	0,421
Stadien, III vs. IVa	0,902	0,855	0,080	0,133	0,932	0,917	0,191	0,557
Differenzierungsgrad, gut/moderat vs. schlecht	0,170	0,466	0,925	0,559	0,468	0,819	0,870	0,541
Therapie, TLM vs. TLM + ND vs. TLM + ND + aRT vs. TLM + ND + aR(C)T	0,261	0,185	0,342	0,069	0,688	0,619	0,196	0,144
Therapie, TLM vs. TLM + ND vs. TLM + ND + aR(C)T	0,281	0,488	0,402	0,147	0,565	0,780	0,303	0,115
Therapie, TLM ± ND vs. TLM + ND + aR(C)T	0,078	0,316	0,147	0,111	0,212	0,633	0,101	0,108
Tabak, Nicht- vs. (Ex-)Raucher	.	.	.	.	<b>0,003</b>	<b>0,007</b>	0,280	0,513
Alkohol, nie/gelegentlich vs. stark	.	.	.	.	0,741	0,242	0,768	0,953

Die Ergebnisse potentieller prognostischer Assoziationen von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika bei OPSCCs sind für das Gesamtkollektiv sowie für die gesamte Untergruppe mit dokumentierter Tabak- und Alkoholanamnese modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Log-Rang-Tests zwischen Patienten der einzelnen Kategorien der jeweiligen Charakteristika sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radiochemotherapie; aRT = adjuvante Radiotherapie; c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HPV = Humaner Papillomavirus; ND = Neck-Dissection; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; TLM = Transorale Laser-mikrochirurgie.



Ferner wurde eine multivariate Regressionsanalyse nach Cox (vorwärtsschrittweise) mit diesen Variablen als Kovariaten durchgeführt. Unter Berücksichtigung des Gesamtkollektivs der p16-HPV-Studie und des p16- und HPV-Status als separate Variablen, wurden für die OS der p16-Status (HR = 0,41, 95 %-CI 0,19 – 0,887 P = 0,023) und die ECS (HR = 2,1, 95 %-CI 1,009 – 4,372 P = 0,047) in das finale Modell integriert. In Bezug auf das DSS wurde in die finale Gleichung ausschließlich die ECS aufgenommen (HR = 2,768, 95 %-CI 1,088 – 7,038 P = 0,033). Für das RFS und die LCR zeigte keine Variable ein signifikantes Ergebnis.

Wurden für die Cox-Regressionsanalysen anstelle der einzelnen Marker der kombinierte p16-/HPV-Status als Kovariate ausgewählt, zeigte sich für den kombinierten p16-/HPV-Status und die ECS ein signifikanter Einfluss auf das OS (ECS: HR = 2,254, 95 %-CI 1,067 – 4,765 P = 0,033; kombinierter p16/HPV-Status: p16-negativ/HPV-negativ (Referenz) P = 0,036, p16-positiv/HPV-positiv: HR = 0,525, 95 %-CI 0,182 – 1,516 P = 0,234, p16-positiv/HPV-negativ: HR = 0,534, 95 %-CI 0,183 – 1,559 P = 0,251, p16-negativ/HPV-positiv: HR = 2,151, 95 %-CI 0,854 – 5,417 P = 0,104) und das DSS (ECS: HR = 2,951, 95 %-CI 1,147 – 7,593 P = 0,025; kombinierter p16/HPV-Status: p16-negativ/HPV-negativ (Referenz) P = 0,017; p16-positiv/HPV-negativ: HR = 0,657, 95 %-CI 0,157 – 2,757 P = 0,566; p16-negativ/HPV-positiv: HR = 0,837, 95 %-CI 0,198 – 3,529 P = 0,808; p16-negativ/HPV-positiv: HR = 3,923, 95 %-CI 1,239 – 12,416 P = 0,020). Für das RFS war neben dem kombinierten p16-HPV-Status die pT-Kategorie gruppiert nach pT1 – 2 und pT3 – 4a Teil der endgültigen Gleichung (pT-Kategorie: HR = 0,416, 95 %-CI 0,184 – 0,943 P = 0,036; kombinierter p16/HPV-Status: p16-negativ/HPV-negativ (Referenz) P = 0,011 p16-positiv/HPV-positiv: HR = 0,365, 95 %-CI 0,105 – 1,26 P = 0,111; p16-positiv/HPV-negativ: HR = 0,695, 95 %-CI 0,239 – 2,021 P = 0,504; p16-negativ/HPV-positiv: HR = 2,676, 95 %-CI 1,03 – 6,949 P = 0,043). Erneut wurde für die LCR keine prognostisch signifikante Variable identifiziert.

Unter Berücksichtigung der gesamten Untergruppe mit dokumentierter Alkohol- und Tabakanamnese, zeigten die univariaten Analysen keine signifikante Assoziation zwischen einem der prognostischen Endpunkte und dem p16-, HPV-Status oder der Kombination beider (Tabelle 24). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurden in der separaten und der kombinierten Betrachtung des p16 und HPV-Status jeweils sowohl das ECS als auch der Tabakkonsum als signifikante Kovariaten für das OS (ECS: HR = 2,323, 95 %-CI 1,066 – 5,06 P = 0,034; Tabakkonsum: HR = 4,403, 95 %-CI 1,317 – 14,717 P = 0,016) und das DSS (ECS: HR = 3,197, 95 %-CI 1,154 – 8,855 P = 0,025; Tabakkonsum: HR = 3,197, 95 %-CI 1,154 – 8,855 P = 0,025; Tabakkonsum: HR = 8,348, 95 %-CI 1,1 – 63,329 P = 0,040) ermittelt. Wie auch in Bezug auf das Gesamtkollektiv der p16-HPV-Studie, wurde hinsichtlich des RFS und der LCR keine signifikante prognostische Variable in der Cox-Regressionsanalyse identifiziert.

### 3.3.6 Komplementäre Analysen für OPSCCs von Sublokationen mit potentiell ätiologischer Rolle von HPV (Tonsillen, Zungengrund)

Die prognostische Stadieneinteilung entsprechend der aktuellen (achten) Edition der AJCC/UICC erfordert eine Differenzierung von OPSCCs entsprechend des p16-Status, nicht jedoch eine Abgrenzung einzelner oropharyngealer Tumorlokalisationen (Lydiatt et al. 2017; Wurdemann et al. 2017). Indizien einer ätiologischen Beteiligung der HPV-Infektion in die Karzinogenese von OPSCCs existieren für die Tonsillenregion und den Zungengrund (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Paz et al. 1997), Daher wurden 74 Patienten mit OPSCCs, deren Tumoren vom Chirurgen der Tonsillenregion (ICD-10-GM Version 2020 C09.-, n = 48) oder dem Zungengrund (ICD-10-GM Version 2020 C01, n = 26) zugeordnet worden waren, in eine ergänzende Subanalyse eingeschlossen. Detaillierte Ergebnisse sind Tabelle A. 1 (HPV-Typisierung und p16-Immunhistochemie), Tabelle A. 2 (Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten) und Tabelle A. 3 (Rezidive, Fernmetastasen, Zweitmalignome) im Anhang zu entnehmen.

Die Analyse der Häufigkeitsverteilung ergab ein signifikant häufigeres Auftreten von p16-positiven OPSCCs in der Tonsillenregion oder im Zungengrund als in anderen oropharyngealen Sublokalisationen ( $P < 0,01$ ). Der HPV-Status zeigte diesbezüglich keine signifikante Abweichung ( $P = 0,308$ ). In der Ereigniszeitanalyse demonstrierten Patienten mit Tonsillen-/Zungengrund-OPSCCs gegenüber Patienten mit OPSCCs anderer oropharyngealer Sublokationen keine signifikanten Abweichungen (OS:  $P = 0,506$ ; DSS:  $P = 0,929$ ; RFS:  $P = 0,806$ ; LCR:  $P = 0,138$ ).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des gesamten Kollektivs der p16-HPV-Studie, war der p16-Status (OS:  $P = 0,014$ ; DSS:  $P = 0,021$ ; RFS:  $P = 0,025$ ; LCR:  $P = 0,028$ ), nicht jedoch der HPV-Status (OS:  $P = 0,974$ ; DSS:  $P = 0,837$ ; RFS:  $P = 0,844$ ; LCR:  $P = 0,690$ ) mit signifikanten Unterschieden in der Ereigniszeitanalyse assoziiert. Ebenso zeigte sich bei der Kombination von p16- und HPV-Status vergleichbare Ergebnisse für die p16-positiven Gruppen (p16-positiv/HPV-positiv, p16-positiv/HPV-negativ) und die p16-negative/HPV-negative Gruppe (OS: 81,5 % vs. 84,9 % vs. 72,3 %; DSS: 84,8 % vs. 84,9 % vs. 76,7 %; RFS: 85,7 % vs. 71,3 % vs. 67,0 %; LCR: 94,4 % vs. 85,0 % vs. 77,4 %). Deutlich geringere Schätzwerte ergaben sich für die Gruppe mit p16-negativen/HPV-positiven OPSCCs (OS: 42,9 %; DSS: 42,9 %; RFS: 28,6 %; LCR: 57,1 %).

Innerhalb der Gruppe mit OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds sowie mit dokumentierter Alkohol- und Tabakanamnese (n = 58), zeigten Nichtraucher mit p16-positiven OPSCCs ein höheres OS und DSS gegenüber (Ex-)Rauchern mit unabhängig vom p16-Status vergleichbar geringeren Werten (OS: 88,9 % vs. 64,9 % vs. 57,8 %; DSS: 88,9 % vs. 69,2 % vs. 61,0 %).

Tabelle 25: Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds stratifiziert nach p16- und/oder HPV-Status

Charakteristikum	Gesamt		p16-positiv		p16-negativ		P <sup>a</sup>	HPV-positiv		HPV-negativ		P <sup>a</sup>	p16-positiv				p16-negativ				P <sup>a</sup>		
															HPV-positiv		HPV-negativ		HPV-positiv			HPV-negativ	
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]
Gesamt	74	100	47	100,0	27	100		32	100,0	42	100		25	100	22	100	7	100	20	100			
Rezidiv																							
Nein	59	79,7	41	87,2	18	66,7	<b>0,034</b>	25	78,1	34	81,0	0,764	23	92,0	18	81,8	2	28,6	16	80,0	<b>0,003</b>		
Ja	15	20,3	6	12,8	9	33,3		7	21,9	8	19,0		2	8,0	4	18,2	5	71,4	4	20,0			
Lokal	9	12,2	3	6,4	6	22,2		4	12,5	5	11,9		1	4,0	2	9,1	3	42,9	3	15,0			
Lokoregionär	2	2,7	1	2,1	1	3,7		0	0,0	2	4,8		0	0,0	1	4,5	0	0,0	1	5,0			
Regionär	4	5,4	2	4,3	2	7,4		3	9,4	1	2,4		1	4,0	1	4,5	2	28,6	0	0,0			
Zeit bis zum Rezidiv; Mittelwert ± SD [Monate]	15,0 ± 13,5		22,4 ± 17,3		10,1 ± 7,8			13,9 ± 12,5		16,0 ± 15,1			20,1 ± 20,6		11,4 ± 18,8		23,5 ± 10,0		8,4 ± 4,7				
Fernmetastase																							
Nein	66	89,2	43	91,5	23	85,2	0,401	30	93,8	36	85,7	0,270	24	96,0	19	86,4	6	85,7	17	85,0	0,607		
Ja	8	10,8	4	8,5	4	14,8		2	6,3	6	14,3		1	4,0	3	13,6	1	14,3	3	15,0			
Zeit bis zur Metastase; Mittelwert ± SD [Monate]	15,0 ± 13,5		22,4 ± 17,3		10,1 ± 7,8			13,9 ± 12,5		16,0 ± 15,1			20,1 ± 20,6		11,4 ± 18,8		23,5 ± 10,0		8,4 ± 4,7				
Zweitmalignom																							
Nein	69	93,2	44	93,6	25	92,6	0,866	31	96,9	38	90,5	0,277	24	96,0	20	90,9	7	100,0	18	90,0	0,721		
Ja	5	6,8	3	6,4	2	7,4		1	3,1	4	9,5		1	4,0	2	9,1	0	0,0	2	10,0			
Kopf-Hals-Region	3	4,1	2	4,3	1	3,7		0	0,0	3	7,1		0	0,0	2	9,1	0	0,0	1	5,0			
Außerhalb der Kopf-Hals-Region	2	2,7	1	2,1	1	3,7		1	3,1	1	2,4		1	4,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0			

Das Auftreten lokaler und/oder regionaler Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds ist für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test zwischen den Gruppen „Nein“ und „Ja“.

Abkürzungen: HPV = Humaner Papillomavirus; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.

### **3.4 Ergebnisse der miRNA-Studie: MicroRNAs im Kontext von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Prognostik bei primären Oropharynxkarzinomen**

#### **3.4.1 Patienten- und Erkrankungscharakteristika und Therapiekonzepte**

45 Patienten mit OPSCCs erfüllten die in Abschnitt 2.3.4 erläuterten Einschlusskriterien und bildeten somit das gesamte miRNA-Studienkollektiv (miRNA-Kollektiv). Ferner diente oropharyngeales Gewebe von 18 Patienten ohne maligne Erkrankung als Kontrollgruppe.

Topografisch wurde die Hauptausdehnung der OPSCCs in absteigender Häufigkeit den folgenden Sublokalisationen des Oropharynx zugeordnet: 51,1 % (n = 23) der Tonsillenregion, 24,4 % (n = 11) dem Zungenrund, 11,1 % (n = 5) der Hinterwand, 6,7 % (n = 3) der Seitenwand und 2,2 % (n = 1) den Glossotonsillarfurche. Bei zwei (4,4 %) Karzinomen, beide mit lokal fortgeschrittener Ausdehnung (pT3 – 4), war im Rahmen der Erstdiagnose vom Chirurgen keine Zuordnung zu einer der Sublokalisationen des Oropharynx erfolgt. Einen positiven p16-Status zeigten 57,8 % (n = 26) der OPSCCs, einen negativen p16-Status 42,2 % (n = 19).

Die Verteilung von Patienten-, Erkrankungscharakteristika, Therapie- und Nachsorgedaten werden für das Gesamtkollektiv der miRNA-Studie sowie die p16-stratifizierten Untergruppen in Tabelle 26 dargestellt. Patienten mit p16-positiven vs. p16-negativen OPSCCs wiesen keine signifikant unterschiedlich verteilten Merkmale auf ( $P > 0,05$ ; Tabelle 26).

**Tabelle 26: Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika sowie Nachsorgedaten des Gesamtkollektivs der miRNA-Studie sowie der entsprechend p16-Status stratifizierten Untergruppen**

Charakteristikum	Gesamt, n = 45	p16-positiv, n = 26	p16-negativ, n = 19	P <sup>a</sup>
	n [%]	n [%]	n [%]	
Alter [Jahren]				
Mittelwert ± SD	64,2 ± 11,6	64,2 ± 9,7	64,3 ± 6,4	
Median (Min. – Max.)	63,7 (47 – 91,4)	63,1 (47 – 91,4)	63,8 (54,7 – 77,4)	
Geschlecht				
Männlich	36 80	20 76,9	16 84,2	0,546
Weiblich	9 20	6 23,1	3 15,8	
c/pT-Kategorie				
c/pT1	2 4,4	0 0,0	2 10,5	0,077
c/pT2	11 24,4	5 19,2	6 31,6	
c/pT3	22 48,9	17 65,4	5 26,3	
c/pT4a	6 13,3	2 7,7	4 21,1	
Lokale Tumorausdehnung				
Umschrieben (T1 – 2)	13 28,9	5 19,2	8 42,1	0,095
Fortgeschritten (T3 – 4a/b)	32 71,1	21 80,8	11 57,9	
c/pN-Kategorie				
c/pN0	9 20	3 11,5	6 31,6	0,333
c/pN1	10 22,2	6 23,1	4 21,1	
c/pN2a	2 4,4	2 7,7	0 0,0	
c/pN2b	16 35,6	10 38,5	6 31,6	
c/pN2c	7 15,6	5 19,2	2 10,5	
c/pN3	1 2,2	0 0,0	1 5,3	
Lymphknotenmetastase(n)				
N0	9 20	3 11,5	6 31,6	0,097
N+	36 80	23 88,5	13 68,4	
Stadien <sup>b</sup>				
I	1 2,2	0 0,0	1 5,3	0,443
II	1 2,2	0 0,0	1 5,3	
III	15 33,3	8 30,8	7 36,8	
IVa	24 53,3	16 61,5	8 42,1	
IVb	4 8,9	2 7,7	2 10,5	
Prognostische Gruppen				
Lokal begrenzt/früh (Stadium I – II)	2 4,4	0 0	2 10,5	0,091
Fortgeschritten (Stadium III – IV)	43 95,6	26 100	17 89,5	
Extrakapsuläres Wachstum				
Keine Information	5 11,1	2 7,7	3 15,8	
Positiv	17 37,8	13 50	4 21,1	0,068 <sup>b</sup>
Negativ oder c/pN0	23 51,1	11 42,3	12 63,2	
Lymphgefäßinvasion				
Keine Information	9 20	6 23,1	3 15,8	
Positiv	17 37,8	11 42,3	6 31,6	
Negativ	19 42,2	9 34,6	10 52,6	0,296 <sup>b</sup>
Gefäßinvasion				
Keine Information	9 20	5 19,2	4 21,1	
Positiv	7 15,6	3 11,5	4 21,1	0,355 <sup>b</sup>
Negativ	29 64,4	18 69,2	11 57,9	
Differenzierung				
Hoch (Grad 1)	1 2,2	0 0	1 5,3	0,365 <sup>c</sup>
Moderat (Grad 2)	35 77,8	22 84,6	13 68,4	
Schlecht (Grad 3)	9 20	4 15,4	5 26,3	
Keratinisierung				
Positiv	27 60	16 61,5	11 57,9	0,805
Negativ	18 40	10 38,5	8 42,1	

Charakteristikum	Gesamt, n = 45	p16-positiv, n = 26	p16-negativ, n = 19	P <sup>a</sup>
	n [%]	n [%]	n [%]	
Therapie				
Primäre RCT	4 8,9	2 7,7	2 10,5	0,741 <sup>d</sup>
Primäre Chirurgie + ND ± aR(C)T	41 91,1	24 92,3	17 89,5	
TLM + ND	13 31,7	7 29,2	6 29,4	
TLM + ND + aRT	7 17,1	3 12,5	4 23,5	
TLM + ND + aRCT	21 51,2	14 58,3	7 41,2	
Nachbeobachtung [Monate]				
Mittelwert ± SD	28,4 ± 16,7	29,8 ± 17,1	26,5 ± 16,4	
Median (Min. – Max.)	26,2 (0 – 61,1)	26(0 – 60,3)	26,2 (0,3 – 61,1)	
Alkoholkonsum				
Ja	24 53,3	13 50	11 57,9	0,600
Nein	21 46,7	13 50	8 42,1	
Tabakkonsum				
Keine Information	1 2,2	1 3,8	0 0,0	
Früher/aktuell	28 62,2	13 50,0	15 78,9	0,066 <sup>b</sup>
Nie	16 35,6	12 46,2	4 21,1	
Tabak- und Alkoholkonsum				
Unvollständige Information	1 2,2	1 3,8	0 0,0	
Ja	19 42,2	10 38,5	9 47,4	0,625 <sup>b</sup>
Nein	25 55,6	15 57,7	10 52,6	

Klinisch-pathologische Charakteristika und Informationen über die Nachsorge sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten mit p16-positiven vs. p16-negativen OPSCCs sind aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test. <sup>b</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests unter Ausschluss von Patienten ohne verfügbare Information; <sup>c</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen OPSCCs mit hohem/moderatem vs. schlechtem Differenzierungsgrad; <sup>d</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten, deren Therapiekonzept auf einer primären chirurgischen Resektion vs. primärer RCT basierte.

Abkürzungen: aR(C)T = adjuvante Radio(chemo)therapie; c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; c/pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; ND = Neck-Dissection; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; R(C)T = Radio(chemo)therapie; TLM = Transorale Lasermikrochirurgie.

### 3.4.2 Onkologische Ergebnisse

Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug  $26,2 \pm 16,7$  Monate mit einem Maximum von 61,1 Monaten.

Für das Gesamtkollektiv der miRNA-Studie betragen die Schätzungen des OS 64,5 %, DSS 79,6 %, PFS 43,2 %, RFS 49,2 % und der LCR 83,7 %. Die Kaplan-Meier-Kurven der p16-stratifizierten Untergruppen sind in Abbildung A. 4 im Anhang dargestellt. Die Untergruppe mit p16-positiven OPSCCs zeigte einen Trend zu höherem PFS und RFS (PFS: HR = 0,46, 95 %-CI 0,2 – 1,03 P = 0,052; RFS: HR = 0,45, 95 %-CI 0,18 – 1,12 P = 0,079). Keine signifikanten Abweichungen zeigten sich in Bezug auf das OS, DSS und der LCR (OS: HR = 0,6, 95 %-CI 0,22 – 1,66 P = 0,324; DSS: HR = 0,68, 95 %-CI 0,17 – 2,72 P = 0,584; LCR: HR = 0,7, 95 %-CI 0,14 – 3,46 P = 0,658).

### 3.4.3 Übersicht über die miRNA-Analysen

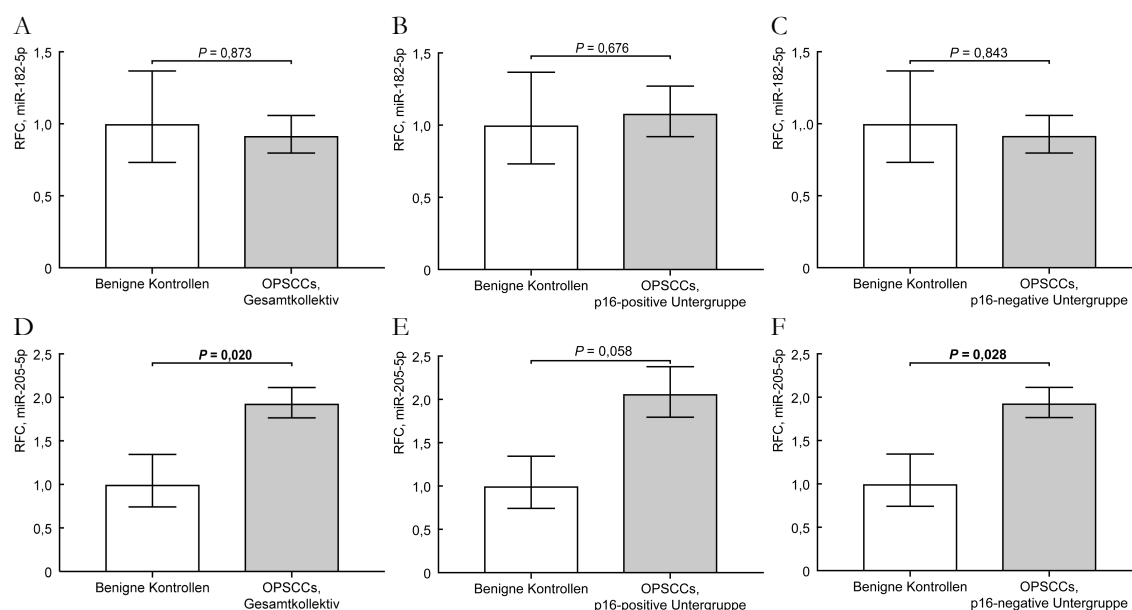
In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der in Tabelle 6 aufgelisteten miRNAs in FF-Proben der 26 p16-positiven und 19 p16-negativen OPSCCs sowie 18 HPV-negativen

Kontrollproben exploriert. Von diesen wiesen miR-182-5p und miR-205-5p das Potential einer prognostischen Stratifizierung auf (siehe folgender Abschnitt 0). Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur (Berania et al. 2017; Brito et al. 2016; Cao MQ et al. 2018; Casanova-Salas et al. 2014; Chou et al. 2018; Ganci et al. 2013; Gulei et al. 2018; Guo et al. 2020; Hagman et al. 2013; Jiang L et al. 2010; Kolenda et al. 2019; Li J et al. 2017; Li JH et al. 2017; Li et al. 2018; Lv et al. 2019; Nagai et al. 2018; Pan et al. 2017; Qu et al. 2012; Rapti et al. 2014; Stenvold et al. 2014; Tian et al. 2014; Valenti et al. 2019; Wang F et al. 2015; Wang J et al. 2017; Wang L et al. 2017; Wang S et al. 2014; Wu et al. 2020; Xu S et al. 2019; Yeh et al. 2016; Zhong und Xiong 2015) und des Ziels der Studie, die potentielle Assoziation von miRNAs mit der Prognose von Patienten mit OPSCCs zu untersuchen, fokussiert sich die folgende Darstellung der Ergebnisse sowie deren Diskussion auf den miR-182-5p und miR-205-5p. Die Ergebnisse der weiteren untersuchten miRNAs sind für den Vergleich der Expression in malignem gegenüber benignem Gewebe in Tabelle A. 4, für die Analysen der miRNAs im Kontext der Erkrankungs-, Therapiecharakteristika sowie der Prognose sind in Bezug auf das Gesamtkollektiv in Tabelle A. 5, die p16-positive Untergruppe in Tabelle A. 6 und die p16-negative Untergruppe in Tabelle A. 7 jeweils im Anhang dargestellt.

#### **3.4.4 Expression von miR-182-5p und miR-205-5p malignem versus benignem Gewebe**

Zur Einordnung der miRNAs als potentiell onkogen oder tumorsuppressiv wurden zunächst die relative miRNA-Expressionsänderung in OPSCCs im Vergleich zu den benignen Kontrollen untersucht. Für die Expression von miR-182-5p zeigte sich weder unter Berücksichtigung des Gesamtkollektivs noch in Bezug auf eine der p16-stratifizierten Untergruppen eine signifikante Abweichung (Gesamtkollektiv: *Relative Fold Change* (RFC) = 0,92 P = 0,78; p16-positiv: RFC = 0,81 P = 0,84; p16-negativ: RFC = 1,08 P = 0,84). Für miR-205-5p hingegen zeigte sich unter Berücksichtigung sowohl des Gesamtkollektivs als auch der p16-negativen Untergruppe jeweils eine signifikante Überexpression in OPSCCs gegenüber den benignen Kontrollen (Gesamtkollektiv: RFC = 1,93 P = 0,02; p16-negativ: RFC = 2,07 P = 0,03). Ein statistischer Trend zu einer höheren miR-205-5p-Expression wiesen auch p16-positive OPSCCs auf (p16-positiv: RFC = 1,84 P = 0,06).

Die Gegenüberstellung der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p des Gesamtkollektivs und der p16-stratifizierten Untergruppen mit jener der benignen Kontrollen ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Relative Expressionsänderung von miR-182-5p und miR-205-5p in OPSCCs im Vergleich zu den benignen Kontrollen.** Der RFC der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p in OPSCCs gegenüber den benignen Kontrollen ist für das Gesamtkollektiv (A, D), die p16-positiven (B, E) sowie die p16-negativen Untergruppen (C, F) der miRNA-Studie modifiziert nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Der P-Wert des Mann-Whitney-U-Tests ist angegeben. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt.

### 3.4.5 miRNAs und Patienten-, Erkrankungs-, sowie Therapiecharakteristika

Assoziationen zwischen miR-182-5p und miR-205-5p und Patienten- und Erkrankungscharakteristika wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests und der Spearman-Rangkorrelation analysiert.

Es wurden weder unter Berücksichtigung des Gesamtkollektivs noch den p16-stratifizierten Untergruppen signifikante Unterschiede in der Expression von miR-182-5p oder miR-205-5p in Bezug auf Geschlecht, Alter, lokale Tumorausdehnung (begrenzte (T1 – 2) vs. fortgeschritten (T3 – 4)), regionäre Lymphknotenmetastasierung (N0 vs. N+), ECS (ECS-negativ und c/pN0 vs. ECS-positiv), prognostische Stadiengruppierung (früh (I – II) vs. fortgeschritten (III – IV)), zelluläre Differenzierung (hoch/moderat vs. schlecht), Lymph-gefäßinvasion, Veneninvasion sowie Tabak- und/oder Alkoholkonsum festgestellt (Tabelle 27; Mann-Whitney-U-Test jeweils  $P > 0,05$ ). Die Expression von miR-182-5p und miR-205-5p wurde daher als unabhängig von diesen Charakteristika angenommen.

In Bezug auf das gesamte miRNA-Kollektiv, nicht jedoch in den p16-stratifizierten Untergruppen, demonstrierten Patienten mit Alkoholkonsum eine signifikant höhere miR-182-5p-Expression als Patienten, die jeglichen Alkoholkonsum negiert hatten ( $P = 0,03$ ; p16-positiv:  $P = 0,13$ ; p16-negativ:  $P = 0,65$ ). Ferner ergab sich ohne Berücksichtigung des p16-Status für verhornende OPSCCs eine signifikant höhere miR-205-5p-Expression



( $P = 0,05$ ). Ein solcher Trend ergab sich auch für die p16-negativen Untergruppe ( $P = 0,06$ ), wohingegen sich bei der Auswertung der p16-positiven Untergruppe keine derartige Abweichung zeigte (p16-positiv:  $P = 0,28$ ).

**Tabelle 27: miR-182-5p- und miR-205-5p-Expression im Kontext der Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika**

Charakteristikum	Gesamtkollektiv, n = 45		p16-positiv, n = 26		p16-negativ, n = 19	
	miR-182-5p	miR-205-5p	miR-182-5p	miR-205-5p	miR-182-5p	miR-205-5p
Geschlecht <sup>a</sup>	0,419	0,744	0,378	0,523	0,955	0,065
Alter <sup>b</sup>	0,790	0,984	0,653	0,694	0,694	0,792
Lokale Tumorausdehnung <sup>c</sup>	0,831	0,754	0,558	0,745	0,836	0,967
Lymphknotenmetastasierung <sup>d</sup>	0,523	0,435	0,688	0,748	0,759	0,273
ECS <sup>e, g</sup>	0,722	0,722	0,908	0,772	0,671	0,585
Stadiengruppen <sup>a</sup>	0,526	0,215	1	1	0,740	0,207
Differenzierung <sup>f</sup>	0,989	0,989	0,915	0,500	0,817	0,487
Keratinisierung <sup>a</sup>	0,107	0,048	0,133	0,280	0,650	0,063
Invasion der Lymphgefäße <sup>a, g</sup>	0,824	0,612	0,879	0,224	0,551	0,704
Veneninvasion <sup>a, g</sup>	0,576	0,497	0,175	0,880	0,648	0,215
Alkohol <sup>a</sup>	0,027	0,334	0,101	0,473	0,127	0,773
Tabak <sup>a, g</sup>	0,335	0,168	0,314	0,265	0,803	0,726
Tabak- und Alkoholkonsum <sup>a, g</sup>	0,142	0,093	0,677	0,127	0,079	0,540

Ergebnisse potentieller Assoziationen der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p mit Patienten- und Erkrankungscharakteristika sind für das Gesamtkollektiv und die p16-positive und p16-negative Untergruppe nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Die P-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt (Details siehe Notizen). Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Mann-Whitney-U-Test; <sup>b</sup> Spearmannscher-Rangkorrelations-Test; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit begrenzter (pT1 – 2) vs. fortgeschrittener (pT3 – 4a) lokaler Tumorausdehnung; <sup>d</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit vs. ohne Lymphknotenmetastase (N0); <sup>e</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen Patienten mit ECS vs. Patienten ohne ECS (N+ ECS-/N0); <sup>f</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit hoher/moderater vs. schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>g</sup> Exklusion von Patienten ohne verfügbare Information; <sup>h</sup> P-Wert des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit  $\geq$  vs.  $<$  medianen Expression in der jeweiligen Gruppe.

