

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hecht

# **Untersuchungen zum Stellenwert des oralen Mikrobioms in der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Karzinomen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2024

Vorgelegt von: Dominique Alina Torozan  
geboren am: 30.08.1993 in Vechta

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Zusammenfassung (deutsch) .....	1
1.2. Abstract: Metagenomic profiling of Oral Microbiome Dynamics during Chemoradiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients.....	3
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
2.1. Epidemiologie und Ätiologie von Kopf-Hals-Karzinomen.....	4
2.2. Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen .....	5
2.3. Orale Mukositis.....	6
2.4. Weitere Strahlentherapie-assoziierte Nebenwirkungen.....	7
2.5. Einteilung der oralen Mukositis .....	8
2.6. Pathogenese der oralen Mukositis .....	9
2.7. Risikofaktoren der oralen Mukositis.....	11
2.8. Humanes Mikrobiom und Next-Generation-Sequencing-Verfahren.....	13
2.9. Zusammensetzung des oralen Mikrobioms und Dysbiose .....	14
2.10. Fragestellungen der Arbeit .....	17
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1. Ein- und Ausschlusskriterien .....	18
3.2. Studiendesign und Probenasservierung.....	19
3.3. Klinische Untersuchungen .....	19
3.4. Sekundäre Probenverarbeitung .....	22
3.5. Statistische Auswertung .....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1. Probandenmerkmale bei Studieneinschluss .....	27
4.2. Tumormerkmale, tumorspezifische Therapie und orale Mukositis .....	28
4.3. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen vor Therapiebeginn ...	32
4.4. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen unter Radiochemotherapie .....	35
4.5. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen im Follow-Up.....	41
4.6. Charakterisierung der longitudinalen Veränderungen im oralen Mikrobiom des Patientenkollektivs unter Radiochemotherapie.....	43
4.7. Subgruppenvergleiche in der Patientenkohorte.....	50
4.8. Charakterisierung der longitudinalen Veränderungen im oralen Mikrobiom der gesunden Kontrollgruppe .....	57
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1. Einordnung der Methodik in der Mikrobiomanalytik .....	61

5.2.	Stabilität und Zusammensetzung des gesunden oralen Mikrobioms.....	62
5.3.	Einfluss von Tabakkonsum auf das orale Mikrobiom .....	63
5.4.	Veränderungen des oralen Mikrobioms von Patienten unter Radiochemotherapie .....	63
5.5.	Orales Mikrobiom und HNSCC .....	65
5.6.	Zusammenhang zwischen oralem Mikrobiom und der Inzidenz der höhergradigen Mukositis .....	66
5.7.	Einfluss der antibiotischen Therapie auf das orale Mikrobiom .....	67
5.8.	Antibiotikaresistenzgene unter Radiochemotherapie .....	68
5.9.	Limitationen der Studie .....	68
6.	<i>Bibliographie</i> .....	70
7.	<i>Publikationen / Danksagung</i> .....	77
7.1.	Publikationen .....	77
7.2.	Danksagung .....	78
8.	<i>Lebenslauf</i> .....	79

## Abkürzungen und Symbole

5-FU	5-Floururacil
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANOSIM	Analysis of Similarity
ARG	Antibiotikaresistenz-Gene
C	Celsius
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CRP	C-reaktives Protein
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECLIA	Elektrochemolumineszens-Immunoassay
eHOMD	expanded Human Oral Microbiome Database
EMT	epithelial-mesenchymalen Transition
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamasen
e.V.	Eingetragener Verein
FDR	False Discovery Rate
FU	Follow-Up
GENEPI	Genetic pathways for the prediction of the effects of ionising radiation
Gy	Gray
HMP	Human Microbiome Project
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
ID	Identifier
LCSB	Luxembourg Centre for Systems Biomedicine
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LEfSe	Linearen Diskriminanzanalyse Effect Size
Lj.	Lebensjahr
MDS	Metrische mehrdimensionale Skalierung
NCI	National Cancer Institute
NEB	New England Biolabs
NGS	Next-Generation-Sequencing
NMDS	Nicht-metrische mehrdimensionale Skalierung

OM	Orales Mikrobiom
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCoA	Hauptkoordinatenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PY	Pack years
RCT	Radiochemotherapie
RIOM	Radiation-induced oral mucositis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RTOG	Radiation Therapy Group
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	Tumour Nodes Metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Spp.	Spezies (Plural)
Vs.	Versus
WHO	World Health Organization
Z.B.	Zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

## 1. Zusammenfassung

### 1.1. Zusammenfassung (deutsch)

**Fragestellung:** Wir untersuchten die Wechselwirkungen zwischen dem oralen Mikrobiom und der Entstehung einer strahleninduzierten oralen Mundschleimhautentzündung bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs mit Indikation zur primär definitiven oder adjuvanten Radiochemotherapie. Dazu untersuchen wir prospektiv das orale Mikrobiom mittels metagenomischer Sequenzierung und verglichen es mit dem oralen Mikrobiom einer gesunden Kontrollgruppe. Außerdem bildeten wir Patientensubgruppen und verglichen Patienten mit Low-grade Mukositis vs. High-grade Mukositis.

**Material und Methoden:** Zehn Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich sowie 7 gesunde Probanden wurden in unsere Studie eingeschlossen. Speichelproben wurden vor, während und neun Monate nach abgeschlossener Radiochemotherapie asserviert und mittels metagenomischer Shotgun-Sequenzierung analysiert. Wir untersuchten die Alpha- und Beta-Diversität des oralen Mikrobioms sowie Unterschiede in den relativen Abundanzan auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen bis hin zur Speziesebene zwischen verschiedenen (Sub)Gruppen. Neben der taxonomischen Analyse wurden im Rahmen einer funktionellen Analyse auch Antibiotikaresistenz-Gene untersucht.

**Ergebnisse:** Patienten wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine signifikant geringere Alpha-Diversität auf ( $p < 0,05$ ). Taxa mit unterschiedlicher relativer Häufigkeit zwischen Patienten und Kontrollen konnten bereits zum prätherapeutischen Zeitpunkt beobachtet werden. In der Patientenkohorte nahm die Prävalenz vieler mikrobieller Taxa unter Radiochemotherapie ab, während die relative Häufigkeit einiger weniger Erreger signifikant zunahm, unter anderem *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. *Capnocytophaga* spp. wurde mit der Patientensubgruppe in Verbindung gebracht, die mittels primär definitiver Radiochemotherapie behandelt wurde im Vergleich zu adjuvanter Radiochemotherapie. Zum prätherapeutischen Zeitpunkt waren zwei Pilzfamilien (Melampsoraceae und Herpotrichiellaceae) bei Patienten angereichert, die später eine High-Grade-Mukositis entwickelten. Während der Radiochemotherapie konnten keine signifikant unterschiedlichen mikrobiellen Taxa zwischen der Low-grade und der High-grade Mukositis-Subgruppe detektiert werden.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass sowohl eine Radiochemotherapie als auch Tumore im Kopf-Hals-Bereich selbst die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms beeinflussen. Die Veränderungen im oralen Mikrobiom unter Radiochemotherapie korrelierten mit dem Schweregrad der strahleninduzierten, oralen

Mukositis und waren nach Beendigung der Therapie reversibel. Obwohl mikrobielle Marker bei Patienten, die später eine High-grade Mukositis entwickelten, detektiert wurden, sind weitere Studien erforderlich um diese potenziellen Biomarker zu validieren.

## 1.2. Abstract: Metagenomic profiling of Oral Microbiome Dynamics during Chemoradiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients

**Purpose:** We explored the interaction between the oral microbiome and the development of radiation-induced mucositis in patients with head and neck squamous cell cancer undergoing chemoradiotherapy, prospectively studying the oral microbiome using metagenomic sequencing and comparing it with healthy controls. Additionally, we compared patients with low-grade vs. high-grade mucositis.