Abkürzungen: DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläres Tumorwachstum; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.

### 3.4.6 miRNAs zur prognostischen Stratifizierung

Zur Untersuchung potentieller prognostischer Unterschiede zwischen Gruppen mit OPSCCs hoher oder niedriger Expression von miR-182-5p oder miR-205-5p erfolgte zunächst die Dichtomisierung auf der Basis der medianen Expression der jeweiligen miRNA wie in Abschnitt 2.6 beschrieben. Anschließend wurden die onkologischen Endpunkte zwischen den resultierenden Gruppen verglichen. Die Resultate sind in Tabelle 28 und als Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 10 (miR-182-5p) und Abbildung 11 (miR-205-5p) dargestellt.

Für das Gesamtkollektiv war ein höheres Expressionsniveau von miR-182-5p mit einem signifikant reduzierten DSS und RFS assoziiert (DSS: HR = 1,79E + 09, 95 %-CI 0 – Inf  $P = 0,003$ ; RFS: HR = 2,62, 95 %-CI 0,99 – 6,92  $P = 0,043$ ). Darüber hinaus zeigten Patienten der p16-positiven Untergruppe mit einem höheren miR-182-5p-Expressionsniveau ebenfalls eine signifikant unterlegene DSS (HR = 1,98E+09, 95 %-CI 0 – Inf  $P = 0,028$ ). Auch innerhalb der p16-negativen Untergruppe zeigte sich ein solcher Trend zu

einer Assoziation zwischen einem höheren miR-182-5p-Expressionsniveau und einem geringeren DSS (HR = 1,56E+09, 95 %-CI 0 – Inf P = 0,051). Aufgrund fehlender Ereignisse in der jeweiligen Gruppe mit niedrigem Expressionsniveau konnte für diese Vergleiche keine HR und exaktes 95 %-CI angegeben werden.

In Bezug auf miR-205-5p, zeigten sich für das Gesamtkollektiv ein gesteigertes miR-205-5p-Expressionsniveau mit einem signifikant unterlegenen PFS, RFS sowie einer signifikant geringeren LCR assoziiert (PFS: HR = 2,58, 95 %-CI 1,1 – 6,07 P = 0,024; RFS: HR = 2,94, 95 %-CI 1,11 – 7,78 P = 0,023; LCR: HR = 6,64, 95 %-CI 0,77 – 57,23 P = 0,047). Innerhalb der p16-positiven Untergruppe war die Expression von miR-205-5p ebenfalls signifikant negativ mit dem PFS und der LCR assoziiert (PFS: HR = 4,62, 95 %-CI 0,98 – 21,83 P = 0,034; LCR: HR = 2,18E+09, 95 %-CI 0 – Inf P = 0,048). In der p16-negativen Untergruppe ergaben sich keine signifikanten prognostischen Abweichungen (Abbildung 11).

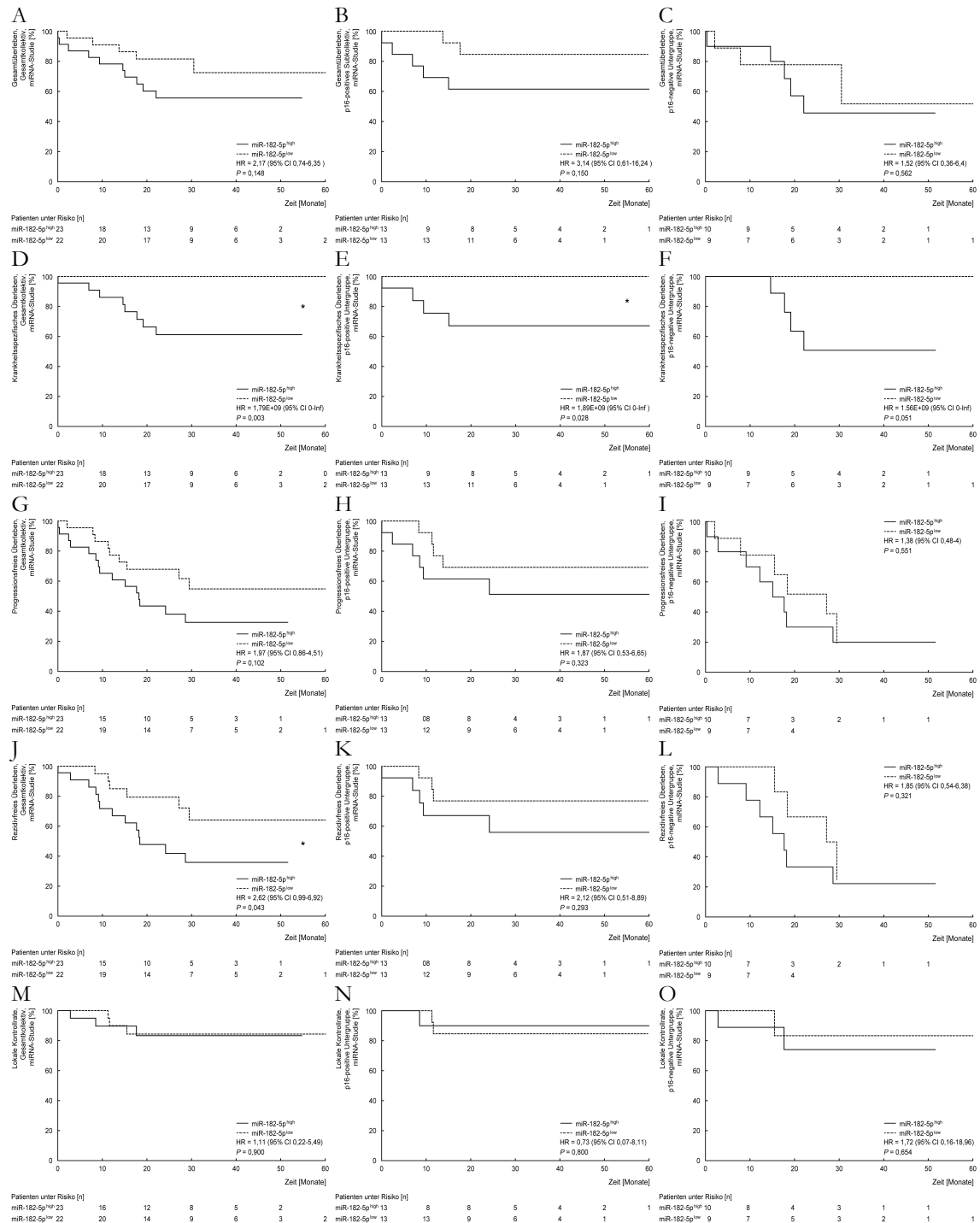
**Tabelle 28: miR-182-5p und miR-205-5p und Prognose bei OPSCCs**

Endpunkt	Gesamt, n = 45		p16-positiv, n = 26		p16-negativ, n = 19		
	miR-182-5p	miR-205-5p	miR-182-5p	miR-205-5p	miR-182-5p	miR-205-5p	
OS	HR	2,17	1,6	3,14	2,85	1,52	1,06
	95 %-CI	0,74 – 6,35	0,57 – 4,50	0,61 – 16,24	0,55 – 14,76	0,36 – 6,4	0,26 – 4,28
	P <sup>a</sup>	0,148	0,369	0,150	0,192	0,562	0,934
DSS	HR	1,79E+09	1,84	1,98E+09	3,31	1,56E+09	0,42
	95 %-CI	0 – Inf	0,44 – 7,7	0 – inf	0,34 – 31,88	0 – Inf	0,04 – 4,1
	P <sup>a</sup>	<b>0,003</b>	0,399	<b>0,028</b>	0,273	0,051	0,445
PFS	HR	1,97	2,58	1,87	4,62	1,38	1,96
	95 %-CI	0,86 – 4,51	1,1 – 6,07	0,53 – 6,65	0,98 – 21,83	0,48 – 4	0,67 – 5,75
	P <sup>a</sup>	0,102	0,024	0,323	<b>0,034</b>	0,551	0,211
RFS	HR	2,62	2,94	2,12	3,41	1,85	1,97
	95 %-CI	0,99 – 6,92	1,11 – 7,78	0,51 – 8,89	0,69 – 16,92	0,54 – 6,38	0,59 – 6,55
	P <sup>a</sup>	<b>0,043</b>	<b>0,023</b>	0,293	0,111	0,321	0,261
LCR	HR	1,11	6,64	0,73	2,18E+09	1,72	3,23
	95 %-CI	0,22 – 5,49	0,77 – 57,23	0,07 – 8,11	0 – Inf	0,16 – 18,96	0,28 – 37,48
	P <sup>a</sup>	0,9	<b>0,047</b>	0,800	<b>0,048</b>	0,654	0,326

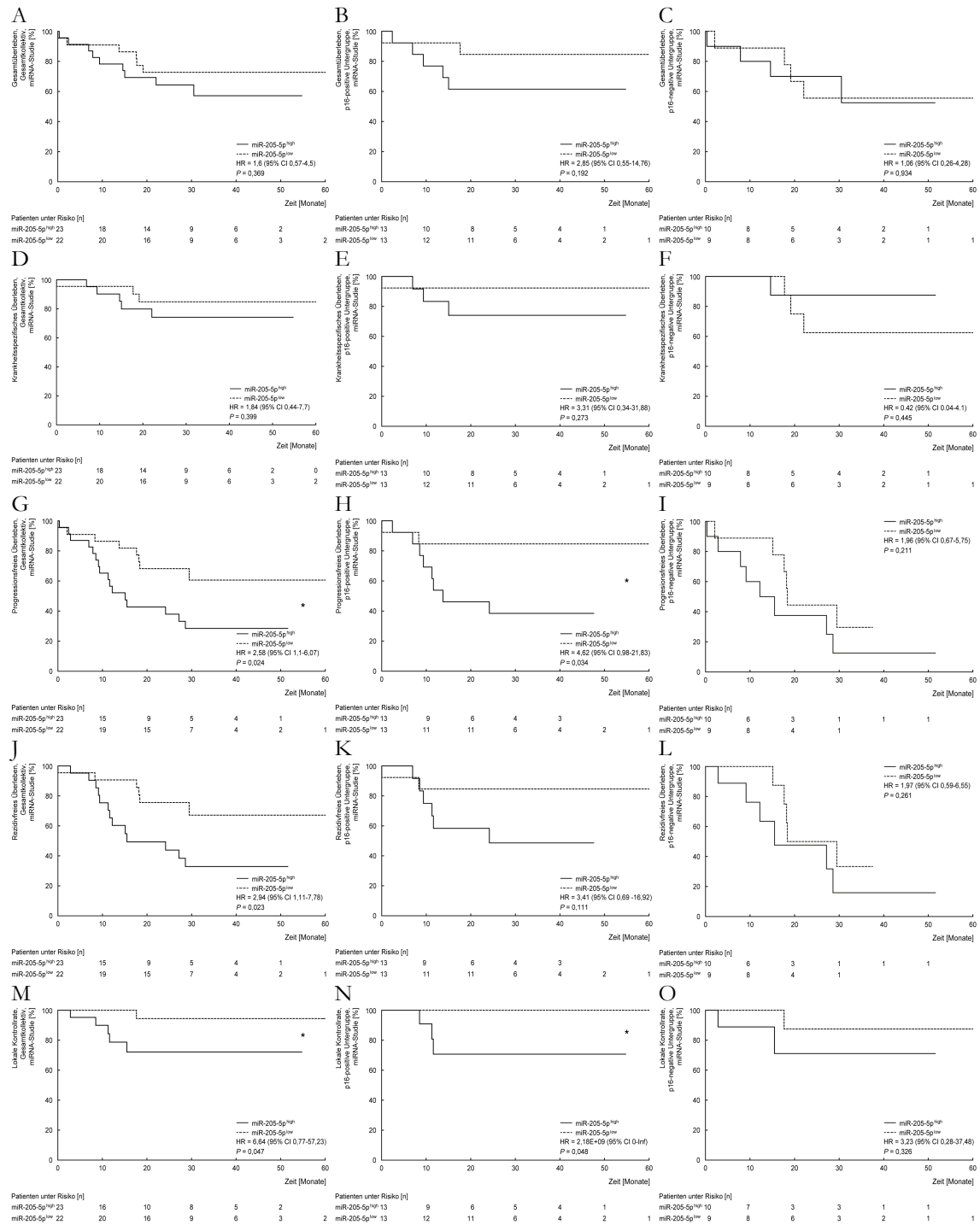
Die Assoziation zwischen miR-182-5p und miR-205-5p und den prognostischen Endpunkten ist für das Gesamtkollektiv und die p16-stratifizierten Untergruppen dargestellt. Die P-Werte des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit relativ höherer ( $\geq$  Median) und niedrigerer ( $<$  Median) Expression von miR-182-5p und miR-205-5p sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> P-Werte des Log-Rang-Tests.

Abkürzungen: CI = *confidence interval*, Konfidenzintervall; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; HR = Hazard Ratio; Inf = *infinite*, unendlich; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; miR = MicroRNA; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Abbildung 10: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach miR-182-5p-Expression.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A – C, das Gesamtüberleben, D – F, das krankheitsspezifische Überleben, G – I, das progressionsfreie Überleben, J – L, das rezidivfreie Überleben sowie M – O, die lokale Kontrollrate sind für das Gesamtkollektiv (A, D, G, J, M) sowie die p16-positive (B, E, H, K, N) und p16-negative Untergruppe (C, F, I, L, O) der miRNA-Studie stratifiziert nach der relativ höheren ( $\geq$  Median; <sup>high</sup>) und niedrigeren ( $<$  Median; <sup>low</sup>) miR-182-5p-Expression und nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



**Abbildung 11: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach miR-205-5p-Expression.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A – C, das Gesamtüberleben, D – F, das krankheitsspezifische, G – I, das progressionsfreie und J – L, das rezidivfreie Überleben sowie M – O, die lokale Kontrollrate sind für das Gesamtkollektiv (A, D, G, J, M) sowie die p16-positive (B, E, H, K, N) und p16-negative Untergruppe (C, F, I, L, O) der miRNA-Studie stratifiziert nach der relativ höheren ( $\geq$  Median; <sup>high</sup>) und niedrigeren ( $<$  Median; <sup>low</sup>) miR-205-5p-Expression und modifiziert nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 3.4.7 Potenziell prognostisch relevante Einflussfaktoren

Zur Identifizierung potentiell prognostisch relevanter Einflussfaktoren erfolgte die Durchführung der Ereigniszeitanalysen im Kontext von Patienten- und Erkrankungscharakteristika, welche bereits auf eventuelle miRNA-Expressionsunterschiede analysiert wurden (Abschnitt 3.4.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Ohne Berücksichtigung des p16-Status war ausschließlich ein geringerer histopathologischer Differenzierungsgrad (G1 – 2 vs. G3) signifikant mit einem unterlegenen OS assoziiert (HR = 2,84, 95 %-CI 0,96 – 8,41 P = 0,049).

Für die p16-positive Untergruppe zeigte ausschließlich eine regionale Lymphknotenmetastasierung (N+ vs. N0) eine signifikante Assoziation mit einem überlegenen OS (HR = 0,21, 95 %-CI 0,04 – 1,1 P = 0,042). Diesbezüglich sei auf das Vorliegen eines fortgeschrittenen lokalen Primärtumors (pT3 – 4a) bei allen der insgesamt drei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen hingewiesen. Bei zwei dieser Patienten trat der Tod zeitnah nach der initialen Resektion im Kontext einer postoperativen Komplikation ein. Der dritte Patient verstarb interkurrent 13,5 Monate nach der Erstdiagnose.

Innerhalb der p16-negativen Untergruppe waren lokal fortgeschrittene OPSCCs (T1 – 2 vs. T4a/b) signifikant mit einem unterlegenen PFS und RFS assoziiert (PFS: HR = 5,00, 95 %-CI 1,34 – 18,67 P = 0,009; RFS: HR = 4,00, 95 %-CI 1,01 – 15,87 P = 0,034). Ferner zeigten Patienten mit OPSCCs mit ECS-positiver Lymphknotenmetastasierung (N+ ECS-positiv) ein signifikant geringeres OS und PFS als die zusammengefasste Gruppe von Patienten ohne jegliche oder mit ECS-negativer Lymphknotenmetastasierung (N0 und N+ ECS-negativ) (OS: HR = 5,81, 95 %-CI 1,12 – 30,05 P = 0,019; PFS: HR = 4,97, 95 %-CI 1,3 – 18,96 P = 0,010).

Unter Berücksichtigung aller dieser Ergebnisse (potentielle prognostische Assoziationen von Patienten- und Erkrankungscharakteristika; Tabelle 29) zeigte sich im Vergleich mit jenen der univariaten Analysen der miRNAs (potentielle prognostische Assoziationen der miRNA-Expression; Tabelle 28), keine kongruente und daher potentiell interferierende signifikante Assoziation eines Patienten- oder respektive einer der miRNAs mit einem der prognostischen Endpunkte in derselben Gruppe. Somit wurde eine Unabhängigkeit der im Rahmen der univariaten Analyse festgestellten signifikanten prognostischen Assoziationen von miR-182-5p und miR-205-5p von den untersuchten Patienten-, Erkrankungs-, und Therapiecharakteristika angenommen und aus diesem Grund keine weitere multivariate Testung vorgenommen.

Tabelle 29: Ereigniszeitanalysen im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika in der miRNA-Studie

Charakteristikum	Gesamtkollektiv, n = 45					p16-positiv, n = 26					p16-negativ, n = 19					
	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	
Geschlecht	HR	0,91	0	1,58	1,76	2,19	1,34	0	1,79	1,41	1,79	0,46	0	1,32	1,77	2,43
	95 %-CI	0,26	0	0,63	0,63	0,4	0,26	0	0,46	0,28	0,16	0,05	0	0,36	0,45	0,22
	P	- 3,23	- Inf	- 4	- 4,9	- 11,94	- 6,9	- Inf	- 6,97	- 7,03	- 19,79	- 3,82	- Inf	- 4,86	- 6,94	- 26,87
Alter <sup>a</sup>	HR	0,887	0,138	0,329	0,275	0,354	0,727	0,283	0,393	0,672	0,630	0,458	0,266	0,671	0,404	0,454
	95 %-CI	1,55	1,63	1,22	1,09	2,81	1,37	1,63	1,37	1,76	1,05	1,73	1,76	1,12	0,82	1,11E+09
	P	0,49	0,33	0,52	0,43	0,33	0,27	0,17	0,35	0,35	0,09	0,34	0,18	0,37	0,25	0
Keratinisierung	HR	- 4,89	- 8,09	- 2,87	- 2,79	- 24,15	- 7,08	- 15,7	- 5,33	- 8,77	- 11,56	- 8,8	- 17,04	- 3,4	- 2,75	- Inf
	95 %-CI	0,455	0,547	0,645	0,854	0,326	0,703	0,669	0,649	0,487	0,970	0,507	0,620	0,847	0,750	0,173
	P	2,14	1,32	1,09	0,73	1,53	1,49	0,59	1,55	1,1	1,07E+09	3,48	3,56	1	0,61	0,47
Differenzierung <sup>b</sup>	HR	0,68	0,31	0,48	0,29	0,28	0,29	0,08	0,4	0,26	0	0,69	0,37	0,35	0,18	0,04
	95 %-CI	- 6,76	- 5,54	- 2,47	- 1,8	- 8,4	- 7,68	- 4,21	- 6,01	- 4,61	- Inf	- 17,63	- 34,35	- 2,88	- 2,11	- 5,26
	P	0,182	0,703	0,828	0,489	0,619	0,632	0,596	0,526	0,900	0,178	0,111	0,241	0,995	0,435	0,534
Lokale Tumorausdehnung	HR	2,84	1,88	1,86	1,57	0	2,87	2,32	1,6	0,93	0	2,51	1,71	1,81	1,99	0
	95 %-CI	0,96	0,38	0,72	0,51	0	0,55	0,24	0,34	0,11	0	0,58	0,17	0,54	0,49	0 - Inf
	P	- 8,41	- 9,41	- 4,8	- 4,86	- Inf	- 14,85	- 22,48	- 7,59	- 7,58	- Inf	- 10,83	- 17,03	- 6,1	- 8,09	0 - Inf
Lymphknotenmetastasierung	HR	0,049	0,433	0,190	0,431	0,258	0,189	0,455	0,550	0,944	0,483	0,202	0,645	0,330	0,327	0,363
	95 %-CI	3,35	3,71	1,69	1,27	1,08	2,67E+08	2,64E+08	1,2	9,92	0,61	3,16	3,56	5	4	2,16
	P	0,76	0,46	0,67	0,48	0,2	0	0	0,25	0,19	0,06	0,63	0,37	1,34	1,01	0,19
ECS <sup>s, c</sup>	HR	- 14,88	- 30,18	- 4,28	- 3,35	- 5,9	- Inf	- Inf	- 5,66	- 4,59	- 6,79	- 15,75	- 34,35	- 18,67	- 15,87	- 23,91
	95 %-CI	0,091	0,189	0,259	0,628	0,929	0,161	0,296	0,819	0,922	0,688	0,140	0,241	0,009	0,034	0,521
	P	0,091	0,189	0,259	0,628	0,929	0,161	0,296	0,819	0,922	0,688	0,140	0,241	0,009	0,034	0,521
Lymphgefäßinvasion <sup>c</sup>	HR	0,95	0,73	0,62	0,57	0,45	0,21	0,27	0,41	0,72	7,69E+07	4,07	2,07	1,01	0,67	0,25
	95 %-CI	0,27	0,15	0,25	0,2	0,08	0,04	0,03	0,09	0,09	0	0,5	0,21	0,31	0,19	0,02
	P	- 3,38	- 3,63	- 1,58	- 1,58	- 2,48	- 1,1	- 2,64	- 1,95	- 5,88	- Inf	- 33,26	- 19,98	- 3,24	- 2,31	- 2,79
Lymphgefäßinvasion <sup>c</sup>	HR	0,941	0,702	0,315	0,272	0,349	0,042	0,226	0,250	0,760	0,577	0,156	0,520	0,991	0,523	0,224
	95 %-CI	1,53	0,78	1,05	0,58	1,16	0,82	0,83	0,71	0,68	1,87	5,81	0	4,97	1,53	0
	P	0,49	0,14	0,43	0,18	0,19	0,16	0,12	0,19	0,15	0,17	1,12	0	1,3	0,18	0
Lymphgefäßinvasion <sup>c</sup>	HR	- 4,76	- 4,29	- 2,56	- 1,83	- 6,95	- 4,04	- 5,88	- 2,64	- 3,03	- 20,65	- 30,05	- Inf	- 18,96	- 13,18	- Inf
	95 %-CI	0,458	0,779	0,921	0,347	0,871	0,802	0,849	0,607	0,609	0,603	0,019	0,659	0,010	0,698	0,598
	P	0,78	0,46	0,76	0,69	0,27	0,19	0,26	0,41	0,52	0,34	3,12	1,69	2,44	2,19	0
Lymphgefäßinvasion <sup>c</sup>	HR	0,25	0,09	0,31	0,24	0,03	0,02	0,03	0,1	0,12	0,03	0,68	0,15	0,69	0,48	0
	95 %-CI	- 2,47	- 2,38	- 1,9	- 1,94	- 2,46	- 1,69	- 2,47	- 1,71	- 2,36	- 3,78	- 14,37	- 19,16	- 8,63	- 9,97	- Inf
	P	- 2,47	- 2,38	- 1,9	- 1,94	- 2,46	- 1,69	- 2,47	- 1,71	- 2,36	- 3,78	- 14,37	- 19,16	- 8,63	- 9,97	- Inf

Charakteristikum	Gesamtkollektiv, n = 45					p16-positiv, n = 26					p16-negativ, n = 19					
	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	OS	DSS	PFS	RFS	LCR	
P	0,670	0,344	0,560	0,476	0,216	0,095	0,204	0,204	0,391	0,358	0,125	0,667	0,155	0,301	0,372	
HR	7,18E+07	7,21E+07	1,31	1,04	0,28						2,29E+08	2,36E+08	2,2	1,8	0,27	
Stadien- gruppen	95 %-CI	0 – Inf	0 – Inf	0,18 – 9,72	0,14 – 7,8	0,03 – 2,37	I – II, n = 0	I – II, n = 0	I – II, n = 0	I – II, n = 0	I – II, n = 0	0 – Inf	0 – Inf	0,29 – 16,96	0,23 – 14,23	0,02 – 3,04
P	0,355	0,490	0,791	0,970	0,209						0,256	0,388	0,437	0,570	0,257	
HR	0,67	0,71	0,71	0,53	0,62	0,58	7,58E+07	0,62	0,48	7,69E+07	0,92	0,38	0,92	0,72	0,35	
Therapie <sup>e</sup>	95 %-CI	0,15 – 2,97	0,09 – 5,79	0,21 – 2,38	0,15 – 1,83	0,07 – 5,33	0,07 – 4,79	0 – inf	0,08 – 4,96	0,06 – 3,92	0 – Inf	0,11 – 7,52	0,04 – 3,71	0,2 – 4,17	0,15 – 3,39	0,03 – 3,94
P	0,592	0,747	0,572	0,307	0,662	0,605	0,540	0,653	0,483	0,577	0,938	0,386	0,913	0,672	0,377	
HR	1,39	2,32	0,67	0,59	0	1	1,02	0,52	0,31	0	3,47	1,29E+09	1,23	1,47	0	
Alkohol	95 %-CI	0,72 – 0,48	0,43 – 0,33	1,49 – 1,17	1,71 – 1,34	3,16E+08 – 1,52	1 – 2,06	0,98 – 1,03	1,93 – 3,77	3,26 – 3,2	3,36E+0 – 1,77	0,29 – 0,13	0 – 0	0,81 – 0,75	0,68 – 0,84	3,61E+08 – 2,2
P	0,447	0,413	0,782	0,677	0,390	0,791	0,999	0,345	0,320	0,630	0,079	0,140	0,882	0,906	0,593	
HR	0,53	0,48	0,76	0,89	0,34	0,71,	0,32	1,21	1,28	0,83	0,34	0,73	0,54	0,66	0	
Tabak <sup>e, f</sup>	95 %-CI	0,17 – 1,65	0,1 – 2,37	0,32 – 1,8	0,35 – 2,31	0,04 – 3,07	0,16 – 3,17	0,03 – 3,06	0,32 – 4,52	0,28 – 5,74	0,05 – 13,2	0,04 – 2,77	0,08 – 7,05	0,15 – 1,99	0,17 – 2,57	0 – Inf
P	0,263	0,355	0,534	0,817	0,315	0,651	0,294	0,777	0,748	0,892	0,288	0,783	0,346	0,548	0,251	
HR	0,71	0	0,75	0,3	1,17	0,75	0	0,7	0	0	1,01	0	2,02	1,77	6,63	
Tabak <sup>e, g</sup>	95 %-CI	1,4 – 2,04	1,33E+08 – 2,71	1,34 – 1,4	3,34 – 1,36	0,85 – 2,81	1,33 – 1,53	2,17E+0 – 4,47	1,43 – 0,91	2,57E+08 – 1,15	3,36E+08 – 1,77	0,99 – 2,97	9,06E+0 – 1,59	0,5 – 1,73	0,57 – 1,45	0,15 – 2,88E+08
P	0,477	0,211	0,735	0,448	0,596	0,871	0,220	0,920	0,512	0,767	0,569	0,742	0,425	0,726	0,108	
HR	0,67	0,39	0,94	1,02	0,66	1,24	0,55	2,17	2,28	1,47	0	0	0,31	0,36	0	
Alkohol und/oder Tabak <sup>e</sup>	95 %-CI	0,19 – 2,37	0,05 – 3,2	0,37 – 2,38	0,36 – 2,85	0,07 – 5,95	0,28 – 5,56	0,06 – 5,29	0,58 – 8,1	0,51 – 10,22	0,09 – 23,54	0 – Inf	0 – Inf	0,04 – 2,43	0,04 – 2,85	0 – Inf
P	0,530	0,366	0,896	0,977	0,713	0,776	0,598	0,240	0,270	0,783	0,219	0,388	0,241	0,312	0,464	

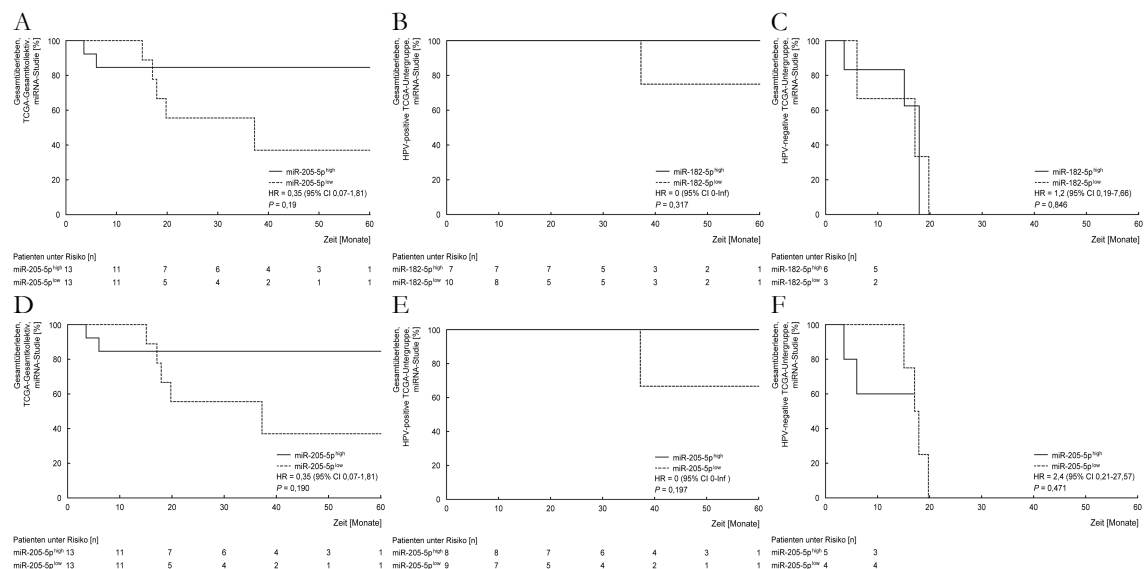
Patienten-, Erkrankungs-, Therapie-, Nachsorgecharakteristika bei OPSCCs sind für das Gesamtkollektiv sowie die p16-stratifizierten Untergruppen dargestellt. Die P-Werte des Log-Rang-Tests zwischen den Kategorien der jeweiligen Charakteristika sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Alter: < 60 vs. > 60 Jahre; <sup>b</sup> Histopathologischer Differenzierungsgrad: gut/moderat (G1 – 2) vs. schlecht (G3); <sup>c</sup> Ausschluss von Patienten ohne dokumentierte Angaben; <sup>d</sup> ECS: ECS-positiv vs. N0/negativ; <sup>e</sup> Therapie: primäre Radiochemotherapie vs. primäre Resektion; <sup>f</sup> Tabakkonsum: Nicht- vs. (Ex-)Raucher; <sup>g</sup> Tabakkonsum: nie (Nichtraucher) vs. aktuell (Raucher) vs. früher (Ex-Raucher)

Abkürzungen: CI = *confidence intervall*, Konfidenzintervall; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HR = Hazard Ratio; Inf = *infinite*, unendlich; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; miR = MicroRNA; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.