**Methods and Materials:** Ten patients scheduled for chemoradiotherapy and 7 healthy subjects were included. Saliva samples were analyzed prior to, during, and nine months after radiation using metagenomic sequencing. We similarly analyzed samples from healthy controls over a time period of 3 months. We assessed alpha and beta diversity and examined abundances at different taxonomic levels between (sub)groups.

**Results:** Patients exhibited significantly reduced alpha diversity compared to controls at all time ( $p < 0.05$ ). Differential abundance of taxa between patients and controls was already observed at baseline. In patients, the prevalence of many microbial taxa decreased during irradiation while the relative abundance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* increased significantly. *Capnocytophaga* spp. was associated with the definitive chemoradiotherapy patients' subgroup. At baseline, two fungal families (Melampsoraceae and Herpotrichiellaceae) were more abundant in patients who later developed high-grade mucositis. No differentially abundant taxa were found between low-grade vs. high-grade mucositis subgroups during irradiation.

**Conclusions:** Our findings support the hypothesis that chemoradiotherapy, as well as head and neck squamous cell cancer itself, influence the composition of the oral microbiome. The changes in the oral microbiome during irradiation correlated with the severity of the radiation-induced oral mucositis and were reversible after the end of treatment. Although microbial markers were found in patients who later developed high-grade mucositis, further studies are needed to validate these potential biomarkers.

## 2. Einleitung

### 2.1. Epidemiologie und Ätiologie von Kopf-Hals-Karzinomen

Karzinome im Kopf-Hals-Bereich stellen eine heterogene Gruppe bösartiger Neubildungen dar und gehören zu den 10 häufigsten Tumorentitäten weltweit [16]. Zu dieser Gruppe gehören Neoplasien der Mundhöhle, des Pharynx, des Larynx, der Speicheldrüsen sowie der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen. Bei der Mehrzahl der Kopf-Hals-Tumoren handelt es sich um Plattenepithelkarzinome („head and neck squamous cell carcinoma“ - HNSCC), welche bei Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx > 90 % der Tumore ausmachen [63]. Adenokarzinome sind deutlich seltener und betreffen vor allem die Speicheldrüsen. Laut der gemeinsamen Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. und des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut erkrankten 2020 in Deutschland 493.250 Personen neu an Krebs. Dabei machten neu aufgetretene Krebserkrankungen des Mundhöhlen-Rachen-Raums 9.140 Fälle bei Männern und 4.050 Fälle bei Frauen aus [58]. Männer erkranken nicht nur häufiger an Kopf-Hals-Karzinomen, sondern im Mittel auch um drei Jahre früher als Frauen. Frauen weisen außerdem mit 64% im Vergleich zu Männern mit 52% eine höhere relative 5-Jahres-Überlebensrate auf. Als Gründe für die schlechten Überlebensraten sind in erster Linie die Diagnosestellung in fortgeschrittenen Tumorstadien sowie die hohe Rezidiv- und zweite Primärtumorrate aufzuführen [58].

Es sind eine Reihe von endogenen und exogenen Faktoren beschrieben, welche die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich begünstigen. Allen voran stellen Tabak- und Alkoholkonsum zwei dieser wichtigen exogenen Risikofaktoren dar. In Europa, den USA und anderen Industrieländern lassen sich mehr als 75% aller HNSCCs auf eine Kombination aus Alkohol und Tabak zurückführen [44], was sich unter anderem durch den synergistische Effekt dieser beiden Substanzen in der Karzinogenese von HNSCCs erklären lässt [45]. Das Krebsrisiko steigt mit der Dauer und Häufigkeit des Alkohol- sowie Tabakkonsums [44]. Nicht jeder Raucher entwickelt eine Krebserkrankung. Diese Tatsache spiegelt unter anderem die genetische Prädisposition der Karzinogenität von Tabak wieder, aber auch die komplexen metabolischen und immunologischen Prozesse, die an der Tumorentstehung beteiligt sind [47]. Marron et al. konnten zeigen, dass sich eine Rauchentwöhnung bereits nach 1-4 Jahren positiv auf das Krebsrisiko auswirkt und nach etwa 20 Jahren dem eines Nicht-Rauchers entspricht [72]. Bei Alkohol konnten erst 20 Jahre nach Beendigung des Konsums positive Auswirkungen der Karenz aufgezeigt werden.

Neben Alkohol- und Tabakkonsum sind chronische Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV), insbesondere der Subtypen 16 und 18, ursächlich für die Entstehung einer Vielzahl von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx [40]. Ihre weltweite Prävalenz hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen [21]. HPV-assoziierte HNSCC zeichnen sich klinisch vor allem

durch ihre Lokalisation in den Zungen- und Gaumenmandeln des Oropharynx, die schlecht differenzierte Histopathologie und ihr gehäuftes Auftreten bei Nichtrauchern und jüngeren Patienten aus [40]. Die Relevanz dieser Subgruppe spiegelt sich auch in der aktuellen AJCC/UICC-Klassifikation des TNM-Systems wider. Aufgrund des unterschiedlichen klinischen und biologischen Verhaltens von HPV-positiven und HPV-negativen Oropharynxkarzinomen wurden für beide Erkrankungen gesonderte Klassifikationen etabliert, insbesondere auch, da der Nachweis einer HPV-Positivität als günstiger Prognosefaktor etabliert werden konnte [51]. Die HPV-Infektion führt auf molekulargenetischer Ebene unter anderem über eine Hemmung von p53 zur Überexpression von p16, sodass p16 als Surrogatmarker eines transkriptionsaktiven HPV-Infektes dienen kann [81]. Der HPV- und p16-Status stimmen jedoch nicht immer überein. Rasmussen et. al konnten zeigen, dass Patienten mit HPV negativem und p16 positivem Status ein signifikant höheres Risiko für Fernmetastasenrezidive aufweisen [87]. Eine prognostische Relevanz von HPV bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle- und des Larynx konnte nicht nachgewiesen werden [85]. Das Epstein-Barr-Virus, dem als ersten humanpathogenen Virus ein onkogenes Potenzial zugeschrieben wurde, spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese insbesondere nasopharyngealer Karzinome [48]. Des Weiteren gelten ein niedriger sozialökonomischer Status, eine schlechte Mundhygiene, Wunden im Bereich von Zahnprothesen sowie chronische Entzündung im Sinne einer chronischen Parodontitis als gesicherte Risikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich [26],[54],[121],[126]. Auf eine protektive Wirkung deutet hingegen eine Ernährung mit hohem Anteil an frischem Obst und Gemüse hin, was vor allem auf die Aufnahme von Beta-Carotin und Vitamin C zurückzuführen ist [36],[70].