### 3.4.8 Validierungsversuch

Die Ergebnisse der univariaten Analysen von miRNAs im Kontext prognostischer Endpunkte sollten in einem Datensatz des TCGA validiert werden. In diesen wurden 26 Patienten mit HPV-positiven (65,4 %, n = 17) oder HPV-negativen (34,6 %, n = 9) OPSCCs integriert (TCGA-Gesamtkollektiv; siehe Abschnitt 2.3.4.1). Der p16-Status war nicht vorliegend und konnte daher nicht zur Stratifizierung herangezogen werden. Da ausschließlich für das OS im TCGA-Datensatz vollständige Nachsorgedaten vorlagen wurden lediglich für diesen Endpunkt entsprechende Ereigniszeitanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Unter Berücksichtigung des TCGA-Gesamtkollektivs zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem OS und der miR-182-5p-Expression (HR = 0,69, 95 %-CI 0,15 – 3,08 P = 0,622) oder der miR-205-5p Expression (HR = 0,35, 95 %-CI 0,07 – 1,81 P = 0,1903). Ebenso zeigten die HPV-stratifizierten Analysen keine signifikante Abweichung in Bezug auf das OS und die miR-182-5p Expression (HPV-positiv: HR = 0,0, 95 %-CI 0 – Inf P = 0,317; HPV-negativ: HR = 1,2, 95 %-CI 0,19 – 7,66 P = 0,846) oder miR-205-5p Expression (HPV-positiv: HR = 0,0, 95 %-CI 0 – Inf P = 0,197; HPV-negativ: HR = 2,4, 95 %-CI 0,21 – 27,57 P = 0,471). Dies deckt sich mit den Ergebnissen des miRNA-Kollektivs der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 3.4.6).



**Abbildung 12: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs des TCGA-Datensatzes stratifiziert nach der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p.** Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben des TCGA-Gesamtkollektivs (A, D) sowie für das HPV-positive (B, E) und das HPV-negative TCGA-Untergruppe (C, F) sind stratifiziert nach der relativ höheren ( $\geq$  Median; *high*) und niedrigeren ( $<$  Median; *low*) miR-182-5p-Expression (A – C) und miR-205-5p-Expression (D – F) und modifiziert nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Hauptfragestellungen adressiert. Es wurden die onkologischen und funktionellen Langzeitergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie in der Primärtherapie von Patienten mit Oropharynxkarzinomen untersucht (TLM-Studie) und der Stellenwert einer adjuvanten Radiotherapie bei umschriebene, lokal umschriebenen (pT1 – 2) Kopf-Hals-Karzinome mit singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastase (pN1) ohne extrakapsuläres Wachstum analysiert (pN1-Studie). Weiterhin wurde die Bedeutung des p16- und/oder HPV-Status (p16-HPV-Studie) und der Expression spezifischer miRNAs (miRNA-Studie) als Biomarker zur prognostischen Stratifizierung von Patienten mit Oropharynxkarzinomen erarbeitet. Die Ergebnisse der einzelnen Studien werden im Folgenden nacheinander diskutiert und in einem gemeinsamen Abschnitt zu Schlussfolgerungen und einem Ausblick (siehe Abschnitt 4.5) zusammengefasst.

### 4.1 TLM-Studie: Onkologische und funktionelle Langzeitergebnisse der transoralen Lasermikrochirurgie bei Oropharynxkarzinomen

Mit dem Ziel der Optimierung onkologischer Ergebnisse und der Funktion werden unterschiedliche Therapieverfahren und -Schemata zur Primärtherapie von OPSCCs entwickelt und potentieller Nutzen und Risiko untersucht. Insgesamt ist der Vergleich der Vielzahl möglicher Behandlungsstrategien jedoch durch das Fehlen randomisierter kontrollierter Studien erschwert (Culie et al. 2021). Weiterhin beeinträchtigen methodische Unterschiede wie beispielsweise differierende Einschlusskriterien, Endpunkte, Beobachtungszeiträume, statistische Methoden aber auch die Indikationsschwerpunkte der einzelnen Behandlungsmodalitäten eine Vergleichbarkeit bisher publizierter Studienergebnisse. Zur bestmöglichen Vergleichbarkeit der onkologischen Ergebnisse mit der Literatur (Tabelle 15) wurden die Fünf-Jahres-Überlebenszeiten für das Gesamtkollektiv, aber auch aufgeschlüsselt für die prognostischen Stadien und pT-Kategorien klassifiziert nach der siebten Edition der Algorithmen der UICC (Sobin et al. 2010) und AJCC (Edge und American Joint Committee on Cancer. 2010) dargestellt.

Patienten mit einem OPSCCs im Stadium I wiesen nach TLM in der Primärbehandlung (+ ND ± aR(C)T) ein krankheitsspezifisches Überleben von 92,8 % auf. Mit zunehmendem Stadium zeigte sich wie zu erwarten eine Verringerung des DSS bis auf 73,7 % für Stadium IVa der primär chirurgisch behandelten Patienten. Insgesamt waren die onkologischen Ergebnisse der TLM in der vorliegenden Studie mit anderen Untersuchungen vergleichbar (Dalton et al. 2020; Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009; Rogers et al. 2016). Dabei sollten die von Haughey et al. (2011) beschriebenen relativ hohen Überlebensraten (84 % DSS für Patienten mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium, III – IV) im Kontext des relativ hohen Anteils p16- und HPV-positiver OPSCCs interpretiert werden ( $\geq 81,9$  % p16-positiv,  $\geq 61,8$  % positiv in

einer HPV detektierenden In-situ-Hybridisierung (HPV-ISH)). Hier wurde bereits die prognostische Überlegenheit dieser Tumorentität diskutiert (Haughey et al. 2011). Gleiches gilt für die aktuelleren Daten von Dalton et al. (2020), die sich auf 65,5 % p16-positive/HPV-ISH-positive OPSCCs beziehen (Dalton et al. 2020).

#### 4.1.1 p16-Status

Die Unterscheidung p16-positiver und p16-negativer OPSCCs wurde erstmals in die achte Edition der Algorithmen der UICC/AJCC integriert und somit in die klinische Routine eingeführt (Kreimer et al. 2020; Lydiatt et al. 2017). Dies resultierte bisher jedoch nicht in abweichende Therapiestandards bzw. Behandlungsempfehlungen (Kreimer et al. 2020). Für Untersuchungen von Therapiestrategien und deren onkologischen Ergebnisse sollte der p16-Status daher heute Berücksichtigung finden. In der vorliegenden Arbeit wurde, nach unserem besten Wissen, das in der Literatur größte Kollektiv der primär TLM therapierten Oropharynxkarzinome beschrieben. Für die zwischen 1986 und 2015 therapierten Patienten konnte jedoch nicht lückenlos der p16-Status (nach)bestimmt werden. Folglich erfolgte eine Untergruppenanalyse, bei der von 125 der insgesamt 161 eingeschlossenen Patienten mit Resektionsdatum zwischen 2000 und 2015 der p16-Status des OPSCC ermittelt werden konnte. Die Ereigniszeitanalyse der Untergruppe mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium (III – IVa) ergab für Patienten mit p16-positiven Karzinomen ein signifikant überlegenes OS sowie entsprechende deutliche Trends für das DSS und RFS. Diese günstigere Prognose bei p16-positiven gegenüber p16-negativen OPSCCs stand im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, welche teilweise auch von der TLM-Studie abweichende chirurgische Therapiekonzepte für die Primärbehandlung von OPSCCs untersuchten (Tabelle 15) (Dalton et al. 2020; Haughey et al. 2011; Park YM et al. 2017; Rahmati et al. 2015; Rich et al. 2009). Für die Untergruppe mit p16-positiven Tumoren der vorliegenden Arbeit zeigten sich die onkologischen Ergebnisse vergleichbar mit Studien, die einem hohen Anteil p16-positiver OPSCCs beinhalteten (Dalton et al. 2020; Haughey et al. 2011; Moore et al. 2018; Rahmati et al. 2015; Rich et al. 2009; Sinha et al. 2017). Die Ergebnisse des TLM-Gesamtkollektivs waren mit Studien, die keine Angaben zum p16-Status machten vergleichbar (Grant et al. 2009; Karatzanis et al. 2012; Rahmati et al. 2015; Rogers et al. 2016). Zusammenfassend zeigt dies die Notwendigkeit auf, den p16-Status als eine prognostische Determinante beim Vergleich und der Interpretation unterschiedlicher Studienergebnisse zu berücksichtigen.

In Kollektiven aktuellerer Untersuchungen prädominieren Patienten mit p16-positiven OPSCCs (Tabelle 15) (Dalton et al. 2020; Dhanireddy et al. 2019; Haughey et al. 2011; Moore et al. 2018; Park YM et al. 2017; Rahmati et al. 2015; Rich et al. 2009). Demgegenüber existieren kaum Studien zu den onkologischen Langzeitergebnissen eines größeren Kollektivs von Patienten mit ausschließlich p16-negativen OPSCCs (Culie et al. 2021). Da in der TLM-Studie 56,0 % der OPSCCs mit bekanntem p16-Status keine p16-Überexpression

(daher p16-negativ) aufwiesen, war es möglich nicht nur gesonderte Ergebnisse für die Patientengruppe mit p16-positiven sondern auch für jene mit p16-negativen OPSCCs darzulegen. Basierend auf den vorliegenden Studien anderer Autoren präsentiert die TLM-Studie damit die onkologischen Ergebnisse des bis zum Zeitpunkt der Publikation der Ergebnisse der TLM-Studie größten in der Literatur verfügbaren Kollektivs p16-negativer OPSCCs, welche in einem einheitlich Chirurgie basierten Therapiekonzept mit kurativer Intention behandelt wurden.

#### 4.1.2 TORS

Die TLM hat sich in mehreren internationalen Zentren zu einer wichtigen minimal-invasiven Behandlungsmethode für Pharynxkarzinome etabliert, sodass in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen die Langzeitergebnisse dieser Modalität publiziert wurden (Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009; Rogers et al. 2016). Demgegenüber ist die TORS ein relativ neues minimal-invasives Verfahren, welches erst 2005 in die Kopf-Hals-Chirurgie Einzug fand und 2009 von der United States Food and Drug Administration für die Behandlung von pT1 – 2 klassifizierten OPSCCs zugelassen wurde (Golusinski und Golusinska-Kardach 2019). Bisher mangelt es insbesondere an der Beschreibung onkologischer und funktioneller Langzeitergebnisse (Golusinski und Golusinska-Kardach 2019), sodass sich das Verfahren weiterhin in der Etablierungs- und Entwicklungsphase befinden dürfte. Als Vorteile dieser Technik werden der 360°-Bewegungsbereich des Roboterarms, die Filtrierung eines Handtremors, die Erleichterung von En-bloc-Resektionen und die Möglichkeit der dreidimensionalen Inspektion der Operationsregion genannt (Golusinski und Golusinska-Kardach 2019). Letzteres verspricht vor allem Vorteile für die Behandlung der mittels TLM typischerweise schwierig zugänglichen und einseharen Zungengrundkarzinomen (Steiner et al. 2003). Dementsprechend zeigte eine Analyse von 314 Patienten mit Tonsillen- und Zungengrundtumoren, welche mit TORS + ND ± aR(C)T behandelt wurden, ein Fünf-Jahres-DSS von 94 % (Moore et al. 2018). Unter Berücksichtigung des Anteils von 86,9 % T1 – 2 und 91,1 % HPV/p16-positiver Karzinome dieses Kollektivs, erscheint das Ergebnis mit jenen einer TLM-basierten Therapie vergleichbar (Tabelle 15). In Bezug auf das perioperative Management und die funktionellen Ergebnisse einer TORS-basierten Behandlung wurde die Rate durchgeführter (temporärer) Tracheotomien und applizierter PEG-Sonden von der Arbeitsgruppe in einer früheren Arbeit mit 25,8 % und 27,3 % angegeben (Moore et al. 2012). Im Kontext des relativ geringen Anteils lokal fortgeschrittener OPSCCs in dieser gegenüber der vorliegenden TLM-Studie (pT3 – 4, 15,2 % vs. 49,7 %) erscheinen diese Anteile relativ hoch. Im Kollektiv der TLM-Studie mit 49,7 % Patienten mit lokal fortgeschrittenen OPSCCs (pT3 – 4) betrug der Anteil durchgeführter Tracheotomien 3,8 % und der PEG-Sonden 13,0 % im Gesamtkollektiv. Tracheotomien erfolgten dabei meist innerhalb der ersten dreißig Tage nach der initialen chirurgischen Therapie, vornehmlich im

Rahmen der Behandlung von Komplikationen; überwiegend Nachblutungen. Eine Kontextualisierung mit dem Anteil der Tracheotomien oder PEG-Sonden in aktuelleren Studien zur TORS-basierten Behandlung bei OPSCCs war nicht möglich, da deren Anteil nicht aufgeführt wurde (Dhanireddy et al. 2019; Moore et al. 2018; Park YM et al. 2017).

#### 4.1.3 Konventionelle Chirurgie und Möglichkeit zur plastischen Rekonstruktion

Neben minimal-invasiven transoralen Verfahren wie der TLM oder TORS, welche die größtmögliche Schonung des gesunden Gewebes erleichtern, besteht die Möglichkeit zur konventionell chirurgischen Resektion von OPSCCs. Zwar gibt es bei lokal weniger fortgeschrittenen, gut zugänglichen Tumoren hierbei ebenfalls die Möglichkeit einer transoralen Resektion durch die konventionelle laterale Oropharyngektomie (Laccourreye et al. 2005; Moncrieff et al. 2009), jedoch bedarf es häufig auch invasiverer offener transzervikaler Zugänge. Entsprechend erfordert ein konventionell chirurgisches Vorgehen mit weiter lokaler Exzision auch bei lokal begrenzten OPSCCs teilweise mitunter eine Lippenspaltung mit Mandibulotomie und bei resultierendem ausgedehnten Gewebedefekts gegebenenfalls eine folgende Rekonstruktion (Moncrieff et al. 2009). Eine Studie zur konventionell chirurgischen Vorgehensweise bei pT1 – 4 klassifizierten OPSCCs, die entweder über einen transoralen oder einen offenen Zugang mit Mandibulotomie oder Kompositresektion (Mandibulektomie) behandelt wurden, berichtete über 62,5 % Patienten, bei welchen sich der Tumorresektion eine Rekonstruktion mit einer Lappenplastik anschloss (Rahmati et al. 2015). Die onkologischen Ergebnisse dieser Studie waren mit jenen einer TLM-basierten Therapie vergleichbar (Tabelle 15). Die TLM bietet darüber hinaus ebenfalls die Möglichkeit bei ausgedehnten pharyngealen Defekten mit einer plastischen Rekonstruktion kombiniert zu werden. Hierbei finden unter anderem fasziokutane Gewebetransplantate, wie der freie mikrovaskulär anastomosierte radiale Unterarmlappen und der gestielte supraklavikuläre Insellappen Anwendung (Spiegel et al. 2019).

#### 4.1.4 primäre Radio(chemo)therapie

Neben der chirurgischen Therapie ist auch eine primäre Radio(chemo)therapie eine mögliche kurative Therapieoption für Patienten mit OPSCCs (Mendenhall et al. 2006a; Mendenhall et al. 2006b). Bei Tumorprogress, -persistenz kann, falls möglich, eine ergänzende *Salvage*-Operation erfolgen (Mehanna et al. 2016b). Bei Irresektabilität oder bei patientenkonstitutioneller Inoperabilität ist eine pR(C)T die einzige potentiell kurative Behandlungsstrategie. Eine multizentrische randomisierte Phase-III-Studie zur pR(C)T bei OPSCCs im Stadium III – IV zeigte signifikant bessere onkologische Ergebnisse bei konkomitanter Chemotherapie gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie ohne Systemtherapie (OS: 22 % vs. 16 %; lokoregionale Kontrolle: 48 % vs. 25 %) (Denis et al. 2004).

Neben onkologischen und funktionellen Langzeitergebnissen sind bei pR(C)T-basierten Therapiestrategien spezielle strahlenbedingte Langzeittoxizitäten zu berücksichtigen. In

Kollektiven eines Einschlusszeitraums zwischen 1964 und 2003 traten bei 9 – 16 % ausgeprägte Spät komplikationen auf. Diese umfassten Fistelung, Wunddehizensz, Osteoradionekrose, Weichgewebsnekrose, Chondronekrose mit Erfordernis einer kompletten Larynxentfernung sowie strahleninduziertes Sarkom mit Todesfolge (Mendenhall et al. 2006a; Mendenhall et al. 2006b). Eine randomisiert kontrollierte Studie berichtete demgegenüber über 1,2 – 2 % aufgetretene Grad 4 Toxizitäten nach den gemeinsamen Kriterien des National Cancer Institut und dem Schema zur Kategorisierung der späten Strahlenmorbidity der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (Denis et al. 2004). Bei der neueren und aktuell gängigen Technik der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) dürfte jedoch eine deutlich geringere Toxizität und damit eine bessere Therapieverträglichkeit der pRCT zu erwarten sein. Folglich stellen neuere Radiotherapieverfahren gegenüber den alten Radiotherapietechniken eine vermutlich bessere Therapiealternative zur chirurgischen Therapie dar. Die onkologischen Ergebnisse einer aktuellen Studie, die komparativ angelegt, chirurgische und IMRT-basierende Behandlungsstrategien gegenüberstellte, zeigten für sowohl frühe als auch spätere Stadien einen Vorteil bei chirurgischer Primärtherapie (Culie et al. 2021). Dennoch betonten auch hier die Autoren den Bedarf randomisiert kontrollierter Studien, um die Evidenz dieses Ergebnisses näher zu untersuchen (Culie et al. 2021). Eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen onkologischen Ergebnisse der pR(C)T ist gemeinsam mit jenen weiterer Therapieverfahren für OPSCCs in Tabelle 15 aufgeführt.

#### **4.1.5 Individualisierte Therapieempfehlungen und aR(C)T**

Alle Therapiestrategien, moderne Techniken, Medikamente und Schemata streben im Allgemeinen nach der zum Teil interdependenten Optimierung der onkologischen Sicherheit, Lebensqualität, Funktionserhaltung und Funktionswiderherstellung bei gleichzeitiger Morbidityreduktion. Zur Verbesserung sowohl onkologischer als auch funktioneller Ergebnisse hat sich daher heute die interdisziplinäre Erarbeitung personalisierter, multimodaler Therapiekonzepte unter Berücksichtigung individueller Tumor- und patientenassoziierter Faktoren zur Routine klinischer Praxis etabliert (Pfister et al. 2020). Die Durchführung einer aR(C)T wurde dabei insbesondere bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3 – 4) und/oder Lymphknotenmetastasen empfohlen ( $\geq$  pN2) (Bernier und Cooper 2005; Bernier et al. 2004; Moergel et al. 2009). Im Einklang hiermit erhielten im TLM-Kollektiv eine aR(C)T vorrangig Patienten, welche fortgeschrittene Lokaltumoren und/oder eine ausgedehnte Lymphknotenmetastasierung (N2a/b/c) und/oder histologische Risikofaktoren wie ECS aufwiesen. Dennoch umfasste das Kollektiv auch eine relativ große Gruppe mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium, bei denen entgegen den aktuellen Empfehlungen auf die Durchführung einer aR(C)T verzichtet wurde. Da eine derartige Patientengruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit in zukünftigen Studienkollektiven nicht mehr präsent sein wird, ermöglichten diese Daten die wahrscheinlich beste Gelegenheit eines

direkten Vergleichs onkologischer Langzeitergebnisse eines primär chirurgischen Therapiekonzepts bei fortgeschritten OPSCCs mit versus ohne aR(C)T im Therapiekonzept. Von insgesamt 290 Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, zeigte jene Untergruppe, die eine aR(C)T erhalten hatte, eine signifikant überlegenes RFS wie auch eine höhere LCR. Dies ist im Einklang mit der Arbeit von Haughey et al. (2011), in welcher eine aR(C)T nach TLM-basierter Tumorthherapie gegenüber einer Therapie ohne postoperative Bestrahlung mit einer Reduktion des Sterbe- und Rezidivrisiko um  $\geq 50\%$  assoziiert war (Haughey et al. 2011). Auch bei Hypopharynxkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium waren die RFS und LCR der Patienten mit aR(C)T günstiger (Weiss et al. 2017). Insgesamt deuten die Ergebnisse der hier dargestellten TLM-Studie und der vorliegenden Literatur die Durchführung einer aR(C)T als eine onkologisch sinnvolle und effektive Komponente der Therapie von HNSCCs fortgeschrittener Erkrankungsstadien hin. Damit bekräftigen sie heute gängige Indikationskriterien und Therapieempfehlungen.

#### **4.1.6 Komplikationen, postoperatives Management und funktionelle Ergebnisse**

Die Reduktion der, mit der konventionellen offenen Chirurgie potentiell einhergehenden, Morbidität ist eines der Ziele der TLM (Golusinski und Golusinska-Kardach 2019). Eine relativ niedrige Komplikationsrate wird als einer der Vorteile der TLM erachtet (Bernal-Sprekelsen et al. 2009; Dalton et al. 2020). Im Einklang mit der beschriebenen Assoziation zwischen Tumorausdehnung und Komplikationsrate (Bernal-Sprekelsen et al. 2009), traten im Kollektiv der TLM-Studie 65,9 % der Komplikationen bei Patienten mit einem pT3 – 4 Tumor auf. Meist handelte es sich um postoperative Hämorrhagien. Die relative Häufigkeit von 11,4 % ist dabei vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien, die ein TLM-basiertes Behandlungskonzept für OPSCCs untersuchten und eine Rate von 3,6 – 11,1 % aufgetretener postoperativer Hämorrhagien beschreiben (Dalton et al. 2020; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009). Im Einklang mit der Literatur erfolgte auch vorliegend beschriebenen Kollektiv die Behandlung vorrangig mittels transoraler Elektrokauterisation oder Clipping (Karatzanis et al. 2012).

Die Maximierung des Funktionserhalts ist eine wichtige Determinante bei der Etablierung einer geeigneten Therapiestrategie. Trotz des überwiegenden Anteils von Patienten mit OPSCCs im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (III – IVa 78,8 %) erzielte die TLM-basierte Primärtherapie auch in der vorliegenden Arbeit bezogen auf die funktionellen Ergebnisse vergleichbar gute Resultate wie andere Studien zur TLM darstellten (Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011). Als Indikator für die postoperative Schluckfunktion wurde in Anlehnung an andere Arbeiten die Rate applizierter PEG-Sonden herangezogen (Dalton et al. 2020; Haughey et al. 2011; Rich et al. 2009). Bei 6,5 % der Patienten des TLM-Kollektivs bedurfte es einer permanenten, bei weiteren 6,5 % einer passageren Ernährung über eine PEG-Sonde. Die Anlage erfolgte dabei überwiegend postoperativ und daher am ehesten reaktiv. Demgegenüber beschrieben Arbeiten zur pR(C)T von OPSCCs eine am ehesten

bereits in Anbetracht der möglichen Akuttoxizität prophylaktische PEG-Sonden-Anlage (Setton et al. 2015; Yao et al. 2006). Vorrangig bei älteren Patienten, langjährigerem Tabakkonsum und ausgedehnteren Tumoren kam es dabei zu einem längeren Bedarf dieser Ernährungsunterstützung (Setton et al. 2015; Yao et al. 2006).

#### **4.1.7 Limitationen und Stärken der TLM-Studie**

Limitationen der TLM-Studie umfassen vorrangig das retrospektive Design. Darüber hinaus bestand aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines vergleichbar großen, gut charakterisierten Patientenkollektivs nicht die Möglichkeit des direkten Vergleichs mit anderen Therapieoptionen, wie beispielsweise einer pR(C)T.

Die Stärke dieser Studie sind die Ergebnisse eines sehr gut charakterisierten und bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung auch des größten in der Literatur verfügbaren Kollektivs in einem TLM-basierten Konzept behandelter OPSCCs (Dalton et al. 2020; Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009; Rogers et al. 2016). Durch die differenzierte Präsentation von Ergebnissen zu einheitlich p16-positiven aber auch gut charakterisierten p16-negativen OPSCCs wurde die aktuell diskutierte Bedeutung des p16-Status auf die Prognose adressiert. Darüber hinaus unterstreichen die Ergebnisse zur aR(C)T durch eine direkte Gegenüberstellung von Patienten mit fortgeschrittenen OPSCCs mit oder ohne diese zusätzliche Behandlung die Empfehlung aktueller Leitlinien. Die Kontroverse zur Indikation der adjuvanten Radiotherapie bei pT1 – 2 pN1 HNSCCs wurde in einer Folgestudie (pN1-Studie der vorliegenden Arbeit) adressiert (Weiss et al. 2020b).

## 4.2 pN1-Studie: Nutzen der adjuvanten Radio(chemo)therapie bei lokal begrenzten Kopf-Hals-Karzinomen mit singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastase

In der TLM-Studie wurde der Stellenwert der aR(C)T für OPSCCs im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Stadium III – IVa) oder mit fortgeschrittenem Primärtumor (pT3 – 4) dargestellt. Hieraus, wie auch aus der klinischen Routine resultierte die Frage, ob auch Patienten mit einem lokal begrenzten Primärtumor mit lediglich einer einzigen, auf den Lymphknoten beschränkten Metastase (pT1 – 2 pN1 ECS-negativ) von einer aR(C)T profitieren. Entgegen den etablierten Empfehlungen zur aR(C)T wie ECS und/oder ausgedehnter Lymphknotenmetastasierung (Bernier und Cooper 2005; Bernier et al. 2004; Quon et al. 2017), unterliegt die Empfehlung bei diesen HNSCCs bis heute Diskussionen (Koyfman et al. 2019; Moergel et al. 2009). Lediglich eine begrenzte Anzahl ausschließlich retrospektiver Studien stellt aktuell Daten zu dieser Thematik zur Verfügung (Barry et al. 2017; Chen MM et al. 2016; Chen TC et al. 2010; Jackel et al. 2008; Kadletz et al. 2018; Shrime et al. 2010). Die Ergebnisse einer prospektiv randomisierten multizentrischen klinischen Studie bleiben hingegen weiter abzuwarten (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00964977) (Moergel et al. 2009). Hierbei blieb die Rekrutierung jedoch mit < 10 % weit hinter dem Randomisierungsziel von 600 Patienten zurück (persönliche Information). Ein Grund hierfür kann die Seltenheit der beschriebenen Krankheitskonstellation (pT1 – 2 pN1 ECS-negativ) darstellen, welche sich auch in der vorliegenden pN1-Studie zeigte. Von 807 Patienten mit einem OSCCs, OPSCCs oder HPSCCs, die zwischen 08/1986 und 10/2015 mittels TLM behandelt wurden, wiesen 8,1 % pT1 – 2 pN1 ECS-negative HNSCCs auf. Die Verteilung von etwa einem gegenüber zwei Dritteln an Patienten, die mittels aR(C)T im primären Therapiekonzept behandelt wurden, ermöglichte eine direkte Gegenüberstellung der onkologischen Langzeitergebnisse beider Behandlungsgruppen.

### 4.2.1 Onkologische Ergebnisse

Patienten, die eine aR(C)T erhalten hatten, zeigten signifikant bessere onkologische Ergebnisse für das DSS, RFS und die LCR. Das OS der Gruppe mit aR(C)T war mit 71,4 % OS ebenfalls höher als bei den Patienten mit allein chirurgischer Therapie (62,6 %), wenngleich nicht statistisch signifikant. In diesem Kontext ist auf den interkurrent oder im Kontext einer zweiten malignen Erkrankung eingetretenen Tod von 40 % der Patienten hinzuweisen. Diese Patienten starben während der Nachbeobachtungszeit ohne Assoziation zum Indextumor. Weiterhin dürfte die relativ niedrige Fallzahl der untersuchten Krankheitskonstellation der einzelnen Institution in einer Limitierung der statistischen Trennschärfe resultiert haben. Größere Kollektive, die aus der Surveillance, Epidemiology, and End Results Database (Shrime et al. 2010) oder der National Cancer Database (Chen MM et al. 2016) hervorgingen, konnten eine signifikante Überlegenheit des OS von Patienten mit einer aR(C)T darstellen. Trotz geringerer Fallzahl berichteten auch Chen et al. (2010)



über ein signifikant höheres OS von 20 mit gegenüber 19 ohne aR(C)T behandelten Patienten, welche mit pT1 – 2 pN1 ECS-negativen Zungen-SCCs diagnostiziert wurden (Chen TC et al. 2010). Auch in Bezug auf das DSS demonstrierte die pN1-Studie mit zuvor genannten Arbeiten konsistente Ergebnisse (Chen TC et al. 2010; Shrime et al. 2010). Die Studie über die Ergebnisse der National Cancer Database stellte keine Daten zum DSS zur Verfügung (Chen MM et al. 2016). Die vorliegende pN1-Studie zeigte zudem ein signifikant überlegenes RFS von Patienten mit aR(C)T. Bisher liegt lediglich eine weitere Studie vor, welche in Bezug auf diese Fragestellung diesen Endpunkt untersuchte. Diese fokussierte selektiv auf pT1-Karzinome des Oropharynx und berichtete konsistent mit der vorliegenden pN1-Studie über eine signifikante Überlegenheit im RFS von Patienten mit aR(C)T (Kadletz et al. 2018). Keine der bisher in der Literatur zur Verfügung stehenden Studien hatte die LCR als Endpunkt, die sich in der vorliegenden Untersuchung in der Gruppe mit adjuvanter Therapie ebenfalls als signifikant überlegen bei Patienten mit aR(C)T zeigte.

Zusammengefasst zeigt die pN1-Studie wie auch die bisher publizierten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen eine Überlegenheit in den onkologischen Endpunkten bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten HNSCCs mit aR(C)T im initialen Therapiekonzept. Da eine aR(C)T bei Vorliegen von ECS mehrfach empfohlen wurde (Adelstein D et al. 2017; Pfister et al. 2020; Quon et al. 2017), umfasst das Kollektiv der pN1-Studie selektiv Patienten mit einer ECS-negativen pN1-Lymphknotenmetastase. Demgegenüber war ein solcher Fokus in der Arbeit von Shrime et al. (2010) aufgrund fehlender Angaben zum ECS in der, von dieser Arbeitsgruppe analysierten Datenbank, nicht möglich. Dies könnte eine größere Heterogenität innerhalb ihrer Primärdaten und Reduktion der externen Validität ihrer Resultate bedingt haben (Shrime et al. 2010).

Für Fälle mit ECS und/oder mikroskopisch positiven Resektionsrändern existiert für die Durchführung einer konkomitanten platinbasierten Chemotherapie ergänzend zur Radiatio Evidenz der Stufe I (Bernier et al. 2004; Cooper et al. 2004). Mit der Intention einer Radiosensibilisierung wurde die Indikation zu dieser ergänzenden Systemtherapie in der Universitätsmedizin Göttingen großzügig gestellt und teilweise auch beim Fehlen der genannten ungünstigen Faktoren appliziert. Die geringe Fallzahl und die daraus resultierende Limitierung der statistischen Trennschärfe dürfte wie auch in der TLM-Studie den fehlenden Nachweis eines signifikanten prognostischer Unterschieds zwischen Patienten mit oder ohne konkomitanter Chemotherapie innerhalb der Behandlungsgruppe mit adjuvanter Therapie mitbedingt haben.

#### 4.2.2 Untergruppenanalysen

Um die potentielle Relevanz der lokalen Tumorausdehnung herauszuarbeiten, erfolgte eine separate Analyse von Patienten mit pT1- respektive pT2-klassifizierten Karzinomen. Für alle Endpunkte zeigten sich höhere Schätzungen für die Gruppe mit durchgeführter aR(C)T. Für das RFS waren die Unterschiede sowohl in der pT1- als auch pT2-Untergruppe statistisch

signifikant. Dies steht im Einklang mit Kadletz et al. (Kadletz et al. 2018) und deutet auf eine in Bezug auf die onkologischen Ergebnisse Nutzen bringende Therapieergänzung einer aR(C)T unabhängig von der lokalen Tumorausdehnung bei einer singulären ipsilateralen Lymphknotenmetastase ohne ECS bei lokal begrenzten HNSCCs hin. In anderen Arbeiten war eine signifikante Überlegenheit des OS und DSS lediglich bei pT2 klassifizierten HNSCCs aufgezeigt worden, wohingegen sich in der pT1-Untergruppe dies nicht bestätigt hatte (Chen MM et al. 2016; Shrime et al. 2010).

In Bezug auf die unterschiedlichen Hauptlokalisationen von HNSCCs fokussierten sich bisherige Studien entweder selektiv auf Patienten mit OSCCs (Barry et al. 2017; Chen MM et al. 2016; Chen TC et al. 2010; Shrime et al. 2010) und/oder OPSCCs (Chen MM et al. 2016; Kadletz et al. 2018). In das Studienkollektiv der pN1-Studie wurden sowohl Patienten mit OSCCs, OPSCCs oder HPSCCs eingeschlossen. Die gemeinsamen und nach Hauptlokalisationen separierten Analysen ergaben vergleichbare Resultate, sodass der Nutzen einer aR(C)T auch als unabhängig von der Hauptlokalisation des Primärtumors angesehen werden kann.

Ein positiver p16/HPV-Status wurde bei OPSCCs mehrfach als prognostisch günstiger beschrieben (Ang et al. 2010; Kreimer et al. 2020). Während des Einschlusszeitraum zwischen 08/1986 und 10/2015 war weder die Evaluation des p16- noch des HPV-Status Teil der pathologischen Routinediagnostik bei OPSCCs. Daher erfolgte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung bei Verfügbarkeit von entsprechendem Gewebe und nicht bereits vorliegendem Ergebnis, nachträglich eine p16-Immunhistochemie zur Evaluation des p16-Status. Die Gruppe mit oder ohne aR(C)T im Therapiekonzept zeigten eine vergleichbare Verteilung des p16-Status, sodass dem dargestellten Unterschied in den onkologischen Ergebnissen am ehesten nicht Folge einer unausgeglichene Verteilung p16-positiver Tumore zugrunde lag. Aufgrund der geringen Fallzahl mit vorliegendem p16-Status erfolgte keine weitere, nach Behandlungsgruppen stratifizierte Ereigniszeitanalyse. Bisher wurde die potentielle Bedeutung des p16-Status im Kontext der Durchführung einer aR(C)T bei pT1 pN1 und pT2 pN0 ECS-negativen OPSCCs, wenn überhaupt, indirekt von einer der vorliegenden Studien aufgegriffen (Kadletz et al. 2018). Die Studie umfasste 81 Patienten mit pT1 pN1 oder pT2 pN0 klassifizierten OPSCCs und wurde somit unter Einschluss von Karzinomen ohne Lymphknotenmetastase sowie unter Ausschluss von Patienten mit pT2 pN1 klassifizierten OPSCCs durchgeführt. Es zeigte sich für p16-negative OPSCCs (30,3 % davon pT1 pN1) eine signifikant verbessertes RFS. Da in der Studie jedoch eine separate Darstellung der Ergebnisse der pT1 pN1-Untergruppe fehlt (Kadletz et al. 2018), bleibt die potentiell prognostische Relevanz des p16/HPV-Status auch hier letztlich offen und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### 4.2.3 Limitationen und Stärken der pN1-Studie

Eine Limitierung der pN1-Studie ist aufgrund mangelnder Datenverfügbarkeit die fehlende Adressierung therapieassoziierter Nebenwirkungen und der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Diese Aspekte sollten, wie auch der Stellenwert des p16-/HPV-Status in zukünftige Studienkonzepte integriert werden. Ferner muss auch in der pN1-Studie das Risiko statistischer Verzerrungen (*Bias*) aufgrund des retrospektiven Studiendesigns berücksichtigt werden. Um mögliche Störvariablen zu minimieren, erfolgte auch in der pN1-Studie die Kollektivdefinition entsprechend strenger Kriterien und die Datenpräsentation detailliert und basierend auf Angaben aus einem prospektiv geführten klinischen Tumorregister, den zur Verfügung stehenden Patientenakten und pathologischen Berichten. Dies ermöglichte nicht nur eine umfangreiche Untersuchung von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika sowie Nachsorgedaten, sondern auch die Bereitstellung detaillierter onkologischer Langzeitergebnisse. Diese Daten könnten zukünftig im Rahmen evidenzbasierter Behandlungsempfehlungen sowie zur Bearbeitung weiterer Fragestellungen genutzt werden. Die Bedeutung der pN1-Studie wird dabei durch das Fehlen detaillierter Daten mit hoher Evidenz für eine aR(C)T bei Patienten mit der seltenen Krankheitskonstellation pT1 – 2 pN1 ECS-negativer R0-resezierter HNSCCs mitbegründet. Lediglich fünf retrospektive Studien stellten diesbezüglich bisher onkologische Langzeitdaten für den klinischen und wissenschaftlichen Diskurs zur Verfügung und bildeten daher bis zur Publikation der Ergebnisse der pN1-Studie die höchste Evidenzbasis einer medizinischen Entscheidungsfindung (Chen MM et al. 2016; Chen TC et al. 2010; Jackel et al. 2008; Kadletz et al. 2018; Shrimel et al. 2010).

### **4.3 p16-HPV-Studie: Stellenwert des p16-Status und HPV-DNA-Nachweis als prognostische Biomarker bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen**

In der TLM-Studie wurde die prognostische Bedeutung des p16-Status bei fortgeschrittenen OPSCCs dargestellt. p16-positive Plattenepithelkarzinome gingen mit einem signifikant verbesserten OS und jeweils einem Trend zu einem überlegenen DSS und RFS einher (Abschnitt 3.1.6). Der p16-Status wurde hier als Surrogatmarker für eine HPV-assoziierte Erkrankung angesehen. Aus den Untersuchungen resultierte die Frage nach der prognostischen Bedeutung des Nachweises von HPV-DNA (HPV-Status) und den verschiedenen Konstellationen, die sich aus p16- und HPV-Status ergeben. In der p16-HPV-Studie wurden dazu die onkologischen Langzeitresultate von 102 Patienten mit OPSCCs im Stadium III – IVa im Kontext des p16- und HPV-Status sowie beider Marker in Kombination untersucht. Der Einschlusszeitraum umfasste die Jahre 2000 – 2015. Die beobachteten demographischen (Abschnitt 1.1.1), molekularen (Abschnitt 1.1.2), klinischen (Abschnitt 1.1.3) und prognostischen (Abschnitt 1.1.6) Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und nicht HPV-assoziierten OPSCCs bekräftigten die zunehmende Anerkennung als zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten (Ang et al. 2010; Gillison et al. 2000; Kreimer et al. 2020; Syrjanen et al. 1982). Seit der Einführung in die 2017 publizierte Klassifikationsalgorithmen der achten Edition der AJCC/UICC wurde der als Surrogatmarker für HPV-assoziierte Tumoren etablierte p16-Status in der klinischen Routinediagnostik bei OPSCCs gefordert (Amin et al. 2017; Brierley et al. 2017; Fakhry et al. 2018; Kreimer et al. 2020; Lewis et al. 2018). Klinische Studien haben bereits Ergebnisse zu Therapiemodifikationen bei "HPV-assoziierten" OPSCCs publiziert (Gillison et al. 2019; Mehanna et al. 2019). Dennoch sind daraus bisher keine abweichenden Standardtherapieempfehlungen hervorgegangen (Mehanna et al. 2020). Folglich sind Therapieempfehlungen basierend auf dem p16- und/oder HPV-Status außerhalb klinischer Studien aktuell noch nicht empfohlen (Adelstein DJ et al. 2019; Kreimer et al. 2020; Pfister et al. 2020).

#### **4.3.1 p16- und HPV-Status**

Eine Problematik bei der kollektiven Interpretation unterschiedlicher Forschungsarbeiten stellen insbesondere die teilweise heterogenen Definitionen einer „HPV-Assoziation“ dar (Jordan et al. 2012; Lewis et al. 2018). Beispielsweise wurde in der RTOG 1016-Studie, welche die Kombination einer Strahlentherapie mit dem therapeutischen Antikörper Cetuximab oder dem Standardchemotherapeutikum Cisplatin bei HPV-positiven OPSCCs adressierte, die HPV-Assoziation mit immunhistochemischen Nachweis von p16 festgelegt (Gillison et al. 2019). Eine andere Arbeitsgruppe definierte als „HPV-positiv“ hingegen lediglich Tumoren mit positivem HPV-DNA- und HPV-RNA-Nachweis (Hoffmann et al. 2018). In weiteren Studien wurde eine stufenweise Diagnostik zur Festlegung des HPV-Status gewählt. Diese umfasste zunächst eine p16-Immunhistochemie und nur bei

positivem p16-Status anschließend eine HPV-DNA-PCR, wohingegen p16-negative OPSCCs nicht weiter hinsichtlich einer HPV-Infektion untersucht wurden (Nauta et al. 2018; Rietbergen et al. 2013). Weiterhin wird auch der Nachweis einer p16-Überexpression als Surrogatmarker zur Detektion einer onkogenen HPV-Infektion angesehen (Ang et al. 2010; Fakhry et al. 2018; Jordan et al. 2012; Lewis et al. 2018; Quabius et al. 2015; Yamashita et al. 2019).

In dieser Arbeit erfolgte die Festlegung des p16-Status unter Einbeziehung von Kriterien, welche zur Anwendung der achten Auflage der Algorithmen der UICC/AJCC vorgeschlagen (Lydiatt et al. 2017), im Rahmen der Praxisleitlinie des College of American Pathologists empfohlen (Lewis et al. 2018) und von der American Society of Clinical Oncology (ASCO) befürwortet wurden (Fakhry et al. 2018).

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich trotz überwiegender Übereinstimmung des p16- und HPV-Status (64 % p16-positiv/HPV-positiv oder p16-negativ/HPV-negativ) bei mehr als einem Drittel der OPSCCs (36 %) diskordante Ergebnisse, die sich als p16-positiv/HPV-negativ oder p16-negativ/HPV-positiv darstellten. Auch in der Literatur finden sich Diskordanzraten von 12,7 % und 45 % (Hoffmann et al. 2018; Liu et al. 2016). Mögliche Gründe für die teils divergierenden Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. In der vorliegenden Studie erfolgte der HPV-Nachweis und die HPV-Typisierung im Multiplex-PCR-Verfahren mithilfe eines für diagnostische Zwecke entwickelten kommerziellen Reaktionskomplettsystems. Für dieses wurde eine Sensitivität von 97,5 % und eine Spezifität von 93 % beschrieben (Canadas et al. 2012). Zusätzlich zur Möglichkeit falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse im Rahmen der HPV-Diagnostik, existieren multiple weitere Möglichkeiten, welche mit der Diskordanz im Zusammenhang stehen könnten. Zum Beispiel wiesen in Arbeiten anderer Autoren p16-negative OPSCCs mit einem positiven HPV-Status geringe Mengen an HPV-DNA auf (Klussmann et al. 2003; Yamashita et al. 2019). Demzufolge wäre eine indirekte Differenzierung HPV-positiver Proben mit divergierenden Mengen viraler DNA basierend auf einem unterschiedlichen p16-Status plausibel (HPV-positiv/p16-positiv: hohe Viruslast; HPV-positiv/p16-negativ: geringe Viruslast). Ferner ist auf die im Rahmen der vorliegenden Studie verwendeten PCR mit Primer zur Detektion der E6- und E7-Loci von HPV hinzuweisen. Während es bei der Integration des Virus häufig zu Deletionen im offenen Leserahmen des E2-Locus kommt, bleiben jene dieser Loci sehr wahrscheinlich auch nach der Integration des HPV-Virus in das Wirtsgenom erhalten (Canadas et al. 2012; Peitsaro et al. 2002). Somit wurden durch das im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführte PCR-Verfahren wahrscheinlich HPV-Infektionen im episomalen als auch jene im integrierten und gemischten (episomal/integrierten) Status detektiert und daher als „HPV-positiv“ klassifiziert. Yamashita et al. (2019) untersuchten unterschiedliche Zustände von HPV16-Infektionen und beschrieben eine divergierende Rate von HPV im integrierten/gemischten gegenüber jenen im episomalen Status innerhalb p16-positiver und p16-negativer OPSCCs. In nahezu allen p16-

positiven OPSCCs lag HPV vollständig integriert oder gemischt vor, während bei 55,5 % der p16-negativen OPSCCs eine episodale HPV-Infektion nachgewiesen wurde (Yamashita et al. 2019). Dies weist auf eine indirekte Differenzierung episodaler gegenüber integrierter/gemischter HPV-Infektion basierend auf dem p16-Status hin. Daher könnten p16-negative/HPV-positive OPSCCs solche mit einer episodalen HPV-Infektion und p16-positive/HPV-positive jene mit einer Infektion im integrierten Status darstellen. Weitere potentielle Ätiologien einer fehlenden Akkumulation von p16 bei positivem HPV-Status (p16-negativ/HPV-positiv) stellen beispielsweise eine Promotor-Hypermethylierung (Nuovo et al. 1999) sowie Deletionen des p16 codierenden Gens *CDK2NA* (Licitra et al. 2006) da.

Auch die gegenteilige p16-Überexpression bei negativem HPV-Status (p16-positiv/HPV-negativ) könnte teilweise auf genetische Alterationen des *CDK2NA*-Gens zurückgeführt werden (Lechner et al. 2018). Jedoch dürften weder ausschließlich Mutationen des *CDK2NA*-Gens noch Veränderungen des *RB1*-Gens oder Veränderungen von Genen anderer Akteure des G1/S-Zellzyklus-Restriktionspunkts die p16-Überexpression in HPV-negativen Tumoren erklären (Lechner et al. 2018). Im Einklang damit wurde trotz des Vorliegens als Wildtyp *CDK2NA* in HPV-negativen HNSCCs verstärkt exprimiert, wenn die Tumoren eine inaktivierende Mutation des Histon-H3-Lysin-36-Methyltransferase Gens *NDS1* aufwiesen (Lechner et al. 2018). Somit könnten *NSD1*-Mutationen die Toleranz einer Überexpression des eigentlich tumorsuppressiven p16-Proteins in HPV-negativen HNSCCs mitbedingen (Lechner et al. 2018), welche in HPV-positiven Tumorzellen vor allem auf die Expression des Onkoproteins E7 zurückgeführt wurde (McLaughlin-Drubin et al. 2013). Eine veränderte Expression des *NSD1*-Gens stellt damit einen weiteren potentiellen Ansatzpunkt (Lechner et al. 2018) bei weiteren notwendigen Untersuchungen zur genaueren Ätiologie und Relevanz insbesondere der diskordanten Untergruppen da.

### 4.3.2 Onkologische Ergebnisse

#### 4.3.2.1 p16- oder HPV-Status als selektive prognostische Marker

In der TLM-Studie wurde bereits die prognostische Relevanz einer p16-Überexpression bei Patienten mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium untersucht und die prognostische Überlegenheit dargestellt (Weiss et al. 2019b). In der p16-HPV-Studie wurde zudem untersucht, ob auch der Nachweis von HPV-DNA selbst als Einzelmarker und/oder in Kombination mit dem p16-Status eine Option zur prognostischen Stratifizierung dieser Patienten darstellen könnte. Für den HPV-Status ergaben sich sowohl das OS, DSS, RFS und die LCR keine signifikant diskrepanten Unterschiede zwischen Patienten mit OPSCCs mit positiven gegenüber jenen mit OPSCCs negativem HPV-Status. Im Einklang damit demonstrierten mehrere Studien, die sich ebenfalls auf Patienten mit OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium fokussierten, eine Assoziation zwischen der Prognose und dem p16-Status, nicht aber zwischen dieser und dem HPV-Status (Park K et al. 2013; Rich et al. 2009).

Unter Einschluss nicht fernmetastasierter OPSCCs jeglicher Stadien beschrieben Yamashita et al. (2019) zumindest einen Trend zu einem höheren OS bei Patienten mit HPV-positiven gegenüber jenen mit HPV-negativen OPSCCs (Yamashita et al. 2019). In einer anderen Studie wurde hingegen über ein signifikant überlegenes OS sowie einen Trend zu einem besseren PFS von Patienten mit HPV-DNA-positiven gegenüber jenen mit HPV-DNA-negativen Karzinomen berichtet (Hoffmann et al. 2018). Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste dabei ausschließlich OPSCCs der Tonsille. Trotz fehlender Angabe zur Stadienverteilung legt die Publikation den Einschluss von 57,1 % lokal umschriebener Tumore (T1 – 2) sowie von 30,2 % OPSCCs ohne regionale Metastasierung (N0) offen (Hoffmann et al. 2018). Unter weiterer Berücksichtigung des HPV-RNA Status sowie nach Stratifizierung des Kollektivs entsprechend divergierender Therapiekomponenten zeigte sich in dieser Studie jedoch eine signifikante Überlegenheit des OS bei HPV-RNA- sowie HPV-DNA-positiver (in dieser Studie „HPV-positiv“) gegenüber „HPV-negativer“ (nicht-HPV-DNA/ RNA-positiver) Erkrankung nur innerhalb der Gruppen mit alleiniger Operation oder zusätzlicher aRCT. Hingegen wurde in der Patientengruppe, die eine operative Therapie mit adjuvanter Radiotherapie ohne Chemotherapie erhalten hatte, kein solcher prognostischer Unterschied im OS nachgewiesen (Hoffmann et al. 2018).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse von Park et al. (2013) (Park K et al. 2013) sowie der vorliegenden p16-HPV-Studie in Bezug auf OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium auf eine begrenzte prognostische Aussagekraft des alleinigen Nachweises von HPV-DNA hin (Park K et al. 2013).

Darüber hinaus existieren zahlreiche weitere, zum Teil interdependente Variablen, welche die beispielhaft beschriebene Heterogenität der Ergebnisse der prognostischen Bedeutung des alleinigen HPV-Nachweises und letztlich eine limitierte Vergleichbarkeit der Studienergebnisse mitbedingt haben könnten. Als potentielle methodische Einflussfaktoren sind in diesem Kontext neben der Diskrepanz der HPV-Nachweismethoden und der Definition der "HPV-Positivität" auch die Distribution der HPV-Genotypen zu nennen. Dahingehend berichten Studien beispielsweise über ein höheres OS HPV16-positiver gegenüber Nicht-HPV16-HPV-positiven HNSCCs (Bratman et al. 2016; Mazul et al. 2016). Weiterhin waren in Bezug auf spezielle Genotypen Tonsillenkarzinome mit einer HPV18-Infektion mit einer schlechteren Prognose als HPV16-positive und HPV-negative Karzinome assoziiert (No et al. 2015). Unabhängig von der Tumorlokalisation scheint auch eine HPV33-Infektion bei HNSCCs mit einem schlechteren OS als eine HPV16-Infektion einherzugehen (Chatfield-Reed et al. 2020). Der in manchen Studien gefundene prognostische Vorteil einer HPV-Infektion sollte somit nicht potentiell als eine generelle Überlegenheit bei positivem HPV-Nachweis missinterpretiert werden. Vielmehr weisen die genannten Studien auf eine selektive prognostische Überlegenheit des in zahlreichen Kollektiven prädominierenden Genotypen HPV16 hin und mahnen somit zu einer differentiellen Betrachtung (Bratman et al. 2016; Chatfield-Reed et al. 2020; Mazul et al. 2016;

No et al. 2015). Im Kontext der p16-HPV-Studie könnte der Anteil von 43,9 % Nicht-HPV16-Genotypen (inklusive Koinfektionen) somit auch die beschriebenen Differenzen der prognostischen Aussagekraft des HPV-Nachweises mitbedingt haben. Aufgrund von lediglich acht OPSCCs mit Infektionen mit selektiv Nicht-HPV16-Genotypen wurde in der p16-HPV-Studie diese Thematik jedoch nicht weiter analysiert. Darüber hinaus könnten jedoch auch Abweichungen in der Kollektivzusammensetzung (beispielsweise Verteilung prognostischer Stadien, Tabak- und Alkoholkonsum) mit der teilweise heterogen beschriebenen prognostischen Bedeutung des alleinigen HPV-Nachweises im Zusammenhang stehen.

#### 4.3.2.2 p16- und HPV-Status als kombinierter prognostischer Marker

Frühere Studien legen die Charakterisierung weiterer Prognosegruppen durch die Kombination des p16- und HPV-Status bei Patienten mit OPSCCs nahe (Albers et al. 2017; Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Park K et al. 2013; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019). Die wissenschaftliche Evidenz zu onkologischen Langzeitergebnissen der einzelnen Untergruppen bleibt jedoch spärlich (Albers et al. 2017; Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Park K et al. 2013; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019). Zwar inkludierte eine Metaanalyse zu diesem Thema 24 Studien, welche die Prognose bei HNSCCs unter Berücksichtigung des p16- und HPV-Status analysierten (Albers et al. 2017), jedoch wiesen diese aufgrund der im Folgenden genannten Punkte eine limitierte Vergleichbarkeit zur vorliegenden p16-HPV-Studie auf. Lediglich 13 Studien fokussierten sich selektiv auf OPSCCs. Von diesen gaben wiederum lediglich zwei Studien Fünf-Jahres Ergebnisse prognostischer Ereigniszeitanalysen von Kollektiven an, die ausschließlich in kurativer Intention therapierte Patienten ohne Indizien einer Fernmetastasierung umfassten (Park K et al. 2013; Rietbergen et al. 2013). Beide Studien stellten dabei jedoch keine detaillierten prognostischen Endpunktschätzungen für alle vier möglichen Konstellationen des p16- und HPV-Status zur Verfügung (Park K et al. 2013; Rietbergen et al. 2013). Nichtsdestotrotz adressierten weitere vier aktueller publizierte Studien dieses Thema (Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019). Studien, die bei in kurativer Intention therapierten, nicht fernmetastasierten OPSCCs eine prognostische Substratifizierung unter Berücksichtigung verschiedener Konstellationen des p16- und HPV-Status untersuchten und die Fünf-Jahres Schätzungen prognostischer Endpunkte angeben, sind in Tabelle 23 dargestellt.

Die Stratifizierung bei p16-positiven OPSCCs ergab in der vorliegenden p16-HPV-Studie zwischen jenen mit positiven oder negativem HPV-Status keine signifikanten Unterschiede in den onkologischen Endpunktanalysen (OS, DSS, RFS, LCR). Dies indiziert bei p16-positiven OPSCCs keine Möglichkeit einer weiteren prognostischen Stratifizierung basierend auf dem Nachweis von HPV-DNA allein. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Yamamoto et al. (2019) für Patienten, die mit einer pRCT behandelt wurden. Dennoch wird



in dieser Studie für die Gruppe mit alleiniger pRT ohne Chemotherapie über ein signifikant überlegenes OS und PFS bei p16-positiven/HPV-positiven gegenüber p16-positiven, jedoch HPV-negativen (p16-positiven/HPV-negativen) OPSCCs berichtet (Yamamoto et al. 2019).

Bei negativem p16-Status zeigten in der vorliegenden p16-HPV-Studie OPSCCs mit unterschiedlichem HPV-Status keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der OS und LCR. Ähnlich den Ergebnissen von Yamashita et al. (2019) demonstrierten trotz fehlender Signifikanz jedoch Patienten mit p16-negativen/HPV-negativen OPSCCs gegenüber jenen mit p16-negativen/HPV-positiven OPSCCs ein höheres OS (Yamashita et al. 2019).

Signifikant war die prognostische Überlegenheit der Gruppe mit konkordant negativem p16- und HPV-Status gegenüber der Gruppe mit p16-negativen/HPV-positiven OPSCCs in Bezug auf das DSS und RFS. Andere Studien machten keine Angaben bezüglich dieser Endpunkte und stellten daher auch keine Vergleichswerte zur Verfügung (Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Park K et al. 2013; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019).

Konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden p16-HPV-Studie und jener von Yamashita et al. (2019), welche einen p16-negativen/HPV-positiven Status am prognostisch ungünstigsten darstellten (Yamashita et al. 2019), konstituierte in der Studie von Hoffmann et al. (2018) die konkordant negative (p16-negative/HPV-negative) Untergruppe die prognostisch ungünstigste (Hoffmann et al. 2018). Ferner demonstrierten in der Studie von Nauta et al. (2018), Patienten mit konkordant p16/HPV-positiven OPSCCs (p16-positiv/HPV-positiv) eine signifikant höhere Überlebensrate als die Gruppe mit p16-positivem/HPV-negativem Status, deren Überlebenswahrscheinlichkeit wiederum näher bei jener von Patienten mit p16-negativen OPSCCs lag (Nauta et al. 2018). Da in dieser Studie jedoch bei negativem p16-Status auf eine weitere Erhebung des HPV-Status verzichtet wurde, konnte bezüglich potentieller Diskrepanzen zwischen p16-negativen OPSCCs mit entweder HPV-positivem oder HPV-negativem Status keine Aussage getroffen werden. Die vorliegende p16-HPV-Studie und die Studie von Hoffmann et al. (2018) waren bis zum Zeitpunkt der Publikation der Ergebnisse der p16-HPV-Studie die einzigen Untersuchungen, die onkologische Langzeitdaten aller vier Untergruppen in Patientenkollektiven mit ausschließlich in kurativer Intention behandelten OPSCCs untersuchten und diese in der Literatur zur Verfügung stellen (Tabelle 23) (Hoffmann et al. 2018).

### 4.3.3 Tabakkonsum

Neben dem p16- und HPV-Status wurde bereits mehrfach die potentiell ätiologische (Ang et al. 2010; D'Souza et al. 2007; Gillison et al. 2008) und prognostische (Ang et al. 2010; Hoffmann et al. 2018) Relevanz des Tabakkonsums diskutiert. Tabakkonsum gilt auch bei HPV/p16-asoziierten OPSCCs als ein Faktor, der potentiell mit der prognostischen Überlegenheit HPV/p16-asoziiertter OPSCCs interferiert (Ang et al. 2010; Hoffmann et al. 2018). Auch in der vorliegenden p16-HPV-Studie wurden die Verteilung und prognostische

Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne positiver Tabakanamnese stratifiziert nach p16- oder HPV-Status untersucht. Es zeigte sich ein überwiegender Teil von OPSCCs von Nichtrauchern mit positivem p16-Status, wohingegen sich Karzinome von (Ex-)Rauchern mehrheitlich als p16-negativ darstellten. Dies ist mit vorherigen Arbeiten konsistent (Saito et al. 2015; Yamashita et al. 2019). Konträr zum p16-Status wurde hingegen in der vorliegenden Studie für den HPV-Status selbst keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen Nichtrauchern und jenen, die als (Ex-)Raucher eingeordnet wurden, nachgewiesen. Demgegenüber hatte in der Studie von Hoffmann et al. (2018) ein signifikant höherer Anteil von Patienten mit HPV-RNA-negativen OPSCCs mehr als zehn Packungsjahre Tabak konsumiert (Hoffmann et al. 2018).