## **2.2. Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen**

Die Therapieoptionen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs beinhalten die chirurgische Resektion, Bestrahlung, Chemo- und Immuntherapie [96]. In die interdisziplinäre Therapieentscheidung fließen Tumorstadium, -lokalisierung, Lymphknotenbefall, Resektabilität, das Vorliegen von Fernmetastasen sowie Alter, Allgemeinzustand, Vorerkrankungen und der Patientenwunsch ein. Ein Frühstadium (Stadium I und II) kann oftmals mittels alleiniger chirurgischer Resektion oder alleiniger Radiotherapie behandelt werden [109]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt jedoch bei 60% der Patienten bereits ein lokal fortgeschrittenes Erkrankungsstadium vor (Stadium III/IV A/B), welches ein multimodales Therapiekonzept erfordert [58]. Hier ist zunächst die Option einer nicht mutilierenden Tumorresektion zu prüfen [97]. Abhängig von der Operabilität entscheidet sich, ob eine adjuvante Radiotherapie, optimaler Weise innerhalb der ersten 6 Wochen nach Operation, mit oder ohne Chemotherapie, oder eine primär definitive Radiotherapie durchgeführt wird [96]. Bei der primär definitiven Radiotherapie im UICC-Stadium III/IV hat sich die simultane Chemotherapie mit Cisplatin allein

oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika als Goldstandard durchgesetzt [3]. Die Kombination aus primär definitiver Radiotherapie und Systemtherapie verbessert sowohl die lokale Tumorkontrolle, als auch das Gesamtüberleben deutlich [83]. Für die primär-definitive Radiochemotherapie (RCT) als hyperfraktioniert-akzelerierte Behandlung konnte ein Überlebensvorteil im Vergleich zur normofraktionierten Therapie gezeigt werden [60]. Das Zielvolumen umfasst den Primärtumor und makroskopisch befallene Lymphknotenareale mit mindestens 70 Gy. Lymphknoten, die eine mikroskopische Befallswahrscheinlichkeit aufweisen, werden mit einer Gesamtdosis von 50-60 Gy bestrahlt [64]. Bei resektablen Tumoren mit adjuvanter Bestrahlung (hier wird typischerweise eine Referenzdosis von 60 Gy verordnet) profitieren Patienten vor allem dann von einer simultanen Chemotherapie mit Cisplatin, wenn postoperativ Risikofaktoren wie positive Resektionsrändern oder extranodales Wachstum von Tumorzellen vorliegen [12].

### **2.3. Orale Mukositis**

Bei der oralen Mukositis („Radiation-induced oral mucositis“ - RIOM) handelt es sich um eine Entzündung der Mundschleimhaut, welche in unterschiedlicher klinischer Ausprägung bei praktisch jedem Patienten auftritt, der sich einer Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich unterzieht [116]. Sie stellt neben der Strahlendermatitis die wichtigste dosislimitierende Nebenwirkung der Strahlen- bzw. Radiochemotherapie von Kopf-Hals-Karzinomen dar [30],[122]. Ihre Entstehung ist multifaktoriell [37]. Inzidenz und Schweregrad sind dosisabhängig [8], gleichsam sind interindividuelle Unterschiede in Ausprägung und Dauer erheblich. Derzeit gibt es weder einen effektiven Ansatz zur Prävention einer solchen Mundschleimhautentzündung noch eine spezifische Therapie, sodass man im klinischen Alltag auf supportive Behandlungsmaßnahmen angewiesen ist [108].

Die ersten Symptome treten in der Regel in der zweiten oder dritten Woche nach Beginn der Bestrahlung auf (nach Verabreichung einer Dosis von 10-20 Gy in konventioneller Fraktionierung) [62]. Die klinischen Manifestationen reichen von einer Inflammation mit Erythembildung über die Entstehung von Pseudomembranen bis hin zu der Entwicklung von Ulzerationen [62]. Hauptsymptom der RIOM sind Schmerzen im Mund- und Rachenraum, welche je nach Schweregrad der Mundschleimhautentzündung unterschiedlich stark ausgeprägt sein können und im Verlauf gegebenenfalls den Einsatz von Opioid-Analgetika notwendig machen [116]. Durch die ausgeprägten Schmerzen und das brennende Gefühl im Mund- und Rachenraum kann die Fähigkeit zu Schlucken und zu Sprechen massiv beeinträchtigt sein. Aufgrund der hieraus resultierenden Dysphagie kann die orale Aufnahme von fester Nahrung oder Flüssigkeiten stark eingeschränkt sein. [116]. Dehydratation, Malnutrition und Gewichtsverlust sind die Folge und machen bei einigen Patienten eine parenterale Ernährung oder den Einsatz von Antibiotika notwendig [92]. Der Einsatz topischer oder systemischer Antibiotika zur Prävention einer RIOM wird nicht empfohlen [33].

Mundspüllösungen, welche z.B. Lokalanästhetika oder Doxepin enthalten, können die mit der RIOM verbundenen Schmerzen lindern. [99] Alkoholhaltige Mundspülungen sollten generell vermieden werden. Eine sorgfältige Mundhygiene (einschließlich einer Optimierung des Zahnstatus vor Beginn der Bestrahlung) kann zur Vorbeugung der RIOM beitragen [32].

Die Belastung für die Patienten durch die RIOM ist groß und trägt maßgeblich zur Verminderung der Lebensqualität während der onkologischen Therapie bei [89]. Schwere Verläufe können eine Dosisreduktion der Chemotherapeutika sowie eine Verzögerung der Radiotherapie notwendig machen oder gar zu einem Behandlungsabbruch führen [73]. Eine weitere Komplikation der RIOM stellt das erhöhte Risiko für sekundäre Infektionen vor allem mit opportunistischen Krankheitserregern dar [103]. Vor allem bei neutropenen Patienten wird die Entstehung einer Sepsis begünstigt, was eine vitale Bedrohung für den Patienten darstellen kann [102]. Um eine etwaige parenterale Ernährung, schmerzlindernde Therapie oder intravenöse, antiinfektive Behandlung durchzuführen, ist oftmals eine Hospitalisation notwendig [34].

#### **2.4. Weitere Strahlentherapie-assoziierte Nebenwirkungen**

Generell lassen sich die meisten Radiotherapie-Toxizitäten in akute Toxizitäten, welche oft vorübergehend sind, und in Spättoxizitäten, welche in der Regel langanhaltend oder dauerhaft sein können, unterteilen. Eine Akuttoxizität wird definiert als Ereignis, welches während der Bestrahlung oder innerhalb von 90 Tagen nach Beginn der Behandlung auftritt. Ereignisse, die nach diesem Zeitpunkt auftreten, werden zu den Spättoxizitäten gezählt. Durch die Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren wird nicht nur die Mundschleimhaut geschädigt, sondern auch umliegende Strukturen wie z.B. Speicheldrüsen, die oft im Bestrahlungsfeld enthalten sind [25]. Die häufigste Langzeitkomplikation der Strahlen- oder Radiochemotherapie bei Kopf-Halstumoren ist die Xerostomie, welche auf eine Schädigung der Speicheldrüsen zurückzuführen ist [55]. Die Speichelproduktion kann sich nach Beendigung der Radiotherapie mit der Zeit erholen, oftmals handelt es sich jedoch um ein langanhaltendes oder gar dauerhaftes Problem, welches die Lebensqualität der Patienten auch lange nach abgeschlossener onkologischer Therapie deutlich beeinträchtigt [15].

Speicheldrüsen weisen eine hohe Strahlensensitivität auf [42]. Normalerweise produzieren die großen und kleinen Speicheldrüsen zusammen bis zu 1,5 Liter Speichel am Tag [43], die Glandula parotis übernimmt etwa 60% der Speichelproduktion. Speichel besteht aus einer flüssigen Phase, die etwa 99% ausmacht, sowie einer festen Phase, welche vor allem aus Proteinen und Elektrolyten besteht [55]. Die flüssige Phase trägt unter anderem zur Befeuchtung der Mundhöhle bei, reinigt diese von Speiseresten und mikrobiellen Erregern, bildet eine schützende Schicht um Zähne und Mundschleimhaut, fördert die Remineralisierung des Zahnschmelzes und erleichtert nicht nur das Kauen, Schlucken und Sprechen, sondern spielt auch eine große Rolle in der Geschmackswahrnehmung [43]. Die im Speichel gelösten

Proteine und Elektrolyte neutralisieren Säuren, spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener Erreger und leiten die Verdauung von Kohlenhydraten und Fetten ein [56]. Das Ausmaß der Schädigung der Speicheldrüsen durch die Radiotherapie hängt von dem in das Bestrahlungsfeld eingeschlossenen Volumen des Organs sowie von der Bestrahlungsdosis ab [77]. Ein normaler Speichelfluss und eine normale Speichelzusammensetzung spielen außerdem eine große Rolle in der Regulation der Zusammensetzung des oralen Mikrobioms [52]. Eine Hyposalivation bis hin zur Xerostomie kann das gesunde orale Mikrobiom aus dem Gleichgewicht bringen und eine Dysbiose fördern [43].

Eine weitere mit der Bestrahlung von Kopf-Hals-Karzinomen assoziierte Nebenwirkung ist die Veränderung der Geschmacksempfindung, welche von Hypo- und Dysgeusie bis hin zur Ageusie reicht [53]. Sie tritt bereits in der frühen Behandlungsphase auf [125]. Durch direkte zytotoxische und anti-proliferative Effekte der Radiotherapie kommt es zu einem Verlust der für die Verarbeitung der Geschmacksempfindung essentiellen Geschmacksknospen und zu einer Zerstörung der Geschmacksnerven [53]. Xerostomie und Dysgeusie begünstigen sich nicht nur gegenseitig, sondern können alleine oder in Kombination ebenfalls zu einer Dysphagie führen und die Symptomlast der oralen Mukositis noch verstärken [23].

## **2.5. Einteilung der oralen Mukositis**

Für die Klassifizierung der Nebenwirkungen von onkologischen Therapien stehen mehrere Einteilungssysteme zur Verfügung. Für die Erfassung des Schweregrades der RIOM konnte sich noch keine der Bewertungsskalen als Goldstandard durchsetzen [101]. Am häufigsten verwendet werden die globalen Einzel-Item-Skalen der WHO, der Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) und der vom National Cancer Institute (NCI) vorgehaltene CTCAE-Score [82],[104]. Die einzelnen Skalen kombinieren das klinische Erscheinungsbild der Mukositis durch objektivierbare Läsionen in der Mundhöhle mit funktionellen Einschränkungen z.B. bei der Nahrungsaufnahme [101] und sind **Tabelle 2.5.1.** zu entnehmen. Zu evaluieren gilt immer, ob diese klinischen Einschränkungen auch wirklich durch die OM hervorgerufen werden.

Grad	1	2	3	4	5
<b>WHO</b>	Erythem und Wundheitsgefühl	Ulzerationen +/- Erythem, feste Nahrungsaufnahme möglich	Ulzerationen +/- Erythem, flüssige Nahrungsaufnahme möglich	Ulzerationen +/- Erythem, keine Nahrungsaufnahme möglich	
<b>CTCAE 5.0</b>	Aufnahme fester Nahrung möglich	Schmerzen/ Aufnahme fester/breiiger Nahrung möglich	Starke Schmerzen/ Nur noch flüssige Nahrungsaufnahme möglich	Massive Schmerzen/ Ernährung ausschließlich über enterale/parenterale Sonde	Tod
<b>RTOG</b>	Erythem	Fleckige Ulzerationen oder Pseudomembranen	konfluierende Ulzerationen oder Pseudomembranen; Blutung bei geringfügigen Traumata	Nekrose; spontane Blutungen	

**Tabelle 2.5.1. Einteilung der oralen Mukositis nach WHO, RTOG und CTCAE-Kriterien**

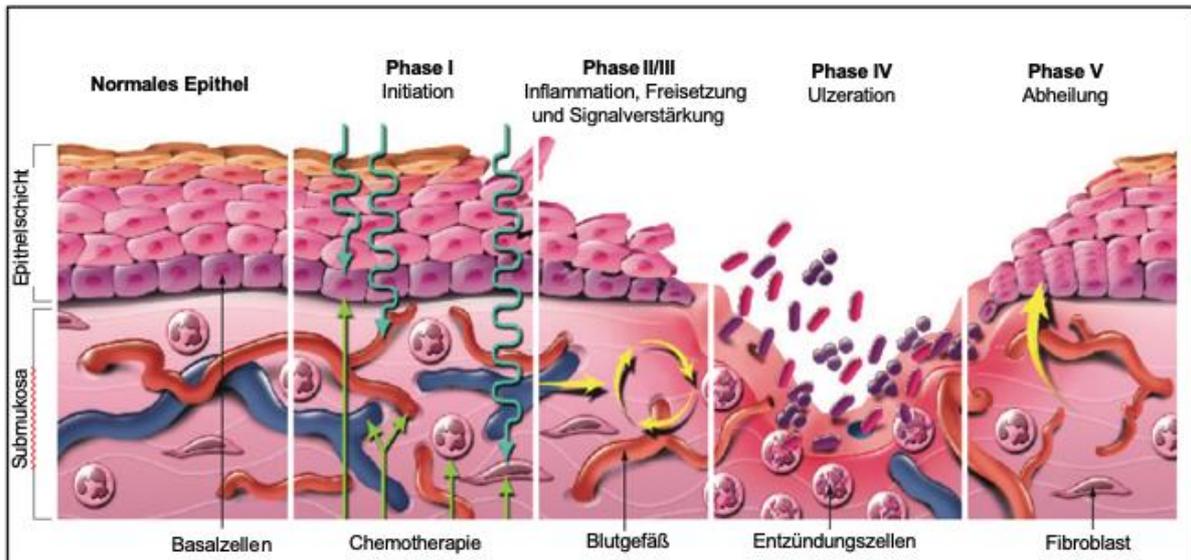
Modifiziert nach Peterson et. al [82] und Sonis et. al [104]

Abkürzungen: WHO = World Health Organization, CTCAE = Common Terminology Criteria for Adverse Events, RTOG = Radiation Therapy Oncology Group

## 2.6. Pathogenese der oralen Mukositis

Für viele Jahre galt für die Pathogenese der Mukositis: Es handelt sich um direkte, unspezifische zytotoxische Effekte der Bestrahlung und Chemotherapie auf sich schnell teilende Basalzellen des Mukosaepithels [101]. Als gesichert galt die These, wonach Stammzellen durch stomatotoxische Substanzen in ihrer Teilungsfähigkeit beeinträchtigt werden und somit die Regeneration des Epithels verlangsamt wird. Dies führe wiederum zu einer Atrophie des Gewebes, welche im Verlauf die Entwicklung von Ulzerationen begünstige, besonders aufgrund der funktionellen Belastung, welcher das Schleimhautepithel weiterhin ausgesetzt ist [116]. In neueren Studien stellte sich jedoch heraus, dass die Pathogenese der RIOM weitaus komplexer ist und nicht allein durch die direkte, unspezifische Zerstörung der sich schnell teilenden basalen, epithelialen Stammzellen erklärt werden kann [115]. Vielmehr handelt es sich um eine Reihe komplexer biologischer Reaktionen, die in der gesamten Mukosa und teilweise auch in der Submukosa ablaufen und in Abbildung 2.6.1. graphisch dargestellt sind. [105]. Diese Erkenntnisse bieten ein großes Potenzial für die weitere Erforschung der an der Entstehung der oralen Mukositis beteiligten biologischen Prozesse, sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen [101]. Grundlage für das heutige Verständnis der Mukositis-Pathogenese bildet das 2004 von Sonis et al. publizierte Modell, welches die Mukositis-Entstehung in fünf Phasen unterteilt [104],[107]:

- 1) Initiation: Hauptmerkmal der ersten Phase ist die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Der daraus resultierende oxidative Stress auf das Gewebe spielt eine große Rolle in der Initiation der oralen Mukositis und verursacht erhebliche Zellschäden. Zusätzlich aktivieren Zellen, die als Folge der Bestrahlung und Chemotherapie apoptotisch oder nekrotisch werden das angeborene Immunsystem. In Endothel- und Epithelzellen wird eine molekulare Kaskade freigesetzt, welche in der Aktivierung von Transkriptionsfaktor-Mediatoren resultiert, die ebenfalls die Entstehung von Schleimhautverletzungen begünstigen.
- 2) Inflammation und primäre Schadensantwort: Freie Sauerstoffradikale führen nicht nur zum direkten Zelltod, sondern auch zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion über die Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine, was eine weitere Gewebeschädigung und Zelltod zur Folge hat und als primäre Schadensantwort bezeichnet wird.
- 3) Signalverstärkung: Die durch die Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine gebildeten Mediatoren wie z.B. TNF- $\alpha$  führen durch eine positive Rückkopplung zu einer Signalverstärkung, welche in der Zunahme schädigender Mediatoren resultiert und die pro-inflammatorische Kaskade zusätzlich verstärkt.
- 4) Ulzeration: Die vierte Phase stellt die klinisch bedeutsamste Phase der Mukositisentstehung dar. Hier kommt die epitheliale Proliferation als Reaktion auf die apoptotischen und nekrotischen Prozesse zum Stillstand. Daraus resultiert eine Verdünnung der Schleimhaut, was schließlich zu Ulzerationen führt.
- 5) Heilung: In der letzten Phase kommt es zur Heilung, die Integrität des Epithels wird wiederhergestellt. Dies wird möglich durch Proliferation, Migration und Differenzierung der Epithelzellen, ausgehend von Signalen der extrazellulären Matrix. Die in dieser Phase entscheidende Epithelialisierung beginnt an den Ulkusrändern, eine Heilung erfolgt in der Regel innerhalb von 4 Wochen nach Applikation der letzten Bestrahlungsdosis.



**Abb. 2.6.1. Pathophysiologisches Modell der oralen Mukositis**

Es werden die fünf Phasen der Pathogenese der oralen Mukositis dargestellt. Modifiziert nach Sonis et. al [105]

Eine Überschneidung der einzelnen Phasen ist bei fraktionierter Gabe geringer Einzelstrahlendosen möglich [104].

## 2.7. Risikofaktoren der oralen Mukositis

In der Literatur wurden eine Vielzahl von Faktoren beschrieben, die das Risiko der Entstehung einer RIOM erhöhen. Man kann sie in zwei unterschiedliche Kategorien einteilen: patientenbezogene vs. therapiebezogene Risikofaktoren (**Tabelle 2.7.1.**) [5]. Alter und Geschlecht sind zwei der etablierten patientenbezogenen Risikofaktoren [32]. Sowohl Kinder als auch Patienten ab dem 50. Lebensjahr sind häufiger von einer schweren RIOM betroffen [4]. Bei Kindern lässt sich dies unter anderem durch den vermehrten Zellumsatz erklären, bei Patienten > 50. Lj. wird der erhöhte Zelluntergang und die verminderte Anzahl an Mukosastammzellen hierfür verantwortlich gemacht [4]. Des Weiteren gelten weibliches Geschlecht, Mangelernährung, ein schlechter Zahnstatus und vorbestehende Läsionen in der Mundhöhle zu den anerkannten Risikofaktoren, ebenso wie eine bereits vor Beginn der Bestrahlung bestehende z.B. medikamenteninduzierte Xerostomie [68]. Bei Nicht-Rauchern und Patienten, die eine gute Mundhygiene betreiben, kann die Inzidenz und der Schweregrad der Mukositis verringert sein [32].

Fortschritte wurden ebenfalls in der Bewertung genetischer Faktoren erzielt, die eine Vorhersage über die Variabilität der Radiosensitivität bei Tumorpatienten erlauben. Es gibt Hinweise darauf, dass unter anderem genetische Faktoren, die an der Erkennung und Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen sowie dem Schutz vor ROS nach strahleninduzierter Zellschädigung beteiligt sind, eine Ursache für die individuellen Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit darstellen [84]. Pratesi et. al fanden eine Assoziation zwischen zwei genetischen Polymorphismen (XRCC1 und RAD51) in DNS-

Reparatur-Genen und der Entwicklung strahleninduzierter Toxizität bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches [84]. Ferner kann die DNS-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparaturkapazität bei Patienten durch die Bestimmung des  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlustes in Blutlymphozyten vor und nach in-vivo Bestrahlung quantifiziert werden. [37]. Diese Methode ermöglicht die Identifizierung von Patienten mit gestörter DSB-Reparatur in der klinischen Praxis [37]. Eine Korrelation mit dem Auftreten einer höhergradigen Mukositis konnte jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht gezeigt werden. Ein Ziel der zellulären und molekularen Forschungsansätze ist die Etablierung eines prädiktiven Biomarkers, welcher die Entwicklung einer strahleninduzierten Toxizität vorhersagen kann [122]. Einen großen Beitrag auf diesem Gebiet leistet das GENEPI-Projekt der europäischen Gesellschaft für Radiologie und Onkologie. Durch das Anlegen von Gewebe- und Datenbanken bestrahlter Patienten, kann der Zusammenhang zwischen veränderter Genexpression und individueller Strahlenreaktion sowie schwerer posttherapeutischer Toxizität besser untersucht werden mit dem Ziel prädiktive, leistungsfähige Test zu entwickeln, um letzterem vorzubeugen [6].

Die therapiebezogenen Einflussgrößen beinhalten die tägliche Einzelreferenzdosis, das Zielvolumen, das Bestrahlungsgebiet und die Gesamtreferenzdosis der Strahlentherapie [8],[68]. Die Wahrscheinlichkeit, eine schwere RIOM zu entwickeln, ist bei Patienten mit Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinom im Vergleich zu Patienten, die an einem Tumor des Hypopharynx oder Larynx erkrankt sind mit ca. 90% im Vergleich zu 65% - zielvolumenbedingt – deutlich erhöht [68],[104]. Eine simultane Chemotherapie erhöht ebenfalls das Risiko, eine RIOM zu entwickeln [123]. In verschiedenen Studien konnte eine Assoziation zwischen verwendetem Chemotherapeutikum und dem Ausmaß der RIOM festgestellt werden. So haben beispielsweise platin-haltige Substanzen (Cisplatin), Antimetabolite (5-FU, Methotrexat), Alkylantien oder Taxane (Paclitaxel) ein erhöhtes mukotoxisches Potenzial und sind somit mit einer erhöhten Inzidenz und schwereren Verläufen der RIOM assoziiert [5],[73]. Ebenso wie das mukotoxische Potential ist jedoch auch die Wirksamkeit von Chemotherapeutika dosisabhängig. Cisplatin wird beispielsweise in Gesamtdosen von mehr als 200 mg/m<sup>2</sup> benötigt, um eine ausreichende Radiosensibilisierung zu bewirken [111]. Als Verabreichungsschemata stehen sowohl Bolus- als auch wöchentliche Gaben zur Verfügung. Aktuelle Daten bevorzugen eine wöchentliche Cisplatin-Therapie bei allen Primärtumoren im Kopf-Hals-Bereich, da hier bei ähnlicher Wirksamkeit ein besseres Toxizitätsprofil vorliegt [111].