Die Analyse der onkologischen Ergebnisse im Kontext des Tabakkonsums demonstrierte in der vorliegenden Studie die prognostische Überlegenheit von Nichtrauchern gegenüber (Ex-)Rauchern. Die Stratifizierung auf der Basis des p16-Status ergab dabei die höchsten Überlebensschätzungen für Nichtraucher mit p16-positiven OPSCCs. Demgegenüber zeigten (Ex-)Raucher mit p16-positiven OPSCCs eine ungünstigere Prognose, welche zudem mit jener von (Ex-)Rauchern mit p16-negativen Karzinomen vergleichbar war. Somit scheint der prognostische Vorteil p16-positiver OPSCCs bei früheren/anhaltenden Tabakkonsumenten aufgehoben zu sein oder anders formuliert Nichtrauchern vorbehalten zu sein. Vergleichbare Ergebnisse beschrieben Hoffmann et al. (2019) für Patienten mit HPV-RNA und HPV-DNA-positiven OPSCCs und mehr als zehn Packungsjahre Tabakkonsum in der Anamnese (Hoffmann et al. 2018).

#### **4.3.4 Limitationen, Stärken und Ausblick**

In der vorliegenden p16-HPV-Studie müssen konsistent mit der TLM-, und pN1-Studie potentielle Defizite einer retrospektiven Datenqualität berücksichtigt werden. Eine weitere Limitierung aufgrund geringer Fallzahlen ist die fehlende Möglichkeit potentielle Assoziationen unterschiedlicher HPV-Genotypen mit der Prognose und der p16-Überexpression zu adressieren. Dies sollte in multizentrischen Studien prospektiv oder zumindest auf der Basis bereits existierender detaillierter retrospektiver Datensätze aufgegriffen werden.

Durch die umfangreiche Auswertung von Originaldokumenten, eine strikte Kollektivdefinition und eine teils ergänzende pathologische Beurteilung bot sich in der vorliegenden p16-HPV-Studie jedoch die Gelegenheit insbesondere potentielle prognostische Implikationen des p16- und HPV-Status sowohl jeweils selektiv betrachtet als auch in Kombination in einem gut charakterisierten Patientenkollektiv näher zu untersuchen. Eingeschlossene Fälle umfassten einheitlich OPSCCs im Stadium III – IV mit einer chirurgisch basierten Therapiestrategie in kurativer Intention. Dies erscheint wichtig anzumerken, da Erstens die Behandlung von OPSCCs in einem solchen chirurgischen Therapiekonzept in zahlreichen Zentren die Standardtherapie darstellt (Dalton et al. 2020;

Grant et al. 2009; Haughey et al. 2011; Iro et al. 2011; Karatzanis et al. 2012; Rich et al. 2009; Rogers et al. 2016) (Tabelle 15) und bisher lediglich eine der zuvor diskutierten Studien zur HPV/p16-Biomarker Thematik ebenfalls ein einheitlich chirurgisch therapiertes Kollektiv untersuchte (Hoffmann et al. 2018) (Tabelle 23). Die Bedeutung der vorliegenden p16-HPV-Studie basiert somit auf der bisher uneinheitlich definierten Terminologie einer HPV-Assoziation, sowie in diesem Kontext insbesondere dem Mangel detaillierter Studien eines höheren Evidenzgrads, welche die prognostische Relevanz aller möglichen p16- und HPV-Status-Konstellationen in Bezug auf die onkologischen Langzeitprognose von Patienten mit in kurativer Intention therapierten primären OPSCCs untersuchten (Hoffmann et al. 2018; Nauta et al. 2018; Park K et al. 2013; Yamamoto et al. 2019; Yamashita et al. 2019).

Insgesamt erscheinen insbesondere im Kontext bereits laufender (De-)Eskalationsstudien weitere Untersuchungen vor allem der molekularen Grundlage sowie der klinischen Relevanz der diskordanten Untergruppen von großem sowohl wissenschaftlichen als auch klinischen Interesse. Eine differenzierte Berücksichtigung aller vier Untergruppen wäre in diesen dahingehend zu favorisieren. Eine einheitliche Terminologie und Bestimmungsmethodik einer „HPV-Assoziation“ sollte dabei für den weiteren wissenschaftlichen und klinischen Diskurs unabdingbar sein.

#### 4.4 miRNA-Studie: Potentielle Bedeutung von MicroRNAs als prognostische Biomarker bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx

Biomarker unterstützen die Optimierung einer möglichst patientenindividuellen Betreuung und damit die Entwicklung hin zu einer stärker personalisierten Medizin (Antoniou et al. 2016). Aufgrund der bekannten prognostischen Überlegenheit und der unterschiedlichen Risikokonstitution von Patienten mit p16-/HPV-assoziierten OPSCCs wurden bereits veränderte Therapiekonzepte für "HPV-assoziierte" OPSCCs untersucht (Gillison et al. 2019; Mehanna et al. 2019). Im Einklang mit den Ergebnissen der p16-HPV-Studie ist es jedoch weiterhin diskutabel, inwieweit der HPV/p16-Status gegenüber anderen Faktoren die Selektion geeigneter Patienten beeinflussen sollte (Deschuymer et al. 2018; Fakhry et al. 2019; Price et al. 2020).

Weitere Marker könnten die prognostische Aussagekraft des HPV/p16-Status unterstützen (Kreimer et al. 2020) und darüber hinaus das Wissen über die beschriebene molekulare (Bersani et al. 2018; Gao et al. 2013; Hui et al. 2013) sowie klinische (Ang et al. 2010) Heterogenität zwischen HPV/p16-positiven und HPV/p16-negativen OPSCCs bereichern (Hayes et al. 2014; Price et al. 2020; Yi et al. 2020). miRNAs interferieren sowohl mit der Entwicklung und dem immunologischen Verhalten von Tumoren als auch mit deren Therapieansprechen (Hayes et al. 2014; Iorio und Croce 2012; Yi et al. 2020). Auch HPV-Infektionen initiieren die Dysregulation bestimmter miRNAs (Chen J et al. 2019; McKenna et al. 2014). Die Attraktivität von miRNAs als potenzielle Biomarker und Therapieoption für verschiedene Malignome begründen sich weiterhin auf der relativen Stabilität des tumortypspezifischen Expressionsmusters und die relativ hohe Stabilität und zuverlässige Nachweisbarkeit in diversen Biomaterialien (Iorio und Croce 2012). Lediglich eine begrenzte Anzahl publizierter Studien untersuchte bisher potentielle Implikationen spezifischer miRNAs im Kontext von sowohl Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika als auch den onkologischen Ergebnissen bei selektiv p16/HPV-positiven und -negativen OPSCCs (Bersani et al. 2018; Gao et al. 2013; Harris et al. 2012; Hess AK et al. 2017; Hui et al. 2013; Quabius et al. 2017; Saleh et al. 2019; Wong et al. 2016).

In der miRNA-Studie konnte für mehrere der initial untersuchten und ausgehend von der Literatur als potentiell klinisch relevant eingeordneten miRNAs, keine Assoziation zwischen Expression in den Primärtumoren und Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika sowie der Prognose von Patienten mit OPSCCs aufgezeigt werden. Dies bekräftigt nur eine bedingte Eignung von beispielweise Zellmodellen zur Beurteilung der klinischen Relevanz von miRNAs (Avisar et al. 2009) und bestärkt damit die Notwendigkeit weiterer Studien auf der Basis humanen Materials. Weiterhin unterstützt es die Annahme einer ausgeprägten Tumorheterogenität. Zur Detektion eventuell kleinerer, dennoch potentiell klinisch relevanter Unterschiede bedarf es somit vermutlich größerer Kollektive,

wie sie beispielsweise durch multizentrische Studien generiert werden könnten. Trotz einer relativ geringen Fallzahl führten miR-182-5p und miR-205-5p zu einer prognostischen Stratifizierung des Gesamtkollektivs der miRNA-Studie sowie mindestens einer der beiden p16-stratifizierten Untergruppen.

#### 4.4.1 miR-182

miR-182 könnte in HNSCCs durch die positive Rückkopplung auf den Ras-MEK-ERK-Signalweg (Wang J et al. 2017), die Repression von Genen wie *CAMK2N1* (Li et al. 2018), *RASA1*, *SPRED1* (Wang J et al. 2017), *NUMB* (Chou et al. 2018),  $\beta$ -*TrCP2* (Wang L et al. 2017) und *MTSS1* (Guo et al. 2020) als ein potentielles Onkogen wirken. Dennoch deuten Studien auch auf das Potential von miR-182 hin, durch die Inhibition der Expression von Genen wie beispielsweise *PDK4* (Xu S et al. 2019) und *CRR9* (Lv et al. 2019) einer malignen Zelltransformation entgegenzuwirken.

Dennoch wurde konsistent mit einer anderen Studie, die selektiv OPSCCs einschloss, in der vorliegenden Studie unabhängig vom p16-Status, keine signifikant unterschiedliche Expression von miR-182-5p in malignen gegenüber benignen Geweben beobachtet (Hui et al. 2013). Demgegenüber zeigte sich in Gewebe- und Zelllinien von Kehlkopfkrebs (LSCC) eine Herunterregulation von miR-182 (Lv et al. 2019). Wiederum eine erhöhte Expression fand sich in Zelllinien (Guo et al. 2020; Li et al. 2018; Wang J et al. 2017), Proben von OCCs (Ganci et al. 2016; Guo et al. 2020; Li et al. 2018; Wang J et al. 2017) sowie unter der kombinierten Berücksichtigung von HNSCCs unterschiedlicher Hauptlokalisationen (Chou et al. 2018; Ganci et al. 2013; Ramdas et al. 2009; Wang L et al. 2017). Interessanterweise identifizierten Ganci et al. miR-182-5p lediglich in *TP53*-mutiertem, nicht aber in *TP53*-Wildtyp-HNSCCs als herunterreguliert (Ganci et al. 2013). Dazu passend fand Wang et al. eine höhere miR-182-Expression vorwiegend in HNSCC-Tumorgeweben, welche eine Überexpression des Proteins p53 aufwiesen (Wang L et al. 2017). Diese potentielle Interdependenz zwischen der miR-182-5p-Expression und des *TP53*/p53-Status könnte daher einen Ausgangspunkt darstellen, um die Heterogenität der Expression und Regulation von miR-182 in HNSCCs näher zu untersuchen.

In Bezug auf HPV zeigten Zell- und Mausmodelle ferner die Möglichkeit einer durch das Onkoprotein E7 von Hochrisiko-HPV-Genotypen induzierten Verstärkung der Expression von miR-182 in sowohl Tumorzellen als auch in benachbarten physiologischen Zellarealen. Zurückgeführt wurde diese auf eine Bindung von E7 an phosphoryliertes Retinoplastomaprotein, eine folgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und dadurch vermittelte Überexpression des Zytokins TGF- $\beta$ , anschließende Aktivierung des Smad4-Signalweges mit letztlich positiver Interaktion zwischen Smad4 und der Promotorregion von miR-182 (Chen J et al. 2019). Die für miR-182 selbst vorhergesagte Hybridisierungsstelle für die mRNA des HPV16-Onkoproteins E6 (Quabius et al. 2017) legt ferner eine direkte Interferenz mit einer HPV-Infektion nahe. Die Expression von miR-182 wurde somit einerseits bereits mit dem

vom *TP53/p53*- und ferner andererseits auch mit dem HPV/p16-Status des Tumors kontextualisiert. Trotzdem zeigte die Expression von miR-182-5p in der vorliegenden miRNA-Studie weder zwischen OPSCCs mit positiven gegenüber jenen mit negativem p16-Status noch innerhalb der p16-stratifizierten Untergruppen in der Ausprägung weiterer untersuchter Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika signifikante Abweichungen. Somit dürfte keine dieser Variablen die miR-182-5p-Expression signifikant beeinflusst haben. Im Einklang hiermit gehörte miR-182 auch in anderen Studien nicht zu den HPV/p16-assoziierten miRNAs in OPSCCs (Hui et al. 2013; Lajer et al. 2011; Lajer et al. 2012). Dennoch wurden in OSCCs über höhere miR-182-5p-Level in geringer differenzierten, lokal fortgeschrittenen und regional metastasierten Tumoren berichtet (Guo et al. 2020). Dies indiziert erhöhte miR-182-5p-Level als einen potentiellen Marker einer erhöhten Tumoraggressivität in bestimmten HNSCCs (Guo et al. 2020). Diese These wird unterstützt durch die bereits dargelegte onkogene Funktion von miR-182 (Chou et al. 2018; Guo et al. 2020; Li et al. 2018; Wang J et al. 2017; Wang L et al. 2017), die in Zellstudien beobachtete Assoziationen zwischen miR-182 und einer intensivierten Zellzyklusprogression, Proliferation, Koloniebildung, Migration, Invasivität und geringeren Apoptose-rate (Li et al. 2018; Wang J et al. 2017; Wang L et al. 2017) sowie die, in vivo vorgefundenen, Assoziationen zwischen miR-182 und einer höheren Tumorausdehnung und -Masse (Wang L et al. 2017). Ferner steht dies auch im Einklang mit den Resultaten der Ereigniszeitanalysen der vorliegenden miRNA-Studie. Diese zeigte eine höhere Expression von miR-182-5p im Tumorgewebe mit einem verschlechterten DSS und RFS im gesamten Kollektiv, einem reduzierten DSS innerhalb der p16-positiven Untergruppe und einem vergleichbaren Trend in der p16-negativen Untergruppe assoziiert. Eine solche inverse Assoziation zwischen miR-182 und der Prognose wurde ebenso in einer Meta-Analyse unter Berücksichtigung differenzierender Tumorentitäten (Wang F et al. 2015) sowie in Bezug auf Patienten mit Gliomen (Jiang L et al. 2010), Prostata- (Casanova-Salas et al. 2014), Leberzell- (Cao MQ et al. 2018) und kolorektale Karzinomen (Rapti et al. 2014; Wang S et al. 2014) berichtet. Allerdings steht dies im Konflikt mit der Assoziation zwischen einer erhöhten miR-182-Expression und einer günstigeren Prognose bei Patienten mit NSCLC (Stenvold et al. 2014).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden miRNA-Studie somit auf einen potentiellen Mehrwert einer prätherapeutischen Evaluation der Gewebeexpression von miR-182-5p zur prognostischen Stratifizierung von Patienten mit OPSCCs hin. Trotz vergleichbarer Expression im Karzinom- und benignen Kontrollgewebe könnte der Nachweis einer höheren respektive niedrigeren miR-182-5p Expression bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zur Identifikation von Karzinompatienten mit einer schlechteren respektive besseren Prognose beitragen. Eine höhere miR-182-5p-Expression könnte somit beispielsweise ein potentielles Ausschlusskriterium in zukünftigen Deeskalationsstudien für p16-positive OPSCCs darstellen, vorausgesetzt eine positive Validierung dieser Ergebnisse in einem Vergleichskollektiv würde folgen.

#### 4.4.2 miR-205

miR-205 scheint in unterschiedlichen Tumorentitäten fehlreguliert zu sein (Orang et al. 2014; Qin et al. 2013). Studien deuten auf ein ambivalentes Wirkpotenzial von miR-205 in HNSCCs hin. Zum einen könnte diese miRNA tumorsuppressiv via Regulation von Genen wie beispielsweise TIMP-2 (Nagai et al. 2018) und Bcl-2 (Fletcher et al. 2008; Jiang J et al. 2005; Kimura et al. 2010), aber zum Anderen auch tumorpromovierend, beispielsweise über Beeinflussung der Expression von Genen wie *COMMD1* (Yeh et al. 2016), *CDK2AP1* (Zhong und Xiong 2015), *PTEN* (Qu et al. 2012), *BRCA1* und *RAD17* (Valenti et al. 2019) wirken.

In der vorliegenden Studie zeigten OPSCCs unabhängig vom p16-Status mindestens einen Trend zu einer erhöhten Expression von miR-205-5p im Vergleich zum Kontrollgewebe. Eine vermehrte miR-205-Expression wurde ebenso in Gewebe von OSCCs (Berania et al. 2017; Ganci et al. 2016), Larynx- (Cao P et al. 2013; Wang B et al. 2016; Zhong und Xiong 2015) und Nasopharynxkarzinomen (Wang F et al. 2016) wie auch in Tumorproben (Kolenda et al. 2019; Lamperska et al. 2016; Nunez Lopez et al. 2018), Seren (Victoria Martinez et al. 2015), Feinnadelaspirationen von Lymphknotenmetastasen (de Carvalho et al. 2015) und Zelllinien (Jiang J et al. 2005; Tran et al. 2007) von HNSCCs verschiedener Hauptlokalisationen gefunden. Konträr dazu wies die nicht signifikant abweichende Expression von miR-205 in Geweben von beispielsweise OSCCs (Kimura et al. 2010; Manikandan et al. 2015; Prasad et al. 2017) miR-205 als einen allgemeinen Marker für Gewebe plattenepithelialen Ursprungs hin (Kimura et al. 2010). Eine konsistent mit der vorliegenden miRNA-Studie aberrante, jedoch geringere Expression von miR-205 zeigte sich in anderen Studien beispielsweise in Geweben von Larynxkarzinomen (Tian et al. 2014), OSCCs (Nagai et al. 2018) und HNCCs unterschiedlicher Hauptlokalisationen (Childs et al. 2009). Entsprechend dem zuvor berichteten ambivalenten Potential von miR-205 könnte somit die Funktion und Dysregulation einer größeren Tumorerheterogenität und den jeweils vorherrschenden miRNA-Zielgenen unterliegen.

Ferner weisen Zellstudien auf einen, von der Expression der HPV16-Onkoproteine E6 und E7 abhängigen, Verlust einer physiologisch gesteigerten miR-205-5p-Expression im Differenzierungsprozess von Keratinozyten hin (McKenna et al. 2014). Dennoch wurden in mehreren anderen Studien konsistent mit der Hiesigen eine vergleichbare miR-205-Expression in HPV/p16-positiven und negativen HNSCCs bestimmt (Gao et al. 2013; Hui et al. 2013; Kolenda et al. 2019; Lajer et al. 2011; Lajer et al. 2012).

Darüber hinaus zeigte die miR-205-5p-Expression in der miRNA-Studie keine signifikante Abweichung zwischen den einzelnen Ausprägungen der untersuchten Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika innerhalb der p16-stratifizierten Untergruppen. Die miR-205-5p-Expression wurde daher wie auch die miR-182-5p-Expression als unabhängig von diesen betrachtet. Konträr dazu wurde jedoch beispielsweise für LSCCs und

HNSCCs verschiedener Hauptlokalisationen über eine Assoziation zwischen einer erhöhten miR-205-Expression und dem Fehlen von Charakteristika aggressiverer und metastasierender Erkrankungen berichtet (Kolenda et al. 2019; Tian et al. 2014). In einem gemischten Kollektiv mit OSCCs oder OPSCCs ging wiederum eine erhöhte miR-205-Expression signifikant mit der Präsenz einer regionalen Metastasierung und einem Trend zu einem höheren pathologischen Erkrankungsstadium einher (Brito et al. 2016). Dies bekräftigt miR-205 als Marker für weiter fortgeschrittene und aggressivere Karzinome. Dies ist konsistent mit der zuvor beschriebenen potentiellen onkogenen Funktion von miR-205 (Qu et al. 2012; Valenti et al. 2019; Yeh et al. 2016), der Assoziation mit tumortypischen Charakteristika von Zellen (Qu et al. 2012; Valenti et al. 2019; Yeh et al. 2016) sowie der höheren Expression im Karzinomgewebe und der inversen Assoziation der Prognose im Gesamtkollektiv (PFS, RFS, LCR) sowie der p16-positiven Untergruppe (PFS, LCR) der vorliegenden Studie. Weiterhin konsistent hiermit deutete eine Studie auf die Bedeutung der miR-205-5p-Expression allein sowie in Kombination mit weiteren miRNAs als einen potentiellen Prädiktor eines ungünstigeren RFS von HNSCC-Patienten hin, der unabhängig von weiteren Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika ist (Ganci et al. 2013). Eine inverse prognostische Assoziation der miR-205-Expression wurde ebenfalls bei OSCCs (Berania et al. 2017) sowie außerhalb von HNSCCs, beispielsweise bei Karzinomen des Endometriums (Wu et al. 2020), Ovars (Li J et al. 2017), Ösophagus (Pan et al. 2017) und der Lunge (Duan et al. 2017) gezeigt. Demgegenüber wurde bezogen auf die Prognose bei beispielsweise Karzinomen des Kolons (Gulei et al. 2018), der Prostata (Hagman et al. 2013) oder Mamma (Wu et al. 2020) über eine positive Assoziation der miR-205 Expression berichtet.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie den potentiellen Nutzen der Quantifizierung der Gewebeexpression von miR-205-5p zur Identifikation von HNSCC-Zellen in Lymphknoten (Fletcher et al. 2008) und an Resektionsrändern (Lamperska et al. 2016). Sie stehen weiterhin im Einklang mit einem potentiellen Mehrwehrt für eine prätherapeutische prognostische Stratifizierung p16-positiver OPSCCs.

#### **4.4.3 miR-182-5p und miR-205-5p im TCGA-Kollektiv**

Daten des TCGA stellen zur Untersuchung verschiedener Tumortypen eine unmittelbar verfügbare und kostenfrei zugängliche Datenbasis zur Verfügung (Cancer Genome Atlas 2015; Cancer Genome Atlas Research et al. 2013). Beispielsweise wurde von der Arbeitsgruppe der vorliegenden Studie zur Validierung der Dysregulation unterschiedlicher miRNAs in OSCCs ein TCGA-Datensatz herangezogen (Jakob et al. 2019). Der TCGA-Datensatz für OPSCCs umfasste jedoch lediglich 33 Fälle (12 % aller TCGA HNSCC-Fälle) (Cancer Genome Atlas 2015). Aus unter anderem diesem Grund wurden diese zur Validierung von Resultaten eines OPSCC-Datensatzes als inadäquat eingeschätzt (Hess AK et al. 2017). Für einen Versuch wurden dennoch in der vorliegenden Studie die Ereigniszeit-



analysen unter Berücksichtigung der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p in den TCGA-Daten von OPSCCs berechnet. Im Einklang mit dem vorliegenden Studienkollektiv zeigte sich für das OS stratifiziert nach der medianen Expression von miR-182-5p oder miR-205-5p auch im TCGA-Datensatz jeweils keine signifikante Abweichung. Aufgrund fehlender Angaben konnten mit den veröffentlichten TCGA-Daten die weiteren Endpunkte (DSS, RFS, PFS oder LCR) nicht berechnet werden, sodass die Validierung dieser Ergebnisse zukünftigen Studien vorbehalten bleibt.

#### 4.4.4 Limitationen, Stärken und Ausblick

Limitationen der miRNA-Studie sind die Stichprobengröße, das Fehlen eines geeigneten Validierungskollektivs und der erschwerte Literaturvergleich durch den Mangel vergleichbarer Studien. Zahlreiche Faktoren können zu einer Variabilität und teilweise kontroversen Ergebnissen beitragen und erschweren damit den Vergleich verschiedener Studienergebnisse. Neben der eigenen komplexen Regulation der gewebespezifischen zellulären miRNA-Expression und der bereits erwähnten Tumorerheterogenität umfassen diese unter anderem Unterschiede der Verteilung von Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika (beispielsweise des p16-/HPV-Status), grundlegende methodische Unterschiede wie beispielsweise verwendete Biomaterialien (FFPE vs. FF vs. Zelllinien vs. Speichel etc.), Detektions- und Quantifizierungsmethoden (Microarray vs. qPCR vs. ISH etc.), eingeschlossene Tumorlokalisationen (gemischte HNSCC-Datensätze vs. spezifische HNSCC-Lokalisationen) sowie abweichende Herkunft von Vergleichsgewebe (Proben von Patienten ohne Malignom vs. gepaarte Proben der Karzinompatienten).

Eine Stärke ist die in der vorliegenden Studie berücksichtigte Unterteilung von OPSCCs mit positivem und negativem p16-Status, die in Anlehnung an die aktuelle achte Edition der Algorithmen der UICC (Brierley et al. 2017)/AJCC (Amin et al. 2017) und der 2017 publizierten (vierten) Edition der WHO-Klassifikation bösartiger Tumore (Westra und Lewis 2017) erfolgte. Die Präsentation p16-stratifizierter Analysen spezifischer miRNAs in FF-Gewebe der lokalen Primärtumoren unter Berücksichtigung differenzierter klinischer und experimenteller Einschlusskriterien und umfassender Informationen über Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika ermöglichte die potentielle Relevanz von miR-182-5p und miR-205-5p als potentielle Biomarker bei OPSCCs herauszuarbeiten.

Eine prospektive Validierung der Ergebnisse unter Berücksichtigung einer größeren Patientenfallzahl, die Untersuchung potentieller diagnostischer und prognostischer Implikationen von miR-182-5p und miR-205-5p bei Patienten mit Rezidiv und/oder Fernmetastasierung sowie unter Verwendung abweichender Biomaterialien (beispielsweise Speichel) könnte die translatorische Relevanz der Ergebnisse der miRNA-Studie weiter hervorbringen.

## 4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend bekräftigen die Ergebnisse der TLM-Studie, dass eine TLM-basierte multimodale Therapiestrategie in Kombination mit ND und/oder aR(C)T sowohl bei begrenzten als auch bei fortgeschrittenen OPSCCs als eine onkologisch effektive, das Normalgewebe schonende und mit guten funktionellen Ergebnissen assoziierte Therapiemöglichkeit darstellt. Die Ergebnisse der TLM- und der pN1-Studie haben den Mehrwert einer aR(C)T sowohl nach einer CO<sub>2</sub>-lasermikrochirurgischen Resektion fortgeschrittener OPSCCs als für das Kollektiv lokal umschriebener (pT1 – 2) HNSCCs mit einer singulären ipsilateralen Lymphknotenmetastase mit einem Maximaldurchmesser von 3 cm (pN1) ohne extrakapsuläre Ausbreitung (ECS-negativ) dargestellt. Unabhängig davon sollten jedoch patientenindividuelle Therapieempfehlungen in interdisziplinären Konferenzen erarbeitet, im Konsens mit dem Patienten festgelegt und in prospektiven randomisierten Studien unter Einbeziehung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität untersucht beziehungsweise reevaluiert werden. Auch die Kosteneffektivität einer Therapie ist ein Faktor, der in Folgeuntersuchungen analysiert werden sollte.

Die beobachteten prognostischen Differenzen zwischen Patienten mit p16-positiven und p16-negativen OPSCCs stehen im Einklang mit der differenzierteren Betrachtung als zwei möglicherweise unabhängiger Tumorentitäten, wie sie die letzten Aktualisierungen der Algorithmen der UICC (Brierley et al. 2017)/AJCC (Amin et al. 2017) und der WHO-Klassifikation bösartiger Tumore (Westra und Lewis 2017) vorgenommen wurde. Die Ergebnisse der p16-HPV-Studie demonstrierten, dass p16- und der HPV-Status nicht mit einer identischen prognostischen Aussage assoziiert waren. Folglich sollten p16- und HPV-Status nicht als äquivalente Marker einer überlegenen Prognose betrachtet werden. Ferner scheint die Interpretation ihrer prognostischen Aussagekraft weiterer Informationen über Lebensstilfaktoren wie beispielsweise einen vorausgehenden Tabakkonsum zu bedürfen. Diese Ergebnisse sollten bei der Konzeption (Einschlusskriterien, Fragestellungen) und Auswertung zukünftiger beispielsweise Deeskalations-Studien bei HPV-assoziierten Karzinomen berücksichtigt werden. Darüber hinaus wurde die potentielle Möglichkeit einer prognostischen Stratifizierung von Patienten mit p16-positiven OPSCCs auf Basis der Expression von miR-182-5p und miR-205-5p dargestellt, was in weiteren Untersuchungen mithilfe eines adäquaten Vergleichskollektivs validiert werden muss. Zukünftig könnten p16- und HPV-Status aber auch geeignete MicroRNAs als Biomarker ein präziseres und stärker individualisiertes onkologisches Vorgehen bei OPSCCs unterstützen.

## 5 Zusammenfassung

Karzinome der Kopf-Hals-Region gehören weltweit zu den häufigsten Malignom-erkrankungen. Davon sind etwa 12 – 14 % Oropharynxkarzinome. Die transorale CO<sub>2</sub>-Lasermikrochirurgie ist ein wenig invasives Verfahren, welches teilweise kombiniert mit einer Neck-Dissection und/oder adjuvanten Radio(chemo)therapie durchgeführt wird. Der Stellenwert einer adjuvanten Radiotherapie ist bei pT1 – 2 pN1 klassifizierten Karzinomen bisher nicht abschließend geklärt und Inhalt aktueller Diskussion. Die Entwicklung einer präziseren und prognoseadaptierten Behandlung könnte durch molekulare Marker wie dem p16-Status, dem Nachweis von onkogener Genotypen Humaner Papillomaviren und/oder der Quantifizierung von MicroRNAs unterstützt werden.

Die Ergebnisse einer kurativ intendierten und auf der tansoralen Lasermikrochirurgie basierten Therapiestrategie wurden bei Patienten mit Oropharynxkarzinom untersucht. Die Langzeitergebnisse einer adjuvanten Radiotherapie wurden zusätzlich bei Patienten mit pT1 – 2 pN1 klassifiziertem Kopf-Hals-Karzinom ohne extrakapsuläres Wachstum der Lymphknotenmetastase und karzinomfreien Resektionsrändern analysiert. Der p16-Status, der Nachweis onkogener Humaner Papillomaviren und die Expression spezifischer MicroRNAs im Gewebe von Oropharynxkarzinomen wurden im Kontext von Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und der Prognose untersucht.

Die Therapie basierend auf der transoralen Lasermikrochirurgie ergab für das Kollektiv aus 368 Patienten mit einem Oropharynxkarzinom im überwiegend fortgeschrittenen Stadium eine Fünf-Jahres lokale Kontrollrate von 77,2 %. Die Schätzungen des Gesamtüberlebens, krankheitsspezifischen und rezidivfreien Überlebens betrug 61,5 %, 76,5 % und 61,3 %. Eine stattgehabte adjuvante Radio(chemo)therapie und ein positiver p16-Status waren bei fortgeschrittenen Erkrankungen mit einer besseren Prognose assoziiert. Bei 13 % war im Rahmen der chirurgischen und radiotherapeutischen Behandlung eine perkutane Ernährungssonde aufgrund schwerer Dysphagie oder Aspiration erforderlich. Bei nur 6,5 % verblieb diese dauerhaft bis zum Tod oder letzten Nachbeobachtungszeitpunkt. Insgesamt erhielten 3,8 % der Patienten perioperativ eine Tracheotomie.

Von 65 Patienten mit pT1 – 2 pN1 klassifiziertem Kopf-Hals-Karzinom der Mundhöhle, des Oro- oder Hypopharynx erfolgte bei 32,3 % eine adjuvante Radiotherapie. Diese war mit einem überlegenen krankheitsspezifischen und rezidivfreien Überleben sowie einer besseren lokalen Kontrollrate assoziiert.