Patientenbezogene Risikofaktoren	Therapiebezogene Risikofaktoren
Kinder und Patienten > 50 Lj.	Chemotherapie: Dosis/ Intensität/ Art des Zytostatikums
Weibliches Geschlecht	Bestrahlung: Dosis/ Fraktionierung
Malnutrition	Kombination Chemo- und Strahlentherapie
Xerostomie	
Pathologische Schleimhautveränderungen vor Beginn der Strahlentherapie vorhanden	
Noxen (Rauchen, Alkohol)	
Genetische Prädisposition	

**Tabelle 2.7.1. Risikofaktoren der oralen Mukositis**

Modifiziert nach Chen et. al [22]

Abkürzungen: Lj. = Lebensjahr

## 2.8. Humanes Mikrobiom und Next-Generation-Sequencing-Verfahren

Die Anzahl der den menschlichen Körper besiedelnden Bakterien entspricht in etwa der Anzahl aller menschlichen Zellen eines Individuums [98]. Nach dem Gastrointestinaltrakt beherbergt die Mundhöhle das umfassendste Mikrobiom des menschlichen Körpers [124]. Unter oralem Mikrobiom versteht man das Genom aller die Mundhöhle besiedelnden Mikroorganismen, zu denen Bakterien und Viren, aber auch Archaeen und Pilze gehören [29],[117].

Aufgrund der Fortschritte in den Sequenzierungstechnologien und der Etablierung von Next-Generation-Sequencing (NGS)-basierten Plattformen wie dem 2008 gegründeten Human Microbiome Project (HMP) [<http://www.hmpdacc.org>] sind diese Daten öffentlich zugänglich und repräsentieren eine Referenzdatenbank für den Genpool des Mikrobioms gesunder Erwachsener [124]. Mit Hilfe des HMP wurden organspezifische Mikrobiom-Datenbanken wie die erweiterte Human Oral Microbiome Database (eHOMD) ins Leben gerufen mit dem Ziel alle Mikroorganismen bestimmter Organsysteme zu identifizieren und zu charakterisieren [13]. In eHOMD sind Informationen über etwa 772 prokaryotische Spezies enthalten, von denen 70% kultivierbar und 30% nicht kultivierbar sind [124]. Mögliche Gründe für diese „Unkultivierbarkeit“ sind unter anderem die Notwendigkeit spezifischer Wachstumsbedingungen inklusive pH-Wert, Nährstoffen, Inkubationstemperaturen oder Abhängigkeit bestimmter Spezies voneinander [120]. Somit war es lange Zeit nicht möglich, allein mit kulturabhängigen Analysen das gesamte Mikrobiom zu charakterisieren. Kulturunabhängige Verfahren ermöglichen eine wesentlich detailliertere Charakterisierung des menschlichen Mikrobioms und haben zu einer Revolution der Mikrobiomforschung geführt. Zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften stehen zwei verschiedene metagenomische Sequenzierungsverfahren zur Verfügung: Shotgun-Metagenomik und 16S-rRNA-Sequenzierung [65]. Mittels Amplifikation und Sequenzierung spezifischer phylogenetischer Markergene (16S-rRNA für Prokaryonten und 18S-rRNA für Eukaryonten) kann die mikrobielle Zusammensetzung einer Probe bestimmt werden [46]. 16S- und 18S-rRNAs gehören zu den kleinen ribosomalen Untereinheiten, welche in jedem prokaryontischen bzw. eukaryontischen

Organismus vorkommen. Als Teil des bakteriellen Ribosoms besteht die 16S-rRNA aus verschiedenen Regionen (V1-V9). Zum einen enthält sie sogenannte konservierte Regionen, die nahezu unverändert in allen Organismen zu finden sind und die Konstruktion universeller Primer für die PCR erlauben. Zum anderen enthält sie hypervariable Regionen, anhand derer die verschiedenen Bakterientaxa identifiziert und voneinander unterschieden werden können [128]. Die phylogenetische Zuordnung der erhaltenen Sequenzen erfolgt über einen Datenbankabgleich [19]. Dies hat dazu geführt, dass für die hierarchische Klassifizierung von Bakterien nicht mehr nur morphologische und phänotypische Merkmale wie z.B. Form, Gram-Färbung und Motilität herangezogen werden. Heutzutage werden die durch Amplikon-Sequenzierungsmethoden gewonnenen Gensequenzen einschließlich des 16S-rRNA-Gens ergänzend zur taxonomischen Klassifikation eingesetzt. Wird die Sequenzierung mittels NGS durchgeführt, können viele rRNA-Fragmente parallel amplifiziert und sequenziert, sodass die gleichzeitige Analyse großer Materialmengen ermöglicht wird [7].

Ein weiteres Verfahren für die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften mittels NGS ist die sogenannte Metagenom-Shotgun-Sequenzierung. Bei dieser Methode wird die vollständige DNS einer Probe sequenziert und die komplette genetische Information einer Probe erfasst [35]. Hierfür werden DNS-Moleküle nach dem Zufallsprinzip in Fragmente zerlegt, die im Anschluss sequenziert werden. Eine vorgeschaltete gezielte PCR-Amplifikation mit der Beschränkung auf ein bakterielles Zielgen ist nicht notwendig. Ein Vorteil besteht somit in einem zusätzlichen Informationsgewinn über andere in der Probe enthaltenen Organismen wie z.B. Viren, Pilze und Parasiten. Ferner kann die Shotgun-Sequenzierung Mikrobiota mit niedriger Abundanz in einer Probe zuverlässiger detektieren und erlaubt eine detaillierte taxonomische Analyse bis auf Speziesebene. Zusätzlich ist die funktionelle Charakterisierung der genetischen Information einer Probe möglich, was unter anderem den Nachweis bakterieller Pathogenitätsfaktoren, Toxin- oder Antibiotikaresistenzen erlaubt [95].

## **2.9. Zusammensetzung des oralen Mikrobioms und Dysbiose**

96% der die gesunde Mundhöhle besiedelnden Bakterien können sechs Bakterienstämmen zugeordnet werden: den Proteobakterien, Spirochäten, Fusobakterien, Actinobakterien, Firmicutes und Bacteroidetes [124]. Ferner kann das orale Habitat in drei Kategorien unterteilt werden, die sich in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung voneinander unterscheiden: Gruppe 1 beinhaltet Wangenschleimhaut, keratinisierte Gingiva und harten Gaumen, Gruppe 2 setzt sich aus Speichel und Zunge zusammen während Gruppe 3 sub- und supragingivale Plaque beinhaltet [94]. Jedes Individuum lebt in Symbiose mit seiner eigenen Mikrobiota. Ein Teil des oralen Mikrobioms wird als sogenanntes Kernmikrobiom bezeichnet und ist zwischen Individuen vergleichbar, obgleich sich das orale Mikrobiom im Laufe der Zeit aufgrund von unterschiedlichen Einflussgrößen wie Alter, Verhaltensweisen, Mundgesundheit, Speichel und Immunstatus verändern kann [90]. Die Mundhöhle weist das größte Kernmikrobiom aller

Organsysteme auf [130]. Dafür sorgen eine stabile, enorale Temperatur von 37°C mit wenig Fluktuation sowie ein Speichel-pH von 6,5 bis 7,5, welcher der bevorzugte pH-Wert von vielen Bakterienspezies ist [1]. Interessanterweise sind anerkannte pathogene Krankheitserreger Teil der kommensalen Mundflora der gesunden Population [94]. Kommt es zu einer Dysbalance des oralen Mikrobioms, kann dies eine wichtige Rolle in der Pathogenese enoraler Erkrankungen wie Parodontose, Karies oder odontogener Infektionen spielen [59]. Hier ist weniger ein einzelner pathogener Keim von Bedeutung, vielmehr ist die Zusammensetzung des oralen Mikrofilms ausschlaggebend [29]. Es ist mittlerweile anerkannt, dass neben enoralen Erkrankungen auch die Entstehung systemischer Erkrankungen wie Diabetes [69], Krebs [57], Autoimmunerkrankungen [66] sowie Endokarditis und Osteomyelitis [119] mit einer oralen Dysbiose assoziiert sein können. Von großem wissenschaftlichem Interesse ist auch die Rolle der oralen Dysbiose in der Pathogenese von Kopf-Hals-Karzinomen. Es konnte eine Assoziation zwischen chronischer Parodontitis und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung prämaligener Läsionen festgestellt werden, welche sich zu einem HNSCC entwickeln können [67]. Einer Studie von Tezal et. al zu Folge erkrankten Patienten mit chronischer Parodontitis aufgrund der chronischen Entzündung häufiger an schlecht differenzierten Tumoren der Mundhöhle [112]. Zusätzlich konnte eine Synergie zwischen chronischer Parodontitis und oraler HPV-Infektion nachgewiesen werden [113].