Bei fortgeschrittenen Oropharynxkarzinom war ein positiver p16-Status, nicht aber der Nachweis einer Infektion mit Humanen Papillomaviren mit einer besseren Prognose assoziiert. Unter Berücksichtigung des p16-Status und des Nachweises einer Infektion mit Humanen Papillomaviren zeigten die p16-positiven Gruppen und die doppelt negative Gruppe ein vergleichbar gutes Gesamtüberleben, wohingegen eine Infektion mit Humanen Papillomaviren bei negativem p16-Status die prognostisch ungünstigsten Ergebnisse aufwies.

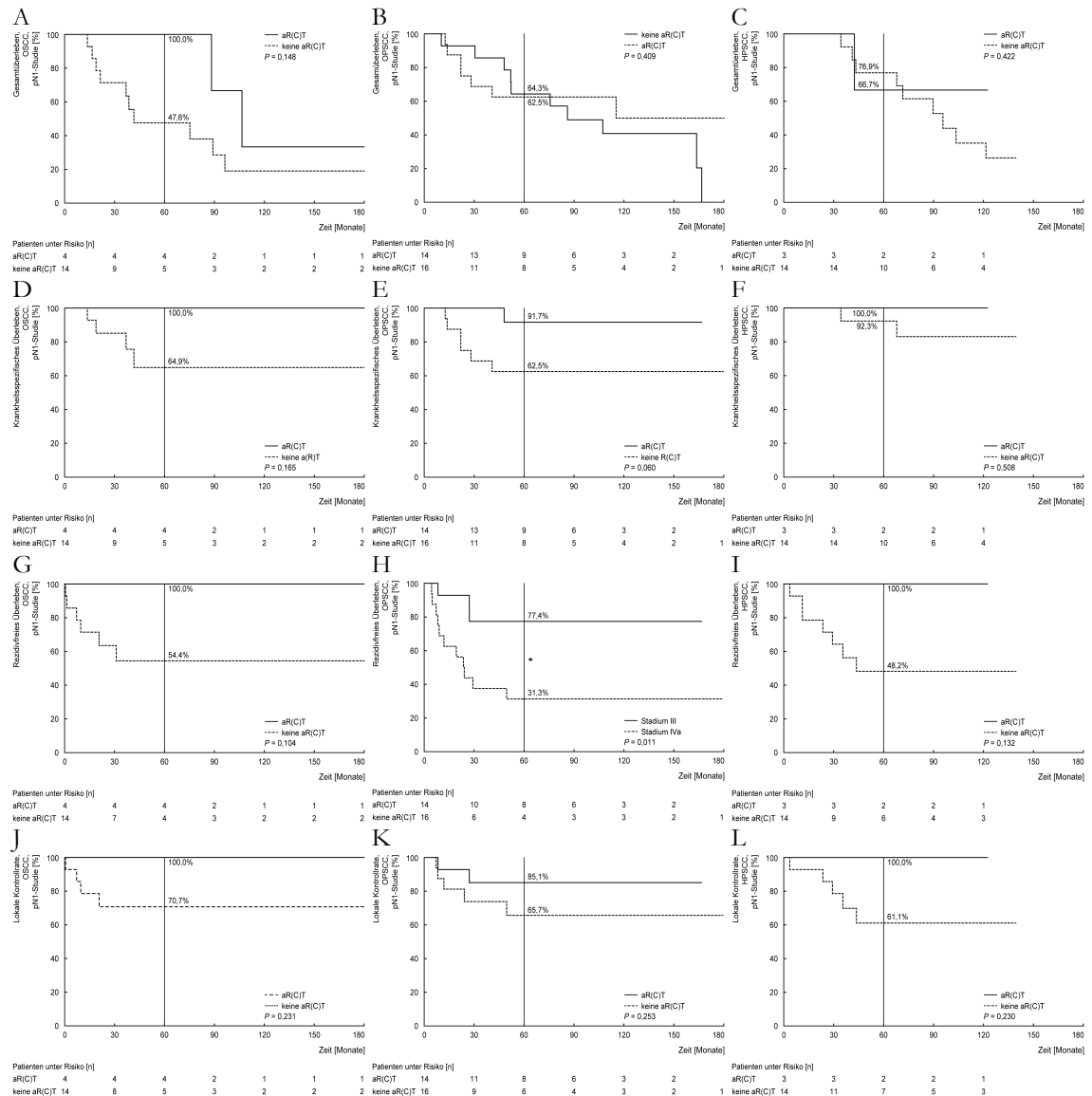
Patienten mit p16-positivem Oropharynxkarzinom demonstrierten eine günstigere Prognose, wenn diese nie Tabak konsumiert hatten, wohingegen sich jene mit ehemaligem/anhaltendem Tabakkonsum der ungünstigeren Prognose von (Ex-)Rauchern mit p16-negativem Karzinom annäherten.

Eine höhere miR-182-5p-Expression in p16-positiven Oropharynxkarzinomen war mit einem schlechteren krankheitsspezifischen Überleben und eine höhere miR-205-5p-Expression mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben und einer unterlegenen lokalen Kontrollrate assoziiert. Für miR-182-5p zeigte sich ein vergleichbarer Trend auch für p16-negative Karzinome.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten für das TLM-basierte multimodale Therapiekonzept gute onkologische und funktionelle Ergebnisse, nicht nur bei lokal umschriebenen sondern auch für fortgeschrittene Oropharynxkarzinome. Darüber hinaus wurde der Mehrwert einer adjuvanten Radiotherapie auch bei lokal begrenzten (pT1 – 2) Karzinomen mit einer singulären ipsilateralen Lymphknotenmetastase ohne extrakapsuläres Wachstum (pN1) dargestellt. Der p16-Status nicht aber ein Nachweis Humaner Papillomaviren zeigte sich als Marker einer günstigeren Prognose bei Oropharynxkarzinomen, wobei der Tabakkonsum den prognostischen Vorteil aufzuheben scheint. Als ergänzende Biomarker für eine prognostische Stratifizierung könnten MicroRNAs einen Stellenwert entwickeln, wofür sich für die Expression von miR-182-5p und miR-205-5p bei p16-positiven Oropharynxkarzinomen Hinweise zeigten.

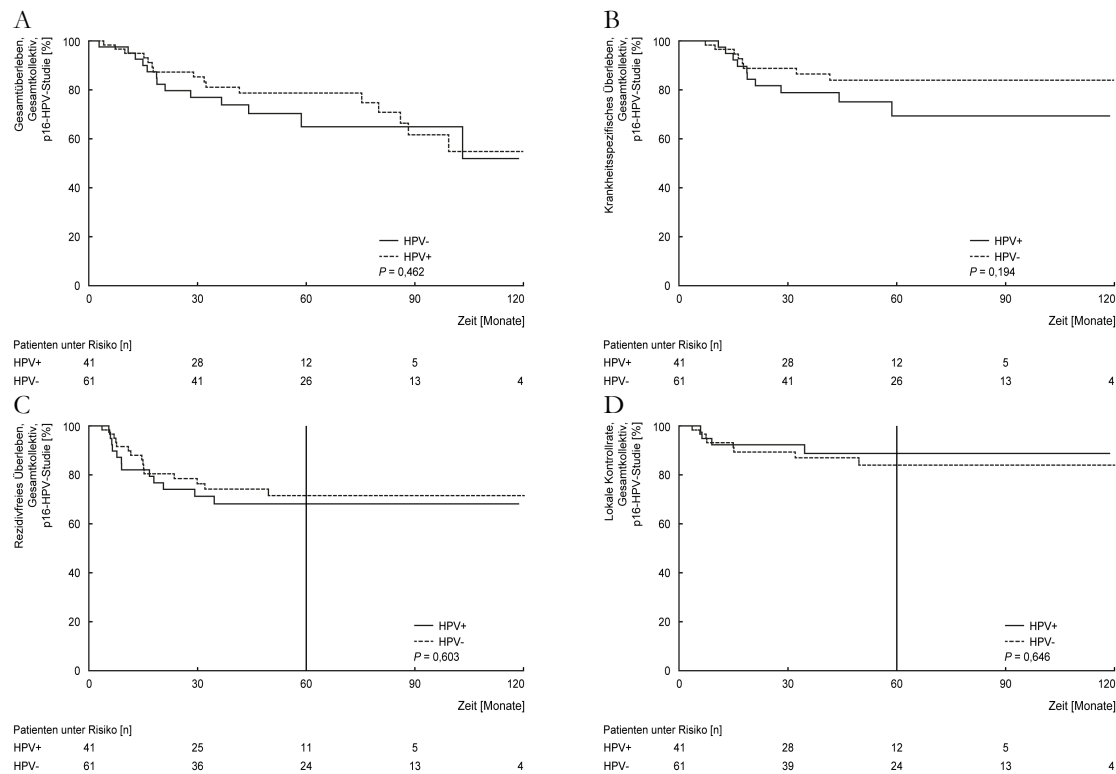
# 6 Anhang

## 6.1 Anhang pN1-Studie

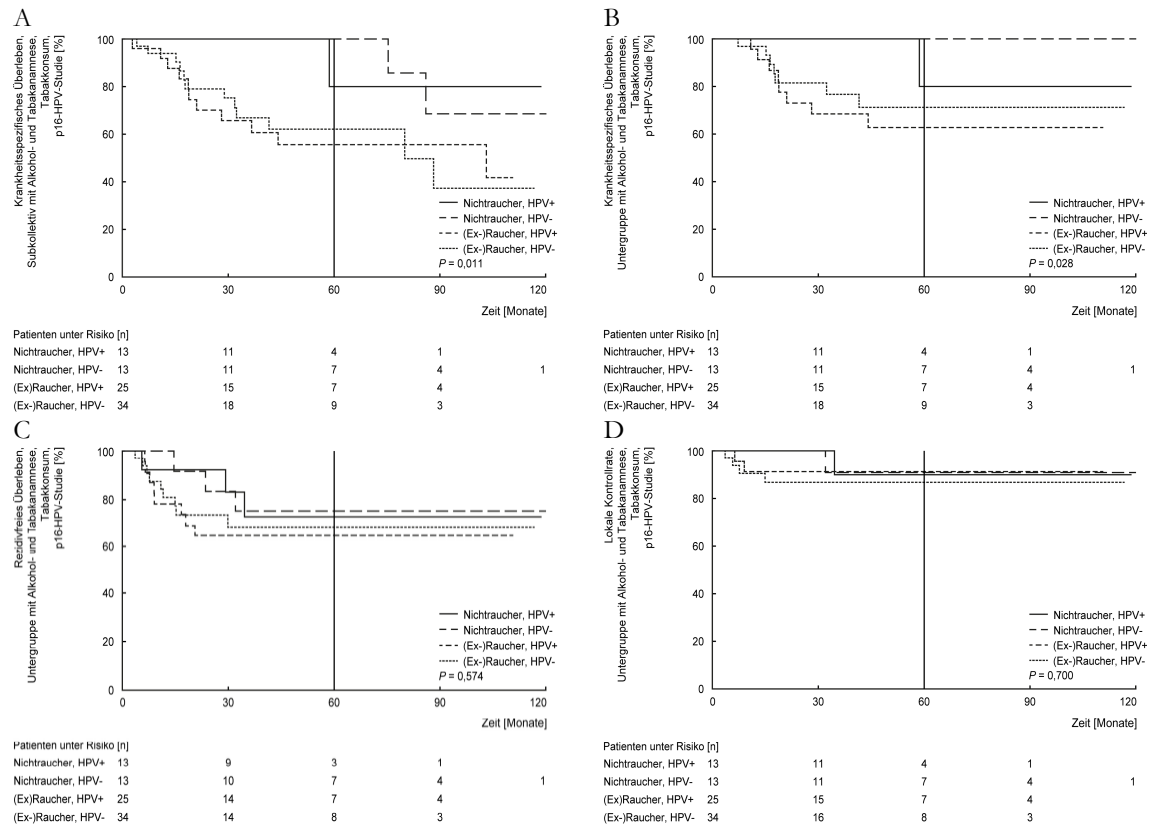


**Abbildung A. 1: Ereigniszeitanalysen bei pT1-2 pN1 ECS-negativen HNSCCs für jede Hauptlokalisation stratifiziert nach Durchführung einer aR(C)T.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A – C, das Gesamtüberleben, D – F, krankheitsspezifisches Überleben und G – I, das rezidivfreie Überleben, J – L die lokale Kontrollrate bei pT1 – 2 pN1 ECS-negativen OSCCs (A, D, G, J) OPSCCs (B, E, H, K), HPSCCs (C, F, I, L) sind für die pN1-Studie sind stratifiziert nach der Durchführung einer aR(C)T und modifiziert nach Weiss et al. (2020b) dargestellt (Weiss et al. 2020b). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

### 6.2 Anhang p16-HPV-Studie



**Abbildung A. 2: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem HPV-Status.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische und C, das rezidivfreie Überleben sind für die p16-HPV-Studie stratifiziert nach dem HPV-Status der Karzinome und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



**Abbildung A. 3: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs im fortgeschrittenen Stadium stratifiziert nach dem HPV-Status und Tabakkonsum.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische, C, das rezidivfreie Überleben und D, die lokale Kontrollrate sind für Patienten mit bekannter Tabak- und Alkoholanamnese der p16-HPV-Studie stratifiziert nach dem Tabakkonsum der Patienten und des HPV-Status der Karzinome und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist jeweils angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.

**Tabelle A. 1: HPV-Status und -Typisierung von OPSCCs der Tonsillenregion und des Zungengrundes stratifiziert nach dem p16-Status**

HPV-Typisierung	Gesamt, n = 74		p16-Immunhistochemie			
			p16-positiv, n = 47		p16-negativ, n = 27	
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
HPV-negativ	32	43,2	25	53,2	7	25,9
HPV-positiv	42	56,8	22	46,8	20	74,1
Monoinfektion	27	36,5	23	48,9	4	14,8
HPV16	20	27,0	19	40,4	1	3,7
HPV18	1	1,4	1	2,1	0	0,0
HPV33	2	2,7	2	4,3	0	0,0
HPV59	4	5,4	1	2,1	3	11,1
Multiple Infektionen	5	6,8	2	4,3	3	11,1
HPV16, HPV33, HPV59	1	1,4	0	0,0	1	3,7
HPV16, HPV33	3	4,1	1	2,1	2	7,4
HPV16, HPV59	1	1,4	1	2,1	0	0,0

HPV-Status und -Typisierung der OPCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Abkürzungen: HPV = Humaner Papillomavirus; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.





Charakteristikum	Gesamt		p16-positiv		P <sup>a</sup>	HPV-positiv		P <sup>a</sup>	p16-positiv HPV-positiv		p16-positiv HPV-negativ		P <sup>a</sup>								
	[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]		[n]	[%]						
Therapie																					
TLM	2	2,7	2	4,3	0	0,0	0,666	1	3,1	1	2,4	0,536	1	4,0	1	4,5	0	0,0	0	0,0	0,733
TLM + ND	16	21,6	11	23,4	5	18,5		5	15,6	11	26,2		4	16,0	7	31,8	1	14,3	4	20,0	
TLM + ND + aRT	22	29,7	13	27,7	9	33,3		12	37,5	10	23,8		8	32,0	5	22,7	4	57,1	5	25,0	
TLM + ND + aRCT	34	45,9	21	44,7	13	48,1		14	43,8	20	47,6		12	48,0	9	40,9	2	28,6	11	55,0	
Nachsorge [Monate]																					
Mittelwert ± SD	54,5 ± 36,1		61,6 ± 36,3		42,0 ± 32,9		49,1 ± 32,2		58,6 ± 38,7		52,1 ± 31,3		72,4 ± 39,3		38,2 ± 35,7		43,4 ± 32,7				
Median	49,0		56,9		31,7		45,3		60,3		46,0		77,7		21,1		39,3				
(Min. – Max.)	(2,9 – 135)		(2,9 – 135)		(4,1 – 109,8)		(2,9 – 118,7)		(4,1 – 135,0)		(2,9 – 118,7)		(9,8 – 135)		(12,9 – 109,8)		(4,1 – 99,4)				
Tabakkonsum																					
Keine Information	13	17,6	10	21,3	3	11,1		2	6,3	11	26,2		1	4,0	9	40,9	1	14,3	2	10,0	
Nie	23	31,1	20	42,6	3	11,1	<b>&lt;0,01</b>	13	40,6	10	23,8	0,372 <sup>e</sup>	12	48,0	8	36,4	1	14,3	2	10,0	<b>0,011<sup>e</sup></b>
Früher/aktuell	38	51,4	17	36,2	21	77,8	<sup>e</sup>	17	53,1	21	50,0		12	48,0	5	22,7	5	71,4	16	80,0	
Alkoholkonsum																					
Keine Information	15	20,3	11	23,4	4	14,8		3	9,4	12	28,6		2	8,0	9	40,9	1	14,3	3	15,0	
Nie/gelegentlich	40	54,1	32	68,1	8	29,6	<b>&lt;0,01</b>	23	71,9	17	40,5	0,063 <sup>e</sup>	21	84,0	11	50,0	2	28,6	6	30,0	<b>&lt;0,01<sup>e</sup></b>
Stark	19	25,7	4	8,5	15	55,6	<sup>e</sup>	6	18,8	13	31,0		2	8,0	2	9,1	4	57,1	11	55,0	

Patienten-, Erkrankungs-, Therapiecharakteristika und Nachsorgedaten bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds sind für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test; <sup>b</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests für die Verteilung lokal umschriebener (pT1 – 2) versus lokal fortgeschrittener (pT3 – 4a) Karzinome; <sup>c</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests für die Verteilung hoher/moderater vs. schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>e</sup> P-Wert des Pearson Chi-Quadrat-Tests unter Ausschluss von Patienten ohne verfügbare Information.

Abkürzungen: aRCT = adjuvante Radiochemotherapie; aRT = adjuvante Radiotherapie; c/pN-Kategorie = regionäre Lymphknotenmetastasierung nach klinischer (*clinical*, c)/pathologischer (p) TNM-Klassifikation; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläre Ausbreitung; HPV = Humaner Papillomavirus; ND = Neck-Dissection; pT-Kategorie = Ausdehnung des Primärtumors nach pathologischer (p) TNM-Klassifikation; TLM = Transorale Lasermikrochirurgie.

Tabelle A. 3: Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds

Charakteristik	Gesamt		p16-positiv		P <sup>a</sup>	HPV-positiv		P <sup>a</sup>	p16-positiv				P <sup>a</sup>								
			p16-negativ			HPV-negativ			HPV-positiv		HPV-negativ			p16-negativ							
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]							
Gesamt	74	100	47	100,0		32	100,0	42	100	25	100	22	100	7	100	20	100				
Rezidiv																					
Nein	59	79,7	41	87,2	18	66,7	0,034	25	78,1	34	81,0	<b>0,764</b>	23	92,0	18	81,8	2	28,6	16	80,0	<b>0,003</b>
Ja	15	20,3	6	12,8	9	33,3		7	21,9	8	19,0		2	8,0	4	18,2	5	71,4	4	20,0	
Lokal	9	12,2	3	6,4	6	22,2		4	12,5	5	11,9		1	4,0	2	9,1	3	42,9	3	15,0	
Lokoregionär	2	2,7	1	2,1	1	3,7		0	0,0	2	4,8		0	0,0	1	4,5	0	0,0	1	5,0	
Regionär	4	5,4	2	4,3	2	7,4		3	9,4	1	2,4		1	4,0	1	4,5	2	28,6	0	0,0	
Zeit bis zum Rezidiv; Mittelwert ± SD [Monate]	15,0 ± 13,5		22,4 ± 17,3		10,1 ± 7,8		13,9 ± 12,5		16,0 ± 15,1		20,1 ± 20,6		11,4 ± 18,8		23,5 ± 10,0		8,4 ± 4,7				
Fernmetastase im Verlauf																					
Nein	66	89,2	43	91,5	23	85,2	0,401	30	93,8	36	85,7	0,270	24	96,0	19	86,4	6	85,7	17	85,0	0,607
Ja	8	10,8	4	8,5	4	14,8		2	6,3	6	14,3		1	4,0	3	13,6	1	14,3	3	15,0	
Zeit bis zur Metastase; Mittelwert ± SD [Monate]	15,0 ± 13,5		22,4 ± 17,3		10,1 ± 7,8		13,9 ± 12,5		16,0 ± 15,1		20,1 ± 20,6		11,4 ± 18,8		23,5 ± 10,0		8,4 ± 4,7				
Zweitmalignome																					
Nein	69	93,2	44	93,6	25	92,6	0,866	31	96,9	38	90,5	0,277	24	96,0	20	90,9	7	100,0	18	90,0	0,721
Ja	5	6,8	3	6,4	2	7,4		1	3,1	4	9,5		1	4,0	2	9,1	0	0,0	2	10,0	
Kopf-Hals-Region	3	4,1	2	4,3	1	3,7		0	0,0	3	7,1		0	0,0	2	9,1	0	0,0	1	5,0	
Außerhalb der Kopf-Hals-Region	2	2,7	1	2,1	1	3,7		1	3,1	1	2,4		1	4,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0	

Das Auftreten lokaler und/oder regionaler Rezidive, Fernmetastasen und Zweitmalignome bei OPSCCs der Tonsillenregion oder des Zungengrunds ist für das Gesamtkollektiv sowie stratifiziert nach dem p16-Status, HPV-Status und der Kombination beider Marker modifiziert nach Weiss et al. (2021) dargestellt (Weiss et al. 2021). Die P-Werte des Pearson Chi-Quadrat-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der p16-HPV-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Pearson Chi-Quadrat-Test zwischen den Gruppen „Nein“ und „Ja“.

Abkürzungen: HPV = Humaner Papillomavirus; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma* = Plattenepithelkarzinom des Oropharynx.

### 6.3 Anhang MicroRNA-Studie

Tabelle A. 4: Expression der getesteten miRNAs in OPSCCs verglichen mit benignen Kontrollen

miRNA	Gesamtkollektiv, n = 45		p16-positiv, n = 26		p16-negativ, n = 19	
	RFC	P	RFC	P	RFC	P
miR-21-5p	4,09	<b>0,0002</b>	4,19	<b>0,001</b>	3,95	<b>0,002</b>
miR-29c-3p	0,39	<b>0,003</b>	0,38	<b>0,01</b>	0,40	<b>0,01</b>
miR-30e-5p	1,53	0,71	1,38	0,73	1,78	0,77
miR-34c-5p	2,26	<b>0,01</b>	2,09	<b>0,02</b>	2,52	<b>0,02</b>
miR-99a-5p	0,49	0,12	0,62	0,32	0,35	0,07
miR-143-3p	0,92	0,46	1,16	0,9	0,67	0,1
miR-146a-5p	0,42	<b>0,01</b>	0,57	0,06	0,28	<b>0,004</b>
miR-182-5p	0,92	0,87	0,81	0,68	1,08	0,84
miR-200b-5p	4,38	<b>0,005</b>	4,86	<b>0,01</b>	3,81	<b>0,02</b>
miR-205-5p	1,93	<b>0,02</b>	1,84	0,06	2,07	<b>0,03</b>
miR-223-3p	1,27	0,47	1,02	0,86	1,73	0,09

Die miRNA-Expression der OPSCCs ist im Vergleich zum benignen oropharyngealen Gewebe der Kontrollgruppe als RFC dargestellt. Dabei entspricht ein RFC < 1 einer relativ geringeren Expression, ein RFC > 1 einer relativ höheren Expression, eine RFC = 1 entspricht einer identischen Expression im Tumorgewebe. Die P-Werte des Mann-Whitney-U Tests sind aufgeführt. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Abkürzungen: OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; RFC = *relative fold change*, relative (Expressions-) Änderung zwischen OPSCCs vs. benignen Kontrollen.

**Tabelle A. 5: miRNA-Expression im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose im Gesamtkollektiv**

Charakteristikum oder Endpunkt	Gesamtkollektiv, n = 45								
	miR-21 -5p	miR-29c -3p	miR-30e -5p	miR-34c -5p	miR-99a -5p	miR-143 -3p	miR-146a -5p	miR-200b -5p	miR-223 -3p
Geschlecht <sup>a</sup>	0,876	0,140	0,723	0,228	0,702	0,342	0,966	0,561	0,527
Alter <sup>b</sup>	0,940	0,349	0,699	0,300	0,163	0,712	0,662	0,843	0,640
Lokale Tumorausdehnung <sup>c</sup>	0,086	0,608	0,460	0,180	0,323	0,136	0,276	0,990	0,402
Lymphknotenmetastasierung <sup>d</sup>	<b>0,040</b>	0,262	0,854	0,921	0,640	0,702	0,831	0,487	0,081
ECS <sup>e, g</sup>	0,067	0,547	0,702	0,978	0,132	0,662	0,763	1	<b>0,031</b>
Stadiengruppen <sup>a</sup>	0,236	0,978	0,890	0,978	0,978	0,978	0,978	0,804	0,601
Differenzierung <sup>f</sup>	0,787	0,542	0,067	0,580	0,600	0,152	0,239	0,854	0,854
Keratinisierung <sup>a</sup>	0,135	0,772	0,069	0,635	0,586	0,251	0,113	0,161	0,635
Invasion der Lymphgefäße <sup>a, g</sup>	0,281	0,975	<b>0,006</b>	<b>0,002</b>	0,486	0,657	0,447	0,568	0,899
Veneninvasion <sup>a, g</sup>	0,401	0,11	1	0,936	0,66	0,873	0,093	0,472	0,631
Alkohol <sup>a</sup>	0,247	0,845	0,76	0,037	0,154	0,257	0,386	0,227	0,776
Tabak <sup>a, g</sup>	0,759	0,982	0,657	0,125	0,724	0,794	0,882	0,547	0,566
Tabak- und/oder Alkohol <sup>a, g</sup>	0,407	0,749	0,831	<b>0,026</b>	0,522	0,507	0,831	0,434	0,670
p16-Status	0,722	0,827	0,845	0,621	0,428	0,179	0,083	0,573	0,075
OS HR	0,68	0,87	1,15	0,75	0,63	0,57	0,58	0,69	0,91
95 %-CI	0,24	0,32	0,42	0,27	0,23	0,2	0,21	0,25	0,33
P <sup>h</sup>	-1,91	-2,41	-3,18	-2,07	-1,78	-1,61	-1,65	-1,95	-2,52
DSS HR	0,46	0,79	0,79	0,57	0,38	0,28	0,30	0,49	0,86
95 %-CI	0,6	0,59	1,67	0,81	0,59	1,41	0,52	0,63	1,01
P <sup>h</sup>	0,14	0,14	0,4	0,2	0,14	0,34	0,12	0,15	0,25
PFS HR	-2,51	-2,47	-6,97	-3,24	-2,46	-5,9	-2,18	-2,63	-4,06
95 %-CI	0,83	1,28	0,99	1,1	1,19	0,68	0,51	0,62	0,84
P <sup>h</sup>	0,37	0,57	0,44	0,49	0,53	0,31	0,23	0,28	0,38
RFS HR	-1,86	-2,86	-2,2	-2,47	-2,65	-1,53	-1,17	-1,41	-1,88
95 %-CI	0,66	0,55	0,97	0,81	0,68	0,35	0,11	0,25	0,674
P <sup>h</sup>	0,71	0,98	1,09	1,29	1,13	0,88	0,49	0,49	0,71
LCR HR	0,29	0,4	0,44	0,52	0,46	0,36	0,19	0,19	0,29
95 %-CI	-1,78	-2,41	-2,68	-3,2	-2,78	-2,17	-1,22	-1,26	-1,78
P <sup>h</sup>	0,47	0,96	0,85	0,59	0,79	0,78	0,12	0,13	0,466
LCR HR	2,06	2,28	0,5	1,91	2,01	0,4	0,17	0,19	0,84
95 %-CI	0,38	0,42	0,09	0,35	0,37	0,07	0,02	0,02	0,38
P <sup>h</sup>	-11,24	-12,43	-2,71	-10,41	-11,02	-2,18	-1,42	-1,67	-1,88
P <sup>h</sup>	0,39	0,33	0,41	0,45	0,41	0,27	0,06	0,10	0,67

Ergebnisse potentieller Assoziationen der Expression von miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-30e-5p, miR-34c-5p, miR-99a-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-200b-5p und miR-223-3p mit Patienten- und Erkrankungscharakteristika sind für das Gesamtkollektiv dargestellt. Die P-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt. Die Vergleichsgruppen werden in den Notizen erläutert. Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Mann-Whitney-U-Test; <sup>b</sup> Spearmanscher-Rangkorrelations-Test; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit begrenzter (pT1-2) vs. fortgeschrittener (pT3-4a) lokaler Tumorausdehnung; <sup>d</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit vs. ohne Lymphknotenmetastase (N0); <sup>e</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen Patienten mit ECS vs. Patienten ohne ECS (N+ ECS-/N0); <sup>f</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit hoher/moderater vs. schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>g</sup> Ausschluss von Patienten ohne verfügbare Information; <sup>h</sup> P-Wert des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit  $\geq$  vs.  $<$  medianen Expression in der jeweiligen Gruppe.

Abkürzungen: CI = *confidence interval*, Konfidenzintervall; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläres Tumorwachstum; HR = Hazard Ratio; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; miRNA = MicroRNA; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.

**Tabelle A. 6: miRNA-Expression im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose in der p16-positiven Untergruppe**

Charakteristikum oder Endpunkt	p16-positive Untergruppe, n = 26									
	miR-21 -5p	miR-29c -3p	miR-30e -5p	miR-34c -5p	miR-99a -5p	miR-143 -3p	miR-146a -5p	miR-200b -5p	miR-223 -3p	
Geschlecht <sup>a</sup>	0,381	0,201	0,738	0,976	0,784	0,346	0,378	0,447	0,523	
Alter <sup>b</sup>	0,677	0,274	0,985	0,324	0,057	0,782	0,464	0,964	0,660	
Lokale Tumorausdehnung <sup>c</sup>	0,135	0,795	0,896	0,269	0,051	0,242	1	0,948	0,118	
Lymphknotenmetastasierung <sup>d</sup>	0,149	0,688	0,574	0,470	1	0,748	0,172	0,422	0,688	
ECS <sup>e, g</sup>	0,325	0,602	0,954	0,643	0,385	1	0,602	0,524	0,297	
Stadiengruppen <sup>a</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Differenzierung <sup>f</sup>	0,500	0,271	0,644	0,696	0,749	0,082	0,644	0,915	0,749	
Keratinisierung <sup>a</sup>	0,257	0,216	0,580	0,544	0,445	0,077	0,732	0,133	0,580	
Invasion der Lymphgefäße <sup>a, g</sup>	0,879	0,403	<b>0,015</b>	0,081	0,82	0,595	0,129	0,543	0,095	
Veneninvasion <sup>a, g</sup>	0,291	0,248	0,209	0,651	0,451	0,960	0,248	0,340	0,960	
Alkohol <sup>a</sup>	0,183	0,415	0,463	0,314	0,463	0,807	0,849	0,289	0,538	
Tabak <sup>a, g</sup>	0,798	0,898	0,682	0,137	0,918	0,383	0,608	0,442	0,463	
Tabak- und/oder Alkohol <sup>a, g</sup>	0,598	0,868	0,560	0,127	0,760	0,332	0,360	0,934	0,560	
OS	HR	0,74	1,46	0,84	0,37	0,36	0,34	0,82	1,54	0,78
	95 %-CI	0,17	0,33	0,19	0,07	0,07	0,07	0,18	0,34	0,17
	P <sup>h</sup>	-3,31	-6,53	-3,75	-1,88	-1,84	-1,74	-3,66	-6,89	-3,47
DSS	HR	0,69	0,62	0,82	0,21	0,20	0,17	0,79	0,57	0,74
	95 %-CI	1	1,09	1,14	0,92	0,31	0,84	1,09	1,15	1,04
	P <sup>h</sup>	0,14	0,15	0,16	0,13	0,03	0,12	0,15	0,16	0,15
	P <sup>h</sup>	-7,09	-7,75	-8,11	-6,51	-2,94	-5,95	-7,75	-8,15	-7,4
	P <sup>h</sup>	1,00	0,93	0,90	0,93	0,28	0,86	0,93	0,89	0,968
PFS	HR	1,11	1,72	1,12	0,6	0,82	0,36	0,41	1,55	0,7
	95 %-CI	0,32	0,48	0,32	0,17	0,24	0,09	0,11	0,44	0,2
	P <sup>h</sup>	-3,84	-6,12	-3,87	-2,12	-2,82	-1,4	-1,59	-5,51	-2,49
	P <sup>h</sup>	0,87	0,40	0,86	0,42	0,75	0,12	0,18	0,49	0,583
RFS	HR	1,11	1,14	1,11	0,88	0,8	0,5	0,32	1,03	0,63
	95 %-CI	0,28	0,28	0,28	0,22	0,2	0,12	0,06	0,26	0,15
	P <sup>h</sup>	-4,48	-4,58	-4,43	-3,52	-3,23	-2,11	-1,6	-4,14	-2,66
	P <sup>h</sup>	0,88	0,86	0,89	0,86	0,76	0,34	0,14	0,96	0,530
LCR	HR	1,85E+09	1,85E+09	2,41	1,88	1,65	1,78	0	0,57	2,27
	95 %-CI	0	0	0,22	0,17	0,15	0,16	0	0,05	0,21
	P <sup>h</sup>	-Inf	-Inf	-26,62	-20,77	-18,26	-19,68	-Inf	-6,27	-25,09
	P <sup>h</sup>	0,06	0,065	0,46	0,60	0,68	0,63	0,09	0,64	0,49

Ergebnisse potentieller Assoziationen der Expression von miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-30e-5p, miR-34c-5p, miR-99a-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-200b-5p und miR-223-3p mit Patienten- und Erkrankungscharakteristika sind für die p16-positive Untergruppe dargestellt. Die P-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt (Details siehe Notizen). Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Mann-Whitney-U-Test; <sup>b</sup> Test der Spearman-Rangkorrelation; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit begrenzter (pT1–2) vs. fortgeschrittener (pT3–4a) lokaler Tumorausdehnung; <sup>d</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit vs. ohne Lymphknotenmetastase (N0); <sup>e</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen Patienten mit ECS vs. Patienten ohne ECS (N+ ECS-/N0); <sup>f</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit hoher/moderater vs. schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>g</sup> Exklusion von Patienten ohne verfügbare Information; <sup>h</sup> P-Wert des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit  $\geq$  vs.  $<$  medianen Expression in der jeweiligen Gruppe.

Abkürzungen: CI = *confidence interval*, Konfidenzintervall; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläres Tumorwachstum; HR = Hazard Ratio; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; miRNA = MicroRNA; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.

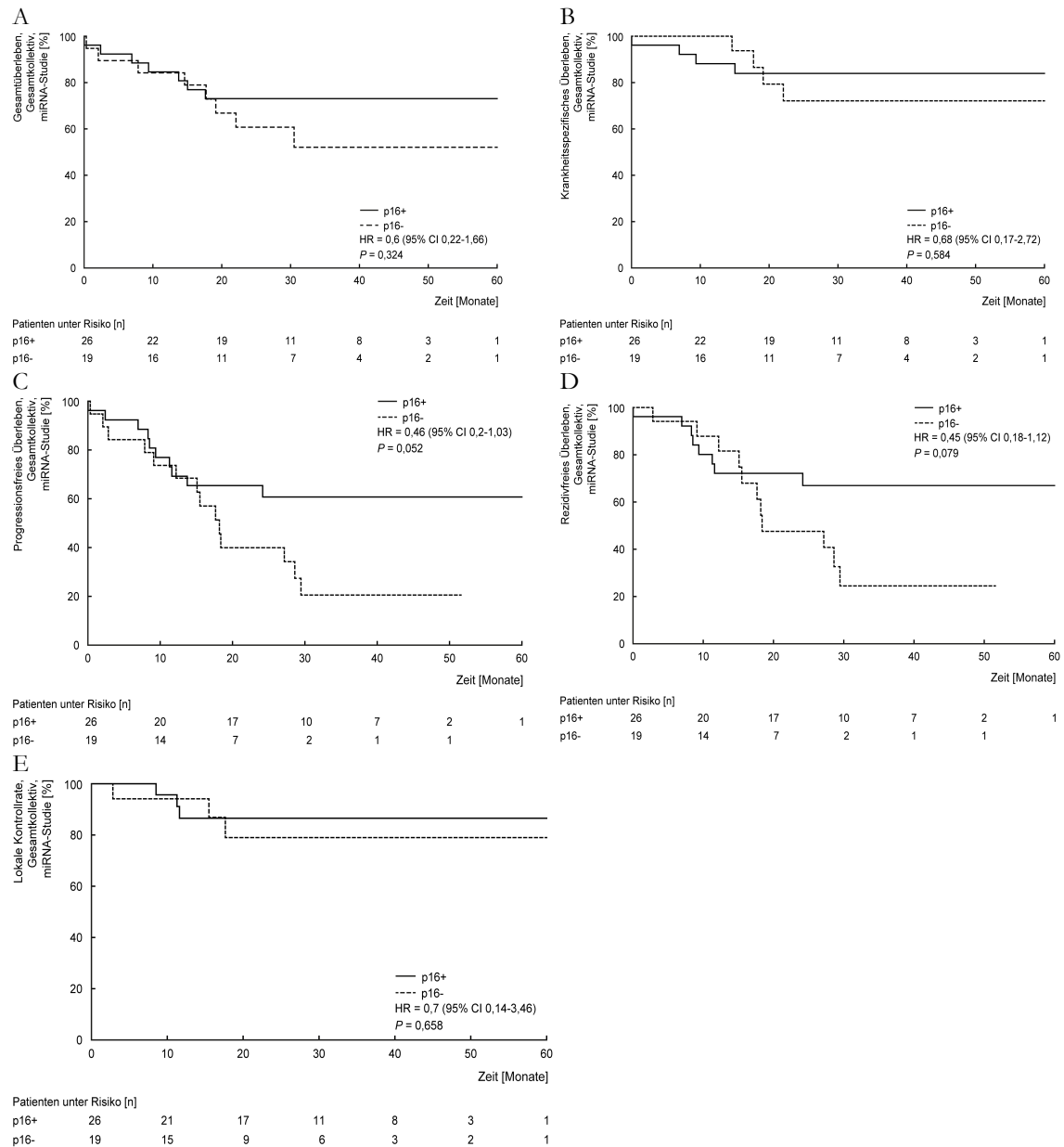
**Tabelle A. 7: miRNAs im Kontext der Patienten- und Erkrankungscharakteristika sowie der Prognose in der p16-negativen Untergruppe**

Charakteristikum oder Endpunkt	p16-negative Untergruppe, n = 19									
	miR-21 -5p	miR-29c -3p	miR-30e -5p	miR-34c -5p	miR-99a -5p	miR-143 -3p	miR-146a -5p	miR-200b -5p	miR-223 -3p	
Geschlecht <sup>a</sup>	0,867	0,615	0,342	0,0504	0,199	0,615	0,342	0,867	0,955	
Alter <sup>b</sup>	0,652	0,932	0,632	0,904	0,571	0,955	<b>0,020</b>	0,379	0,53	
Lokale Tumorausdehnung <sup>c</sup>	0,342	0,433	0,342	0,650	0,650	0,386	<b>0,035</b>	0,901	0,483	
Lymphknotenmetastasierung <sup>d</sup>	0,148	0,313	0,759	0,693	0,630	0,630	0,826	0,759	0,174	
ECS <sup>e, g</sup>	0,337	0,456	0,337	0,749	0,594	0,915	0,337	0,337	0,303	
Stadiengruppen <sup>a</sup>	0,259	0,947	0,842	0,947	0,947	0,947	0,740	0,947	0,947	
Differenzierung <sup>f</sup>	0,331	0,963	<b>0,008</b>	0,247	0,547	0,963	0,127	0,817	0,431	
Keratinisierung <sup>a</sup>	0,342	0,342	<b>0,035</b>	0,231	0,967	0,71	<b>0,004</b>	0,71	0,836	
Invasion der Lymphgefäße <sup>a, g</sup>	0,175	0,303	0,255	<b>0,015</b>	0,143	0,957	0,212	0,704	0,416	
Veneninvasion <sup>a, g</sup>	1	0,327	0,215	0,948	0,948	0,845	0,327	0,058	0,845	
Alkohol <sup>a</sup>	0,881	0,147	0,516	<b>0,024</b>	0,080	0,211	0,516	0,453	0,967	
Tabak <sup>a, g</sup>	0,836	0,901	0,342	0,342	0,536	0,433	0,433	0,650	0,516	
Tabak- und/oder Alkohol <sup>a, g</sup>	0,488	0,775	0,391	0,094	0,488	0,903	0,438	0,178	0,903	
OS	HR	0,63	0,51	1,54	1,18	1,16	0,95	0,41	0,61	0,54
	95 %-CI	0,15	0,12	0,37	0,28	0,28	0,24	0,09	0,14	0,13
	P <sup>h</sup>	-2,64	-2,19	-6,48	-5,03	-4,74	-3,81	-1,82	-2,56	-2,29
DSS	HR	0,52	0,36	0,55	0,82	0,83	0,94	0,23	0,49	0,40
	95 %-CI	0,39	0,33	3,09	0,65	1,54	3,09	0,26	1,02	0,86
	P <sup>h</sup>	0,04	0,03	0,32	0,09	0,21	0,32	0,03	0,14	0,12
PFS	HR	-3,79	-3,18	-29,86	-4,69	-11,12	-29,86	-2,54	-7,31	-6,14
	95 %-CI	0,40	0,31	0,31	0,67	0,67	0,31	0,22	0,98	0,883
	P <sup>h</sup>	0,54	0,92	1,15	1,62	1,84	1,22	0,66	0,35	0,69
RFS	HR	0,18	0,32	0,4	0,54	0,63	0,42	0,23	0,11	0,24
	95 %-CI	-1,6	-2,63	-3,32	-4,85	-5,36	-3,52	-1,93	-1,06	-1,99
	P <sup>h</sup>	0,26	0,88	0,80	0,38	0,26	0,72	0,45	0,052	0,490
LCR	HR	0,38	0,75	1,53	1,54	1,81	1,61	0,72	0,32	0,77
	95 %-CI	0,11	0,22	0,45	0,45	0,55	0,47	0,21	0,09	0,23
	P <sup>h</sup>	-1,32	-2,57	-5,24	-5,29	-6,02	-5,54	-2,43	-1,14	-2,54
LCR	HR	0,11	0,64	0,50	0,49	0,32	0,44	0,60	0,07	0,669
	95 %-CI	0,46	0,54	0	1,72	2,75	0	0,43	0	1,72
	P <sup>h</sup>	0,04	0,05	0	0,16	0,24	0	0,04	0	0,16
		-5,13	-5,94	-Inf	-18,96	-31,06	-Inf	-4,74	-Inf	-18,96
		0,52	0,61	0,06	0,65	0,39	0,06	0,48	0,06	0,654

Ergebnisse potentieller Assoziationen der Expression von miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-30e-5p, miR-34c-5p, miR-99a-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-200b-5p und miR-223-3p mit Patienten- und Erkrankungscharakteristika sind für die p16-negative Untergruppe dargestellt. Die P-Werte des Mann-Whitney-U-Tests zwischen Patienten der Kategorien der einzelnen Gruppen sind aufgeführt (Details siehe Notizen). Signifikante P-Werte ( $P \leq 0,05$ ) sind fettgedruckt dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf Patienten der miRNA-Studie.

Notizen: <sup>a</sup> Mann-Whitney-U-Test; <sup>b</sup> Test der Spearman-Rangkorrelation; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit begrenzter (pT1-2) vs. fortgeschrittener (pT3-4a) lokaler Tumorausdehnung; <sup>d</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit vs. ohne Lymphknotenmetastase (N0); <sup>e</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen Patienten mit ECS vs. Patienten ohne ECS (N+ ECS-/N0); <sup>f</sup> Mann-Whitney-U-Test zwischen OPSCCs mit hoher/moderater vs. schlechter histopathologischer Differenzierung; <sup>g</sup> Ausschluss von Patienten ohne verfügbare Information; <sup>h</sup> P-Wert des Log-Rang-Tests zwischen Patienten mit  $\geq$  vs.  $<$  medianen Expression in der jeweiligen Gruppe.

Abkürzungen: CI = *confidence interval*, Konfidenzintervall; DSS = *disease-specific survival*, krankheitsspezifisches Überleben; ECS = *extracapsular spread*, extrakapsuläres Tumorstadium; HR = Hazard Ratio; LCR = *local control rate*, lokale Kontrollrate; miRNA = MicroRNA; OPSCC = *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, Plattenepithelkarzinom des Oropharynx; OS = *overall survival*, Gesamtüberleben; PFS = *progression-free survival*, progressionsfreies Überleben; RFS = *recurrence-free survival*, rezidivfreies Überleben.



**Abbildung A. 4: Ereigniszeitanalysen bei OPSCCs stratifiziert nach dem p16-Status in der miRNA-Studie.** Die Kaplan-Meier-Kurven für A, das Gesamtüberleben, B, das krankheitsspezifische Überleben, C, das progressionsfreie Überleben, D, das rezidivfreie Überleben sowie E, die lokale Kontrolle sind für das Gesamtkollektiv der miRNA-Studie stratifiziert nach dem p16-Status und modifiziert nach Weiss et al. (2022) dargestellt (Weiss et al. 2022). Der P-Wert des Log-Rang-Tests ist angegeben. Die Patienten unter Risiko sind unterhalb der Abszisse bezogen auf den jeweiligen Beobachtungszeitpunkt aufgeführt.



## 7 Literaturverzeichnis

Ackerman D, Laszlo M, Provisor A, Yu A (2018): Nutrition Management for the Head and Neck Cancer Patient. *Cancer Treat Res* 174, 187-208

Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, Brizel DM, Burtness B, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, et al. (2017): NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 15, 761-770

Adelstein DJ, Ismaila N, Ku JA, Burtness B, Swiecicki PL, Mell L, Beitler JJ, Gross N, Jones CU, Kaufman M, et al. (2019): Role of Treatment Deintensification in the Management of p16+ Oropharyngeal Cancer: ASCO Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol* 37, 1578-1589

Alabi O, O'Neill JP (2020): 'Good cancer gone bad': a narrative review of HPV oropharyngeal cancer and potential poor outcomes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 277, 2185-2191

Albers AE, Qian X, Kaufmann AM, Coords A (2017): Meta analysis: HPV and p16 pattern determines survival in patients with HNSCC and identifies potential new biologic subtype. *Sci Rep* 7, 16715

Ambrosch P (2003): [Lasers in the upper aerodigestive tract in malignant diseases]. *Laryngorhinootologie* 82, S114-143

Ambrosch P, Brinck U, Fischer G, Steiner W (1994): [Special aspects of histopathologic diagnosis in laser microsurgery of cancers of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie* 73, 78-83

Amin MB, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society.: AJCC cancer staging manual; Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FCAP ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS and 16 others ; Donna M. Gress, RHIT, CTR - Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM - Managing editor. Auflage; American Joint Committee on Cancer, Springer, Chicago IL 2017

Ancykowski MZ, Ihler F, Bertlich M, Spiegel JL, Canis M, Unger K, Kitz J, Jakob M, Weiss BG (2022): MicroRNA-182-5p und microRNA-205-5p als potenzielle Biomarker zur weiteren prognostischen Stratifizierung von Patienten mit p16-positivem Oropharynxkarzinom. *Laryngorhinootologie* 101, S49-S50

Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, et al. (1998): Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in

tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 58, 5-13

Ang KK, Trotti A, Brown BW, Garden AS, Foote RL, Morrison WH, Geara FB, Klotch DW, Goepfert H, Peters LJ (2001): Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 571-578

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363, 24-35

Antoniou M, Jorgensen AL, Kolamunnage-Dona R (2016): Biomarker-Guided Adaptive Trial Designs in Phase II and Phase III: A Methodological Review. *PLoS One* 11, e0149803

Arbyn M, de Sanjose S, Saraiya M, Sideri M, Palefsky J, Lacey C, Gillison M, Bruni L, Ronco G, Wentzensen N, et al. (2012): EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int J Cancer* 131, 1969-1982

Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ (2009): MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 2850-2855

Barry CP, Wong D, Clark JR, Shaw RJ, Gupta R, Magennis P, Triantafyllou A, Gao K, Brown JS (2017): Postoperative radiotherapy for patients with oral squamous cell carcinoma with intermediate risk of recurrence: A case match study. *Head Neck* 39, 1399-1404

Berania I, Cardin GB, Clement I, Guertin L, Ayad T, Bissada E, Nguyen-Tan PF, Filion E, Guilmette J, Gologan O, et al. (2017): Four PTEN-targeting co-expressed miRNAs and ACTN4- targeting miR-548b are independent prognostic biomarkers in human squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Cancer* 141, 2318-2328

Bernal-Sprekelsen M, Dazert S, Sudhoff H, Blanch JL, Vilaseca I (2009): [Complications of transoral laser surgery for malignant tumors of the larynx and hypopharynx]. *Laryngorhinootologie* 88, 28-34

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM (2010): Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79

Bernier J, Cooper JS (2005): Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence? *Oncologist* 10, 215-224

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang KK, et al. (2005): Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 27, 843-850

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, et al. (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350, 1945-1952

Bersani C, Mints M, Tertipis N, Haegglblom L, Nasman A, Romanitan M, Dalianis T, Ramqvist T (2018): MicroRNA-155, -185 and -193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 82, 8-16

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282-3287

Bohm F, Greve J, Riepl R, Hoffmann TK, Schuler PJ (2021): [Robotics in otorhinolaryngology, head and neck surgery]. *HNO* 69, 765-776

Bozec A, Zangari J, Butori-Pepino M, Ilie M, Lalvee S, Juhel T, Butori C, Brest P, Hofman P, Vouret-Craviari V (2017): MiR-223-3p inhibits angiogenesis and promotes resistance to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8, 57174-57186

Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004): Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 96, 998-1006

Bratman SV, Bruce JP, O'Sullivan B, Pugh TJ, Xu W, Yip KW, Liu FF (2016): Human Papillomavirus Genotype Association With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* 2, 823-826

Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C: TNM classification of malignant tumours; Eighth edition. Auflage; John Wiley & Sons, Inc., Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ 2017

Brito BL, Lourenco SV, Damascena AS, Kowalski LP, Soares FA, Coutinho-Camillo CM (2016): Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 45, 647-654

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, et al. (1996): Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56, 2488-2492

Canadas MP, Cirigliano V, Darwich L, Sirera G, Coll J, Clotet B, Videla S (2012): Comparison of the f-HPV typing and Hybrid Capture II(R) assays for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Virol Methods* 183, 14-18

Cancer Genome Atlas N (2015): Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576-582

Cancer Genome Atlas Research N, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM (2013): The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 45, 1113-1120

Canis M, Wolff HA, Ihler F, Matthias C, Steiner W (2015): Oncologic results of transoral laser microsurgery for squamous cell carcinoma of the posterior pharyngeal wall. *Head Neck* 37, 156-161

Canis M, Ihler F, Martin A, Wolff HA, Matthias C, Steiner W (2014): Enoral laser microsurgery for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 36, 787-794

Cao MQ, You AB, Zhu XD, Zhang W, Zhang YY, Zhang SZ, Zhang KW, Cai H, Shi WK, Li XL, et al. (2018): miR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a. *J Hematol Oncol* 11, 12

Cao P, Zhou L, Zhang J, Zheng F, Wang H, Ma D, Tian J (2013): Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35, 720-728

Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masia E, Casanova J, Fernandez-Serra A, Rubio L, Ramirez-Backhaus M, Arminan A, et al. (2014): Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 192, 252-259

Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, Clavero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T, et al. (2016): HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 108, djv403

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al. (2012): The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401-404

Chatfield-Reed K, Gui S, O'Neill WQ, Teknos TN, Pan Q (2020): HPV33+ HNSCC is associated with poor prognosis and has unique genomic and immunologic landscapes. *Oral Oncol* 100, 104488

Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML (2013): Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 31, 4550-4559

Chen J, Deng Y, Ao L, Song Y, Xu Y, Wang CC, Choy KW, Tony Chung KH, Du Q, Sui Y, et al. (2019): The high-risk HPV oncogene E7 upregulates miR-182 expression through the TGF-beta/Smad pathway in cervical cancer. *Cancer Lett* 460, 75-85

Chen MM, Harris JP, Hara W, Sirjani D, Divi V (2016): Association of Postoperative Radiotherapy With Survival in Patients With N1 Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 142, 1224-1230

Chen TC, Wang CT, Ko JY, Lou PJ, Yang TL, Ting LL, Wang CW, Hu YL, Wang CP (2010): Postoperative radiotherapy for primary early oral tongue cancer with pathologic N1 neck. *Head Neck* 32, 555-561

Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith RV, Prystowsky MB, et al. (2009): Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 174, 736-745

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159

Chou CH, Tu HF, Kao SY, Chiang CF, Liu CJ, Chang KW, Lin SC (2018): Targeting of miR-31/96/182 to the Numb gene during head and neck oncogenesis. *Head Neck* 40, 808-817

Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, Sabedot TS, Malta TM, Pagnotta SM, Castiglioni I, et al. (2016): TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 44, e71

Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ (2009): National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 31, 748-758

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, et al. (2004): Postoperative concurrent radiotherapy and

chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350, 1937-1944

Culie D, Viotti J, Modesto A, Schiappa R, Chamorey E, Dassonville O, Poissonnet G, Guelfucci B, Bizeau A, Vergez S, et al. (2021): Upfront surgery or definitive radiotherapy for patients with p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma. A GETTEC multicentric study. *Eur J Surg Oncol* 47, 367-374

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007): Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356, 1944-1956

Dalton CL, Milinis K, Houghton D, Ridley P, Davies K, Williams R, Hamilton D, Wilkie MD, Markey A, Clarke K, et al. (2020): Transoral laser microsurgery and radiotherapy for oropharyngeal squamous cell carcinoma: Equitable survival and enhanced function compared with contemporary standards of care. *Eur J Surg Oncol* 46, 2042-2049

de Carvalho AC, Scapulatempo-Neto C, Maia DC, Evangelista AF, Morini MA, Carvalho AL, Vettore AL (2015): Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med* 13, 108

de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S (2017): Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* 141, 664-670

Denis F, Garaud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Calais G (2004): Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Clin Oncol* 22, 69-76

Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study G, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK, Hillman R, Spaulding M, Laramore GE, Endicott JW, McClatchey K, Henderson WG (1991): Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 324, 1685-1690

Deschuymer S, Dok R, Laenen A, Hauben E, Nuyts S (2018): Patient Selection in Human Papillomavirus Related Oropharyngeal Cancer: The Added Value of Prognostic Models in the New TNM 8th Edition Era. *Front Oncol* 8, 273

Dhanireddy B, Burnett NP, Sanampudi S, Wooten CE, Slezak J, Shelton B, Shelton L, Shearer A, Arnold S, Kudrimoti M, et al. (2019): Outcomes in surgically resectable oropharynx cancer treated with transoral robotic surgery versus definitive chemoradiation. *Am J Otolaryngol* 40, 673-677

Duan B, Guo T, Sun H, Cai R, Rui Q, Xi Z (2017): miR-205 as a biological marker in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 91, 823-830

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937

Edge SB, American Joint Committee on Cancer.: AJCC cancer staging manual; 7th. Auflage; Springer, New York 2010

Emmett S, Whiteman DC, Panizza BJ, Antonsson A (2018): An Update on Cellular MicroRNA Expression in Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 95, 193-201

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (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, 261-269

Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, Jordan RC, Rischin D, Sturgis EM, Bell D, Lingen MW, Harichand-Herdt S, Thibo J, et al. (2018): Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists Guideline. *J Clin Oncol* 36, 3152-3161

Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, Soulieres D, Trotti A, Avizonis V, Ridge JA, et al. (2014): Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32, 3365-3373

Fakhry C, Zhang Q, Gillison ML, Nguyen-Tan PF, Rosenthal DI, Weber RS, Lambert L, Trotti AM, 3rd, Barrett WL, Thorstad WL, et al. (2019): Validation of NRG oncology/RTOG-0129 risk groups for HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell cancer: Implications for risk-based therapeutic intensity trials. *Cancer* 125, 2027-2038

Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK (2008): Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205. *Transl Oncol* 1, 202-208

Ganci F, Sacconi A, Manciooco V, Sperduti I, Battaglia P, Covello R, Muti P, Strano S, Spriano G, Fontemaggi G, et al. (2016): MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 38 Suppl 1, E189-197

Ganci F, Sacconi A, Bossel Ben-Moshe N, Manciooco V, Sperduti I, Strigari L, Covello R, Benevolo M, Pescarmona E, Domany E, et al. (2013): Expression of TP53 mutation-

associated microRNAs predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Ann Oncol* 24, 3082-3088

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P (2008): Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122, 155-164

Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, Lewis JS, Jr., Wang X (2013): A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119, 72-80

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C (2015): Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 33, 3235-3242

Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 100, 407-420

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Vignone M, Symer DE, et al. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92, 709-720

Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Sturgis EM, Burtneß B, Ridge JA, Ringash J, et al. (2019): Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet* 393, 40-50

Golusinski W, Golusinska-Kardach E (2019): Current Role of Surgery in the Management of Oropharyngeal Cancer. *Front Oncol* 9, 388

Graham SV (2017): The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)* 131, 2201-2221

Grant DG, Hinni ML, Salassa JR, Perry WC, Hayden RE, Casler JD (2009): Oropharyngeal cancer: a case for single modality treatment with transoral laser microsurgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135, 1225-1230

Griffiths-Jones S (2004): The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-111

Gulei D, Magdo L, Jurj A, Raduly L, Cojocneanu-Petric R, Moldovan A, Moldovan C, Florea A, Pasca S, Pop LA, et al. (2018): The silent healer: miR-205-5p up-regulation inhibits



epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells by indirectly up-regulating E-cadherin expression. *Cell Death Dis* 2, 66

Guo Y, Qiao X, Zhu L, Song R (2020): MicroRNA-182-5p Modulates Oral Squamous Cell Carcinoma Migration and Invasion Via Targeting MTSS1 Gene. *Pathol Oncol Res* 26, 1007-1013

Hagman Z, Haflidadottir BS, Ceder JA, Larne O, Bjartell A, Lilja H, Edsjo A, Ceder Y (2013): miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer* 108, 1668-1676

Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996): Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16, 859-867

Harari PM, Harris J, Kies MS, Myers JN, Jordan RC, Gillison ML, Foote RL, Machtay M, Rotman M, Khuntia D, et al. (2014): Postoperative chemoradiotherapy and cetuximab for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck: Radiation Therapy Oncology Group RTOG-0234. *J Clin Oncol* 32, 2486-2495

Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, Ramnauth A, Loudig O, Keller CE, Smith R, et al. (2012): Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 180, 917-928

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, et al. (2007): Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99, 777-789

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 541-550

Haughey BH, Hinni ML, Salassa JR, Hayden RE, Grant DG, Rich JT, Milov S, Lewis JS, Jr., Krishna M (2011): Transoral laser microsurgery as primary treatment for advanced-stage oropharyngeal cancer: a United States multicenter study. *Head Neck* 33, 1683-1694

Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S (2014): MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 20, 460-469

Hess AK, Muer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M, Budach V, Tinhofer I (2017): MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 77, 3-12

Hess J, Unger K, Maihoefer C, Schuttrumpf L, Wintergerst L, Heider T, Weber P, Marschner S, Braselmann H, Samaga D, et al. (2019): A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clin Cancer Res* 25, 1505-1516

Hoffmann M, Quabius ES, Tribius S, Gebhardt S, Gorogh T, Hedderich J, Huber K, Dunst J, Ambrosch P (2018): Influence of HPV-status on survival of patients with tonsillar carcinomas (TSCC) treated by CO<sub>2</sub>-laser surgery plus risk adapted therapy - A 10 year retrospective single centre study. *Cancer Lett* 413, 59-68

Huang SH, Perez-Ordonez B, Liu FF, Waldron J, Ringash J, Irish J, Cummings B, Siu LL, Kim J, Weinreb I, et al. (2012): Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82, 276-283

Hudcova K, Raudenska M, Gumulec J, Binkova H, Horakova Z, Kostrica R, Babula P, Adam V, Masarik M (2016): Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers. *Tumour Biol* 37, 12627-12633

Hui AB, Lin A, Xu W, Waldron L, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Shi W, Bruce J, Huang SH, O'Sullivan B, et al. (2013): Potentially prognostic miRNAs in HPV-associated oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 19, 2154-2162

Ibrahim AS, Civantos FJ, Leibowitz JM, Thomas GR, Arnold DJ, Franzmann EJ, Nicolli EA, Lo K, Nemeth Z, Sargi ZB, et al. (2019): Meta-analysis comparing outcomes of different transoral surgical modalities in management of oropharyngeal carcinoma. *Head Neck* 41, 1656-1666

Iorio MV, Croce CM (2012): MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4, 143-159

Iro H, Mantsopoulos K, Zenk J, Waldfahrer F, Psychogios G (2011): [Results of transoral laser resection in T1-2 oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal carcinomas]. *Laryngorhinootologie* 90, 481-485

Jackel MC, Ambrosch P, Martin A, Steiner W (2007): Impact of re-resection for inadequate margins on the prognosis of upper aerodigestive tract cancer treated by laser microsurgery. *Laryngoscope* 117, 350-356

Jackel MC, Ambrosch P, Christiansen H, Martin A, Steiner W (2008): Value of postoperative radiotherapy in patients with pathologic N1 neck disease. *Head Neck* 30, 875-882

Jakob M, Mattes LM, Kuffer S, Unger K, Hess J, Bertlich M, Haubner F, Ihler F, Canis M, Weiss BG, et al. (2019): MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer. *Head Neck* 41, 3499-3515

Jansen L, Moratin J, Waldmann A, Zaoui K, Holleczeck B, Nennecke A, Pritzkeleit R, Plinkert PK, Hoffmann J, Arndt V (2021): [Oral and pharyngeal cancer: incidence, mortality, and survival in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 64, 941-950

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995): Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69, 2989-2997

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD (2005): Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 33, 5394-5403

Jiang L, Mao P, Song L, Wu J, Huang J, Lin C, Yuan J, Qu L, Cheng SY, Li J (2010): miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival. *Am J Pathol* 177, 29-38

Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML (2012): Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 36, 945-954

Kadletz L, Heiduschka G, Wolf A, Haug-Lettenbichler A, Poyntner L, Primosch T, Rogatsch H, Formanek M, Stadler M, Kenner L, et al. (2018): Effect of postoperative radiotherapy in pT1pN1cM0 and pT2p/cN0cM0 oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 128, 1075-1082

Kaplan EL, Meier P (1954): Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 58, 457-481

Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahner F, Zenk J, Velegrakis GA, Iro H (2012): Surgical management of T1 oropharyngeal carcinoma. *Head Neck* 34, 1277-1282

Khalid MB, Ting P, Pai A, Russo JL, Bakst R, Chai RL, Teng MS, Genden EM, Miles BA (2019): Initial presentation of human papillomavirus-related head and neck cancer: A retrospective review. *Laryngoscope* 129, 877-882

Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ, et al. (2013): Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 73, 4791-4800

Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H (2010): Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep* 23, 1625-1633

Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 162, 747-753

Ko YH, Won HS, Sun DS, An HJ, Jeon EK, Kim MS, Lee HH, Kang JH, Jung CK (2014): Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 64, 499-507

Kolenda T, Guglas K, Teresiak A, Blizniak R, Lamperska K (2019): Low let-7d and high miR-205 expression levels positively influence HNSCC patient outcome. *J Biomed Sci* 26, 17

Koefman SA, Ismaila N, Crook D, D'Cruz A, Rodriguez CP, Sher DJ, Silbermins D, Sturgis EM, Tsue TT, Weiss J, et al. (2019): Management of the Neck in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 37, 1753-1774

Kreimer AR, Chaturvedi AK, Alemany L, Anantharaman D, Bray F, Carrington M, Doorbar J, D'Souza G, Fakhry C, Ferris RL, et al. (2020): Summary from an international cancer seminar focused on human papillomavirus (HPV)-positive oropharynx cancer, convened by scientists at IARC and NCI. *Oral Oncol* 108, 104736

Kreimer AR, Ferreiro-Iglesias A, Nygard M, Bender N, Schroeder L, Hildesheim A, Robbins HA, Pawlita M, Langseth H, Schlecht NF, et al. (2019): Timing of HPV16-E6 antibody seroconversion before OPSCC: findings from the HPVC3 consortium. *Ann Oncol* 30, 1335-1343

Laccourreye O, Hans S, Menard M, Garcia D, Brasnu D, Holsinger FC (2005): Transoral lateral oropharyngectomy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: II. An analysis of the incidence, related variables, and consequences of local recurrence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131, 592-599

Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnaes E, Rossing M, Specht L, Therkildsen MH, Nauntofte B, et al. (2011): Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer* 104, 830-840

Lajer CB, Garnaes E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, Rossing M, Lajer H, Svane D, Skotte L, et al. (2012): The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer* 106, 1526-1534

Lamperska KM, Kozłowski P, Kolenda T, Teresiak A, Blizniak R, Przybyła W, Masternak MM, Golusinski P, Golusinski W (2016): Unpredictable changes of selected miRNA in expression profile of HNSCC. *Cancer Biomark* 16, 55-64

Lechner M, Chakravarthy AR, Walter V, Masterson L, Feber A, Jay A, Weinberger PM, McIndoe RA, Forde CT, Chester K, et al. (2018): Frequent HPV-independent p16/INK4A overexpression in head and neck cancer. *Oral Oncol* 83, 32-37

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011): The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 9-22

Leu M, Patzer C, Gühlich M, Possiel J, Pilavakis Y, Schirmer MA, Rieken S, Droge LH (2021): Postoperative Radiochemotherapy Using Modern Radiotherapy Techniques in Elderly Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: The Challenge of Weighing Up Benefits and Harms of Treatment Modalities in Clinical Practice. *Cancers (Basel)* 13, 3384

Lewis JS, Jr., Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, Moncur JT, Rocco JW, Schwartz MR, Seethala RR, et al. (2018): Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 142, 559-597

Li J, Hu K, Gong G, Zhu D, Wang Y, Liu H, Wu X (2017): Upregulation of MiR-205 transcriptionally suppresses SMAD4 and PTEN and contributes to human ovarian cancer progression. *Sci Rep* 7, 41330

Li JH, Sun SS, Li N, Lv P, Xie SY, Wang PY (2017): MiR-205 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Oncotarget* 8, 91938-91949

Li N, Nan CC, Zhong XY, Weng JQ, Fan HD, Sun HP, Tang S, Shi L, Huang SX (2018): miR-182-5p Promotes Growth in Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting CAMK2N1. *Cell Physiol Biochem* 49, 1329-1341

Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, et al. (2006): High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 5630-5636

Lin BM, Wang H, D'Souza G, Zhang Z, Fakhry C, Joseph AW, Drake VE, Sanguineti G, Westra WH, Pai SI (2013): Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119, 3462-3471

Liu JC, Parajuli S, Blackman E, Gibbs D, Ellis A, Hull A, Beck JR, Giri V, Iherjirka P, Khurana JS, et al. (2016): High prevalence of discordant human papillomavirus and p16 oropharyngeal squamous cell carcinomas in an African American cohort. *Head Neck* 38 *Suppl 1*, E867-872

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408

Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP, Alaoui-Jamali MA, da Silva SD (2017): Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget* 8, 55511-55524

Lv Y, Ye D, Qiu S, Zhang J, Shen Z, Shen Y, Deng H (2019): MiR-182 regulates cell proliferation and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the CRR9. *Biosci Rep* 39, BSR20191348

Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, Loomis AM, Shah JP (2017): Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67, 122-137

Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, Bruno TC, Richmon JD, Wang H, Bishop JA, et al. (2013): Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 73, 1733-1741

Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK (2015): Altered levels of miR-21, miR-125b-2\*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med* 44, 792-800

Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, Bottazzo GF (2009): Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA expression profiles. *J Biomed Biotechnol* 2009, 659028

Mazul AL, Rodriguez-Ormaza N, Taylor JM, Desai DD, Brennan P, Anantharaman D, Gheit T, Tommasino M, Abedi-Ardekani B, Olshan AF, et al. (2016): Prognostic significance of non-HPV16 genotypes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 61, 98-103

McKenna DJ, Patel D, McCance DJ (2014): miR-24 and miR-205 expression is dependent on HPV onco-protein expression in keratinocytes. *Virology* 448, 210-216

McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K (2013): Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16175-16180

Mehanna H, Evans M, Beasley M, Chatterjee S, Dilkes M, Homer J, O'Hara J, Robinson M, Shaw R, Sloan P (2016a): Oropharyngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 130, S90-S96

Mehanna H, Rischin D, Wong SJ, Gregoire V, Ferris R, Waldron J, Le QT, Forster M, Gillison M, Laskar S, et al. (2020): De-Escalation After DE-ESCALATE and RTOG 1016: A Head and Neck Cancer InterGroup Framework for Future De-Escalation Studies. *J Clin Oncol* 38, 2552-2557

Mehanna H, Wong WL, McConkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AG, Nutting C, Powell N, Al-Booz H, Robinson M, et al. (2016b): PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 374, 1444-1454

Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, et al. (2019): Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 393, 51-60

Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Hinerman RW, Werning JW, Villaret DB (2006a): Definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the base of tongue. *Am J Clin Oncol* 29, 32-39

Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Hinerman RW, Malyapa RS, Werning JW, Lansford CD, Villaret DB (2006b): Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 29, 290-297

Mihashi S, Jako GJ, Incze J, Strong MS, Vaughan CW (1976): Laser surgery in otolaryngology: interaction of CO<sub>2</sub> laser and soft tissue. *Ann N Y Acad Sci* 267, 263-294

Moergel M, Jahn-Eimermacher A, Krummenauer F, Reichert TE, Wagner W, Wendt TG, Werner JA, Al-Nawas B (2009): Effectiveness of adjuvant radiotherapy in patients with oropharyngeal and floor of mouth squamous cell carcinoma and concomitant histological

verification of singular ipsilateral cervical lymph node metastasis (pN1-state)--a prospective multicenter randomized controlled clinical trial using a comprehensive cohort design. *Trials* 10, 118

Moncrieff M, Sandilla J, Clark J, Clifford A, Shannon K, Gao K, O'Brien C (2009): Outcomes of primary surgical treatment of T1 and T2 carcinomas of the oropharynx. *Laryngoscope* 119, 307-311

Moore EJ, Hinni ML (2013): Critical review: transoral laser microsurgery and robotic-assisted surgery for oropharynx cancer including human papillomavirus-related cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 85, 1163-1167

Moore EJ, Van Abel KM, Price DL, Lohse CM, Olsen KD, Jackson RS, Martin EJ (2018): Transoral robotic surgery for oropharyngeal carcinoma: Surgical margins and oncologic outcomes. *Head Neck* 40, 747-755

Moore EJ, Olsen SM, Laborde RR, Garcia JJ, Walsh FJ, Price DL, Janus JR, Kasperbauer JL, Olsen KD (2012): Long-term functional and oncologic results of transoral robotic surgery for oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Mayo Clinic proceedings* 87, 219-225

Nagai H, Hasegawa S, Uchida F, Terabe T, Ishibashi Kanno N, Kato K, Yamagata K, Sakai S, Kawashiri S, Sato H, et al. (2018): MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP2 expression. *Int J Oncol* 52, 841-850

Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven A, Bloemena E, Lissenberg-Witte BI, Heideman DAM, Baatenburg de Jong RJ, Brakenhoff RH, Leemans CR (2018): Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol* 29, 1273-1279

Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, Bosch FX, de Sanjose S, Trottier H (2014): HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15, 1319-1331

Nichols AC, Theurer J, Prisman E, Read N, Berthelet E, Tran E, Fung K, de Almeida JR, Bayley A, Goldstein DP, et al. (2019): Radiotherapy versus transoral robotic surgery and neck dissection for oropharyngeal squamous cell carcinoma (ORATOR): an open-label, phase 2, randomised trial. *Lancet Oncol* 20, 1349-1359

No JH, Sung MW, Hah JH, Choi SH, Lee MC, Kim HS, Song YS (2015): Prevalence and prognostic value of human papillomavirus genotypes in tonsillar squamous cell carcinoma: a Korean multicenter study. *Cancer* 121, 535-544



Nunez Lopez YO, Victoria B, Golusinski P, Golusinski W, Masternak MM (2018): Characteristic miRNA expression signature and random forest survival analysis identify potential cancer-driving miRNAs in a broad range of head and neck squamous cell carcinoma subtypes. *Rep Pract Oncol Radiother* 23, 6-20

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG (1999): In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12754-12759

O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, Lee N, Riaz N, Pei X, Koefman SA, et al. (2016): Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol* 17, 440-451

Orang AV, Safaralizadeh R, Hosseinpour Feizi MA (2014): Insights into the diverse roles of miR-205 in human cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 577-583

Pan F, Mao H, Bu F, Tong X, Li J, Zhang S, Liu X, Wang L, Wu L, Chen R, et al. (2017): Sp1-mediated transcriptional activation of miR-205 promotes radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8, 5735-5752

Park K, Cho KJ, Lee M, Yoon DH, Kim J, Kim SY, Nam SY, Choi SH, Roh JL, Han MW, et al. (2013): p16 immunohistochemistry alone is a better prognosticator in tonsil cancer than human papillomavirus in situ hybridization with or without p16 immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 133, 297-304

Park YM, Kim HR, Cho BC, Keum KC, Cho NH, Kim SH (2017): Transoral robotic surgery-based therapy in patients with stage III-IV oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 75, 16-21

Paver EC, Currie AM, Gupta R, Dahlstrom JE (2020): Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV. *Pathology* 52, 179-191

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP (1997): Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79, 595-604

Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S (2002): Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40, 886-891

Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, Bruce JY, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, et al. (2020): Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 18, 873-898

Prasad G, Seers C, Reynolds E, McCullough MJ (2017): A panel of microRNAs can be used to determine oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 46, 940-948

Price KAR, Nichols AC, Shen CJ, Rammal A, Lang P, Palma DA, Rosenberg AJ, Chera BS, Agrawal N (2020): Novel Strategies to Effectively De-escalate Curative-Intent Therapy for Patients With HPV-Associated Oropharyngeal Cancer: Current and Future Directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 40, 1-13

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

Punt CJ, Buyse M, Kohne CH, Hohenberger P, Labianca R, Schmoll HJ, Pahlman L, Sobrero A, Douillard JY (2007): Endpoints in adjuvant treatment trials: a systematic review of the literature in colon cancer and proposed definitions for future trials. *J Natl Cancer Inst* 99, 998-1003

Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JP, Li H, Wang SZ, Ren XB, Cao S (2013): MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol* 92, 54-60

Qu C, Liang Z, Huang J, Zhao R, Su C, Wang S, Wang X, Zhang R, Lee MH, Yang H (2012): MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 11, 785-796

Quabius ES, Merz I, Gorogh T, Hedderich J, Haag J, Rocken C, Ambrosch P, Hoffmann M (2017): miRNA-expression in tonsillar squamous cell carcinomas in relation to HPV infection and expression of the antileukoproteinase SLPI. *Papillomavirus Res* 4, 26-34

Quabius ES, Haag J, Kuhnel A, Henry H, Hoffmann AS, Gorogh T, Hedderich J, Evert M, Beule AG, Maune S, et al. (2015): Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany. *Int J Oncol* 46, 414-422

Quon H, Vapiwala N, Forastiere A, Kennedy EB, Adelstein DJ, Boykin H, Califano JA, Holsinger FC, Nussenbaum B, Rosenthal DI, et al. (2017): Radiation Therapy for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 35, 4078-4090

Rahmati R, Dogan S, Pyke O, Palmer F, Awad M, Lee N, Kraus DH, Shah JP, Patel SG, Ganly I (2015): Squamous cell carcinoma of the tonsil managed by conventional surgery and postoperative radiation. *Head Neck* 37, 800-807

Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD (2009): miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 31, 642-654

Rapti SM, Kontos CK, Papadopoulos IN, Scorilas A (2014): Enhanced miR-182 transcription is a predictor of poor overall survival in colorectal adenocarcinoma patients. *Clin Chem Lab Med* 52, 1217-1227

Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, Bajraktari A, Bertini A, Ceka A, Rubini C, Ferrante L, Procopio AD, Olivieri F (2017): Expression Levels and Clinical Significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2017, 3921258

Rich JT, Milov S, Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Adkins DR, Haughey BH (2009): Transoral laser microsurgery (TLM) +/- adjuvant therapy for advanced stage oropharyngeal cancer: outcomes and prognostic factors. *Laryngoscope* 119, 1709-1719

Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, Witte BI, Snijders PJ, Heideman DA, Boon D, Koljenovic S, Baatenburg-de Jong RJ, Leemans CR (2013): Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol* 24, 2740-2745

Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW (1991): Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117, 601-605

Rogers SN, Pinto RS, Lancaster J, Bekiroglu F, Lowe D, Tandon S, Jones TM (2016): Health related quality of life following the treatment of oropharyngeal cancer by transoral laser. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273, 3913-3920

Roman BR, Baxi SS, Cracchiolo JR, Blackwell TJ, Pfister DG, McBride S, Ganly I, Shah JP, Patel SG, Morris LG, et al. (2017): Variation in use of postoperative chemoradiation following surgery for T1 and T2 oropharyngeal squamous cell carcinoma; National Cancer Database. *J Surg Oncol* 116, 351-358

Saito Y, Yoshida M, Omura G, Kobayashi K, Fujimoto C, Ando M, Sakamoto T, Asakage T, Yamasoba T (2015): Prognostic value of p16 expression irrespective of human papillomavirus status in patients with oropharyngeal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 45, 828-836

Salassa JR (1999): A functional outcome swallowing scale for staging oropharyngeal dysphagia. *Dig Dis* 17, 230-234

Saleh AD, Cheng H, Martin SE, Si H, Ormanoglu P, Carlson S, Clavijo PE, Yang X, Das R, Cornelius S, et al. (2019): Integrated Genomic and Functional microRNA Analysis Identifies miR-30-5p as a Tumor Suppressor and Potential Therapeutic Nanomedicine in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* 25, 2860-2873

Schmittgen TD, Livak KJ (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108

Setton J, Lee NY, Riaz N, Huang SH, Waldron J, O'Sullivan B, Zhang Z, Shi W, Rosenthal DI, Hutcheson KA, et al. (2015): A multi-institution pooled analysis of gastrostomy tube dependence in patients with oropharyngeal cancer treated with definitive intensity-modulated radiotherapy. *Cancer* 121, 294-301

Shevach J, Bossert A, Bakst RL, Liu J, Misiukiewicz K, Beyda J, Miles BA, Genden E, Posner MR, Gupta V (2017): Extracapsular extension is associated with worse distant control and progression-free survival in patients with lymph node-positive human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 74, 56-61

Shrime MG, Gullane PJ, Dawson L, Kim J, Gilbert RW, Irish JC, Brown DH, Goldstein DP (2010): The impact of adjuvant radiotherapy on survival in T1-2N1 squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136, 225-228

Sinha P, Pipkorn P, Zenga J, Haughey BH (2017): The Hybrid Transoral-Pharyngotomy Approach to Oropharyngeal Carcinoma: Technique and Outcome. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 126, 357-364

Sinha P, Karadaghy OA, Doering MM, Tuuli MG, Jackson RS, Haughey BH (2018): Survival for HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma with surgical versus non-surgical treatment approach: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 86, 121-131

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer.: TNM classification of malignant tumours; 7th. Auflage; Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ 2010

Spiegel JL, Pilavakis Y, Weiss BG, Canis M, Welz C (2019): Quality of life in patients after reconstruction with the supraclavicular artery island flap (SCAIF) versus the radial free forearm flap (RFFF). *Eur Arch Otorhinolaryngol* 276, 2311-2318

Steiner W (1988): Experience in endoscopic laser surgery of malignant tumours of the upper aero-digestive tract. *Adv Otorhinolaryngol* 39, 135-144

Steiner W, Ambrosch P, Hess CF, Kron M (2001): Organ preservation by transoral laser microsurgery in piriform sinus carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 124, 58-67

Steiner W, Fierek O, Ambrosch P, Hommerich CP, Kron M (2003): Transoral laser microsurgery for squamous cell carcinoma of the base of the tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 36-43

Stelmes JJ, Gregoire V, Poorten VV, Golusinski W, Szewczyk M, Jones T, Ansarin M, Broglie MA, Giger R, Klussmann JP, et al. (2019): Organ Preservation and Late Functional Outcome in Oropharyngeal Carcinoma: Rationale of EORTC 1420, the "Best of" Trial. *Front Oncol* 9, 999

Stenvold H, Donnem T, Andersen S, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM (2014): Stage and tissue-specific prognostic impact of miR-182 in NSCLC. *BMC Cancer* 14, 138

Strong MS, Jako GJ (1972): Laser surgery in the larynx. Early clinical experience with continuous CO<sub>2</sub> laser. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 81, 791-798

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209-249

Syrjanen K, Syrjanen S, Pyrhonen S (1982): Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 44, 323-334

Tian L, Zhang J, Ge J, Xiao H, Lu J, Fu S, Liu M, Sun Y (2014): MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 31, 785

Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, Rose B (2007): MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 12-17

Tumban E (2019): A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses* 11, 922

Turati F, Garavello W, Tramacere I, Pelucchi C, Galeone C, Bagnardi V, Corrao G, Islami F, Fedirko V, Boffetta P, et al. (2013): A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers: results from subgroup analyses. *Alcohol Alcohol* 48, 107-118

Valenti F, Sacconi A, Ganci F, Grasso G, Strano S, Blandino G, Di Agostino S (2019): The miR-205-5p/BRCA1/RAD17 Axis Promotes Genomic Instability in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* 11, 1347

Van Abel KM, Quick MH, Graner DE, Lohse CM, Price DL, Price KAR, Ma DJ, Moore EJ (2019): Outcomes following TORS for HPV-positive oropharyngeal carcinoma: PEGs, tracheostomies, and beyond. *Am J Otolaryngol* 40, 729-734

Victoria Martinez B, Dhahbi JM, Nunez Lopez YO, Lamperska K, Golusinski P, Luczewski L, Kolenda T, Atamna H, Spindler SR, Golusinski W, et al. (2015): Circulating small non-coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 6, 19246-19263

Viros Porcuna D, Pollan Guisasola C, Vina Soria C, Cirauqui Cirauqui B, Pardo Munoz L, Collura F, Mesia Nin R (2020): Transoral robotic surgery for squamous cell carcinoma of the oropharynx in a primarily human papillomavirus-negative patient population. *Clin Transl Oncol* 22, 1303-1311

Wang B, Lv K, Chen W, Zhao J, Luo J, Wu J, Li Z, Qin H, Wong TS, Yang W, et al. (2016): miR-375 and miR-205 Regulate the Invasion and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Synergistically via AKT-Mediated EMT. *Biomed Res Int* 2016, 9652789

Wang F, Zhong S, Zhang H, Zhang W, Zhang H, Wu X, Chen B (2015): Prognostic Value of MicroRNA-182 in Cancers: A Meta-Analysis. *Dis Markers* 2015, 482146

Wang F, Lu J, Peng X, Wang J, Liu X, Chen X, Jiang Y, Li X, Zhang B (2016): Integrated analysis of microRNA regulatory network in nasopharyngeal carcinoma with deep sequencing. *J Exp Clin Cancer Res* 35, 17

Wang J, Wang W, Li J, Wu L, Song M, Meng Q (2017): miR182 activates the Ras-MEK-ERK pathway in human oral cavity squamous cell carcinoma by suppressing RASA1 and SPRED1. *Onco Targets Ther* 10, 667-679

Wang L, Jiang H, Li W, Jia C, Zhang H, Sun Y, Chen X, Song X (2017): Overexpression of TP53 mutation-associated microRNA-182 promotes tumor cell proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 73, 105-112

Wang S, Yang MH, Wang XY, Lin J, Ding YQ (2014): Increased expression of miRNA-182 in colorectal carcinoma: an independent and tissue-specific prognostic factor. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 3498-3503

- Weiss BG, Anczykowski MZ, Canis M, Jakob M, Ihler F (2019a): Postoperative Radiotherapie bei Patienten mit lokal umschriebenen Tumoren (pT1 – 2) und singulärer ipsilateraler Lymphknotenmetastasierung (pN1). *Laryngorhinootologie* 98, S252-S253
- Weiss BG, Anczykowski MZ, Canis M, Ihler F, Kitz J, Jakob M (2020a): Prognostischer Stellenwert der zusätzlichen HPV-Genotypisierung in p16-stratifizierten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx fortgeschrittenen Stadiums. *Laryngorhinootologie* 99, S121
- Weiss BG, Ihler F, Wolff HA, Schneider S, Canis M, Steiner W, Welz C (2017): Transoral laser microsurgery for treatment for hypopharyngeal cancer in 211 patients. *Head Neck* 39, 1631-1638
- Weiss BG, Ihler F, Anczykowski MZ, Bertlich M, Kitz J, Steiner W, Canis M, Jakob M (2019b): Transoral laser microsurgery for treatment of oropharyngeal cancer in 368 patients. *Head Neck* 41, 3144-3158
- Weiss BG, Anczykowski MZ, Flach S, Spiegel JL, Kitz J, Bertlich M, Canis M, Jakob M, Ihler F (2020b): Benefit of postoperative radiotherapy for early tumors with single ipsilateral lymph node metastasis. *Laryngoscope* 130, E530-E538
- Weiss BG, Anczykowski MZ, Kuffer S, Spiegel JL, Bertlich M, Canis M, Ihler F, Kitz J, Jakob M (2021): Prognostic impact of additional HPV diagnostics in 102 patients with p16-stratified advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 278, 1983-2000
- Weiss BG, Anczykowski MZ, Ihler F, Bertlich M, Spiegel JL, Haubner F, Canis M, Kuffer S, Hess J, Unger K, et al. (2022): MicroRNA-182-5p and microRNA-205-5p as potential biomarkers for prognostic stratification of p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* 33, 331-347
- Welz C, Canis M, Schwenk-Zieger S, Spiegel JL, Weiss BG, Pilavakis Y (2017): Oral Cancer Reconstruction Using the Supraclavicular Artery Island Flap: Comparison to Free Radial Forearm Flap. *J Oral Maxillofac Surg* 75, 2261-2269
- Westra WH, Lewis JS, Jr. (2017): Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol* 11, 41-47
- Wiegand S, Wiemers C, Murthum T, Zimmermann AP, Bette M, Mandic R, Werner JA (2013): Risk of lymph node metastases after en bloc cold steel, en bloc laser-, and piecemeal laser surgical resection of auricular VX2 carcinoma. *Lasers Med Sci* 28, 1137-1141

- Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A, Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Wurdemann N, Bernhardt K, Pons-Kuhnemann J, Maulbecker-Armstrong C, Klussmann JP (2019): Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prev Res (Phila)* 12, 375-382
- Wolff HA, Ihler F, Zeller N, Welz C, Jung K, Canis M, Steiner W (2016): (Chemo)radiotherapy after laser microsurgery and selective neck dissection for pN2 head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273, 1533-1541
- Wong N, Khwaja SS, Baker CM, Gay HA, Thorstad WL, Daly MD, Lewis JS, Jr., Wang X (2016): Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med* 5, 1619-1628
- Wood ZC, Bain CJ, Smith DD, Whiteman DC, Antonsson A (2017): Oral human papillomavirus infection incidence and clearance: a systematic review of the literature. *J Gen Virol* 98, 519-526
- Wu Z, Tang H, Xiong Q, Liu D, Xia T, Liang H, Ye Q (2020): Prognostic Role of microRNA-205 in Human Gynecological Cancer: A Meta-Analysis of Fourteen Studies. *DNA Cell Biol* 39, 875-889
- Wurdemann N, Wagner S, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlohner S, Klussmann JP, Wittekindt C (2017): Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 7, 129
- Xu S, Guo J, Zhang W (2019): lncRNA PCAT19 promotes the proliferation of laryngocarcinoma cells via modulation of the miR-182/PDK4 axis. *J Cell Biochem* 120, 12810-12821
- Xu S, Wang K, Liu K, Liu Y, Huang Y, Zhang Y, Wang X, Xu Z, Liu S, Liu J (2021): Predictive Nomogram for the Necessity of Tracheotomy During Oral and Oropharyngeal Cancer Surgery. *Laryngoscope* 131, E1489-E1495
- Xu Y, Lin YP, Yang D, Zhang G, Zhou HF (2016): Clinical Significance of miR-149 in the Survival of Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2016, 8561251
- Yamamoto Y, Takemoto N, Michiba T, Seo Y, Isohashi F, Otani K, Suzuki M, Fujii T, Yoshii T, Mitani K, et al. (2019): Radiotherapy alone as a possible de-intensified treatment for human papillomavirus-related locally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 24, 640-648



Yamashita Y, Ikegami T, Hirakawa H, Uehara T, Deng Z, Agena S, Uezato J, Kondo S, Kiyuna A, Maeda H, et al. (2019): Staging and prognosis of oropharyngeal carcinoma according to the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual in human papillomavirus infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 276, 827-836

Yao M, Nguyen T, Buatti JM, Dornfeld KJ, Tan H, Wacha J, Bayouth JE, Clamon GH, Funk GF, Smith RB, et al. (2006): Changing failure patterns in oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with intensity modulated radiotherapy and implications for future research. *Am J Clin Oncol* 29, 606-612

Yeh DW, Chen YS, Lai CY, Liu YL, Lu CH, Lo JF, Chen L, Hsu LC, Luo Y, Xiang R, et al. (2016): Downregulation of COMMD1 by miR-205 promotes a positive feedback loop for amplifying inflammatory- and stemness-associated properties of cancer cells. *Cell Death Differ* 23, 841-852

Yi M, Xu L, Jiao Y, Luo S, Li A, Wu K (2020): The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J Hematol Oncol* 13, 25

Yu EH, Tu HF, Wu CH, Yang CC, Chang KW (2017): MicroRNA-21 promotes perineural invasion and impacts survival in patients with oral carcinoma. *J Chin Med Assoc* 80, 383-388

Zhong G, Xiong X (2015): miR-205 promotes proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing CDK2AP1 expression. *Biol Res* 48, 60

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Mark Jakob und Herrn Professor Dr. Martin Canis danke ich für das Überlassen der Themen. Meinen außerordentlichen Dank widme ich meinem Mentor, Herrn PD Dr. Bernhard Weiss, für die Einführung in die klinische Forschungstätigkeit und die herausragende und zuverlässige Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die enge Kooperation bei den experimentellen Arbeiten und pathologischen Fragestellungen gilt mein besonderer Dank Herr Professor Dr. Philipp Ströbel, Frau Dr. Julia Kitz, Herr Dr. Stefan Küffer und allen Mitarbeitern des Labors des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Für die Expertise, Geduld und Hilfe bei der statistischen Auswertung richtet sich mein Dank insbesondere an Herrn PD Dr. Kristian Unger.

Mein außerordentlicher Dank gilt ferner Frau Brigitte Bruhse und Herr Professor Dr. Wolfgang Steiner für die umfassende Datenbank zu Patienten-, Erkrankungs- und Therapiecharakteristika sowie dem onkologischen Verlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen.

Darüber hinaus möchte ich allen Koautoren für die Unterstützung bei den Publikationen der Forschungsergebnisse danken.