Die Rolle von Mikroorganismen in der Pathogenese und Progression der oralen Mukositis ist ebenfalls Bestandteil aktueller Forschung. Sonis et al. konnten in einem Tiermodell mit strahleninduzierter Mukositis eine höhere bakterielle Abundanz im ulzerierten Epithel im Vergleich zu intakter Schleimhaut feststellen [106]. Einerseits stellen Ulzerationen eine bevorzugte Kolonisationsstelle dar, andererseits tragen Bakterien an der Ulkusoberfläche aktiv zum Mukositis-Prozess bei. Dies wird unter anderem durch bakterielle Endotoxine bedingt, welche in die Submukosa eindringen und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine durch Leukozyten sowie Makrophagen stimulieren [119]. Die Kolonisation der geschädigten Mundschleimhaut mit Bakterien, Viren oder Pilzen begünstigt außerdem sekundäre Superinfektionen [86] und kann zu einer Bakteriämie führen. Panghal et al. konnten bei bestrahlten Patienten am häufigsten die gram-negativen Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* aus dem Blut isolieren [80]. In Bezug auf Pilzinfektionen während einer Radiotherapie konnte *Candida albicans* als häufigster pathogener Erreger in oralen Samples identifiziert werden [9]. Insgesamt konnte in mehreren kulturabhängigen Studien gezeigt werden, dass sich die normale Bakterienflora im Verlauf einer Radiochemotherapie im Kopf-Hals-Bereich signifikant verändert [2],[74]. Mit kulturunabhängigen Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren von 16S-rRNA-Genen ergab sich, dass diese Veränderungen der oralen Mikrobiota während einer Radiochemotherapie weitaus komplexer sind als bis dahin angenommen [119]. Napenas et al. fanden heraus, dass das orale Mikrobiom während einer

Chemotherapie an Diversität gewinnt [74], während eine Studie von Hu et al. demonstrierte, dass die Diversität des oralen Mikrobioms bei Patienten nach Strahlentherapie abnimmt im Sinne einer negativen Korrelation zwischen der Anzahl der *operational taxonomic units* (OTUs) und der Strahlendosis [49]. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob Veränderungen des oralen Mikrobioms mit dem Auftreten oder der Exazerbation einer RIOM korrelieren. Zhu et al. untersuchten bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom, ob der Schweregrad der Mukositis und die dynamischen Veränderungen des oralen Mikrobioms während der Radiochemotherapie miteinander korrelieren. Ihre Ergebnisse zeigten, dass Patienten, die eine schwere Mukositis entwickelten während der Phase der erythematösen Mukositis eine signifikant geringere bakterielle Alpha-Diversität und eine höhere Abundanz von *Actinobacillus* aufwiesen [133].

## 2.10. Fragestellungen der Arbeit

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, inwieweit die Gesamtheit der die Mundschleimhaut besiedelnden Mikrobiota und ihre individuelle Zusammensetzung für die Entstehung der oralen Mukositis von Bedeutung sind [119]. Außerdem gibt es wenig Studien, die die Veränderungen des oralen Mikrobioms während einer Radio(chemo)therapie mit dem Schweregrad der oralen Mukositis korrelieren [133]. Die grundlegenden Ziele der Arbeit lauten daher wie folgt:

- 1) Primäres Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist die Charakterisierung des oralen Mikrobioms an einem Kollektiv von Patienten mit Indikation zur Strahlentherapie mit oder ohne Chemotherapie bei histologisch gesichertem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich und der Vergleich mit dem oralen Mikrobiom gesunder Probanden basierend auf NGS und bioinformatischen Analysen.
- 2) Als weiteres Ziel wird die Detektion und Beschreibung potenzieller Veränderungen des oralen Mikrobioms des Patientenkollektives vor, während und nach Radio(chemo)therapie verfolgt.
- 3) Es sollen zusätzliche Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen oralem Mikrobiom und der Inzidenz der höhergradigen RIOM gewonnen werden.
- 4) Als sekundäres Ziel sollen Symptomlast unter Radio(chemo)therapie und Mundhygiene erfasst werden.

### **3. Material und Methoden**

Die Durchführung des Forschungsvorhabens wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Kennnummer 291/16 genehmigt. Alle Patienten und ihre Angehörigen wurden umfassend sowohl im ärztlichen Aufklärungsgespräch als auch mit einer schriftlichen Patienteninformation über den Ablauf der Studie aufgeklärt. Von jedem Patienten, der sich zur Teilnahme an der Studie entschloss, wurde eine schriftliche Einwilligungserklärung unterschrieben. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und konnte jederzeit ohne Angabe von Gründen beendet werden. Bei den Patienten, die sich für diese Mikrobiomstudie eignen, wurde ein Tumor im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert. Die Asservierung der Speichelproben erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum des Saarlandes ebenso wie die klinische Beurteilung der Schleimhäute und des Mukositis-Schweregrades. Die Speichelproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der spezifischen Tumorthherapie gesammelt. Es erfolgte ebenfalls die Rekrutierung gesunder Probanden als Kontrollgruppe. Die Probenlagerung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Gastroenterologie (Inneren Medizin II) der Universitätsklinik des Saarlandes. Die Analysen der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB). Die Durchführung der metagenomischen Sequenzierung erfolgte durch das Labor Novogene Europe, europäisches Genom- und Diagnostikzentrum, Cambridge, England.

#### **3.1. Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Einschlusskriterien für die Studie wurden wie folgt definiert:

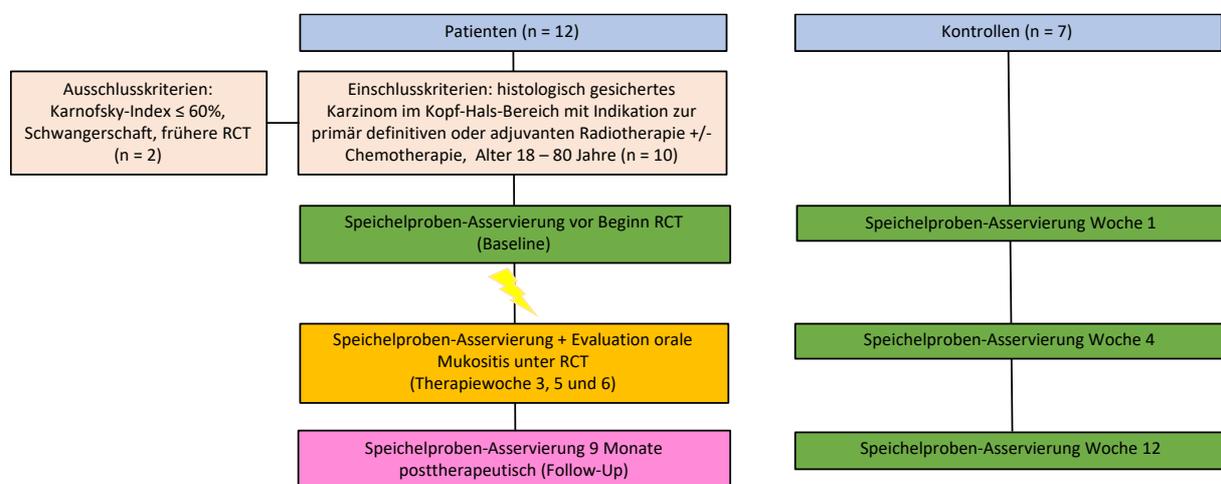
- histologisch gesichertes Karzinom in einer der folgenden Lokalisationen:
  - Mundhöhle
  - Nasopharynx
  - Oropharynx
  - Hypopharynx
  - Larynx
- Indikation zur primär definitiven Radiochemotherapie oder adjuvanten Radiatio (mit oder ohne simultane Chemotherapie) der Tumorregion sowie der zervikalen und supraklavikulären Lymphabflusswege bei Z.n. Tumorresektion
- Alter > 18 und < 80 Jahre
- schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Die Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie lauteten wie folgt:

- Karnofsky – Index  $\leq$  60%
- Schwangerschaft
- vorausgegangene Chemo- oder Strahlentherapie

### 3.2. Studiendesign und Probenasservierung

Die Speichelproben-Asservierung der HNSCC-Patienten erfolgte einmalig vor Beginn der primär definitiven oder adjuvanten RCT (Baseline), während der RCT sowie 9 Monate posttherapeutisch (Follow-Up) (**Abb. 3.3.1.**). Die Behandlungsdauer der RCT belief sich bei allen Patienten auf 6 Wochen. Die Follow-Up-Untersuchung markierte den zeitlichen Endpunkt der Studie. Die Probanden wurden gebeten vor Speichelprobenentnahme eine Nikotinkarenz von 8 Stunden und eine Nahrungskarenz von 1 Stunde einzuhalten. Die Einhaltung wurde dokumentiert. Idealerweise sollte eine Speichelmenge von 3-5 ml in das dafür bereitgestellte Falcon abgegeben werden. Ein Mindestspeichelvolumen von 2 ml wurde akzeptiert. Das Falcon wurde unmittelbar bis zum Weitertransport bei -80 Grad gekühlt gelagert.



**Abb. 3.3.1. CONSORT (“Consolidated Standards of Reporting Trials”) Schema**  
Überblick über Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie den Studienablauf  
Abkürzungen: RCT = Radiochemotherapie

### 3.3. Klinische Untersuchungen

Die Patienten wurden bei Studieneinschluss ausführlich anamnestiziert und körperlich untersucht. Jede Probenentnahme der Patienten wurde von einer ausführlichen Dokumentation folgender klinischer Parameter begleitet:

- enorale Mukositis nach standardisierten WHO- und RTOG-Kriterien
- weitere behandlungsassoziierte Nebenwirkungen (u.a. Schmerzen/ Übelkeit/ Dysgeusie/ Speichelzusammensetzung)
- Einsatz von Schmerzmedikation
- Antibiotikagabe
- supportive, parenterale Ernährung
- Mundhygiene
- Alkoholkonsum- und Rauchverhalten

Die klinische Beurteilung der Schleimhäute erfolgte anhand des unten gezeigten Protokolls (**Tabelle 3.3.1.**) und wurde von einem erfahrenen Untersucher durchgeführt. Das Auftreten und der Schweregrad der oralen Mukositis wurden anhand standardisierter WHO- und RTOG-Kriterien evaluiert (**Tabelle 2.5.1.**).

Erythem	Pseudomembranen	Ulzerationen	Blutungen	
N = nein				
J = ja	F = fleckig		T = bei geringfügigen Traumata	
	K = konfluierend		S = spontan	
n. b. = nicht beurteilbar				
Lokalisation	Erythem	Pseudomembranen	Ulzeration	Blutungen
Oberlippe				
Unterlippe				
rechte Wange				
linke Wange				
Zungenrücken				
rechter Zungenrand				
linker Zungenrand				
Zungenspitze				
Mundboden				
weicher Gaumen				
harter Gaumen				

**Tabelle 3.3.1. Protokoll zur Evaluation der oralen Mukositis anhand ihrer Lokalisation und klinischen Ausprägung**

Die Patienten wurden bei jeder Probenentnahme ausführlich bezüglich behandlungsassoziierter Nebenwirkungen befragt. Hierzu gehörten Dysgeusie, Probleme bei der Nahrungsaufnahme, Dysphagie, Veränderungen der Speichelzusammensetzung bis hin zur Xerostomie, Übelkeit und Erbrechen. Die Beschwerden wurden anhand standardisierter CTCAE-Kriterien evaluiert. Zur subjektiven Schmerzmessung wurde die numerische Rating-Skala eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine eindimensionale Schmerzskala. Der Patient wird hierbei gebeten seinen subjektiv empfundenen Schmerz auf einer Skala von 0-10 einzuordnen. Hierbei steht "10" für "stärkste vorstellbare Schmerzen" und "0" für "keine Schmerzen". Die kumulative Symptomlast wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt dokumentiert und zu einem Score zusammengefasst, bei dem maximal 36 Punkte erreicht werden konnten. Ferner wurde der Einsatz von Analgetika, parenteraler bzw. enteraler Ernährung (via PEG-Sonde) sowie die Anwendung einer oralen oder intravenösen antibiotische Therapie erfasst.

Die Mundhygiene der Patienten wurde prätherapeutisch (Baseline) sowie posttherapeutisch (Follow-Up) detailliert abgefragt und anhand eines Mundhygiene-Scores evaluiert. Eine maximale Punktzahl von 20 Punkten konnte erreicht werden (**Tabelle 3.3.2.**). Bei einer

Punktzahl von 11-20 Punkten wurde die Mundhygiene als „suffizient“ definiert, bei 0-10 Punkten als „unzureichend“.

<b>Haben Sie eine Zahnprothese?</b>	Ja	Nein		
<b>Putzen Sie ihre Zähne nach dem Essen?</b>	Ja (2 Punkte)	Nein (0 Punkte)	Manchmal (1 Punkt)	
<b>Wie oft am Tag putzen Sie ihre Zähne?</b>	1 Mal (1 Punkt)	2 Mal (2 Punkte)	3 Mal (3 Punkte)	> 3 Mal (4 Punkte)
<b>Wie lange putzen Sie ihre Zähne?</b>	1 Min. (1 Punkt)	2 Min. (2 Punkte)	3 Min. (3 Punkte)	> 3 Min. (4 Punkte)
<b>Putzen Sie ihre Zähne mit einer elektrischen Zahnbürste?</b>	Ja (2 Punkte)	Nein (0 Punkte)	Beides (1 Punkt)	
<b>Haben Sie Schmerzen beim Zähneputzen?</b>	Ja	Nein	Manchmal	
<b>Verwenden Sie regelmäßig Zahnseide?</b>	Ja (2 Punkte)	Nein (0 Punkte)	Gelegentlich (1 Punkt)	
<b>Verwenden Sie regelmäßig desinfizierende Mundspülung? (Listerine, Merido, Elmex)</b>	Ja (2 Punkte)	Nein (0 Punkte)	Gelegentlich (1 Punkt)	
<b>Wie regelmäßig gehen Sie zum Zahnarzt?</b>	Alle 6 Monate (4 Punkte)	1x jährlich (3 Punkte)	Alle 2 Jahre (2 Punkte)	Nur bei Beschwerden (1 Punkt)

**Tabelle 3.3.2. Evaluation der Mundhygiene**

**Maximale Punktzahl: 20, suffiziente Mundhygiene: 11-20, unzureichende Mundhygiene: 1-10**

Vor Beginn der RCT wurde, wenn erforderlich, eine Zahnsanierung durchgeführt. Außerdem erhielten alle Patienten eine Schulung zur Optimierung der Mundhygiene. Ein standardisiertes Mundspülprogramm mit Panthenol®-Lutschtabletten, Bepanthen®-Lösung, Moronal®-Suspension und Salbeitee kam während der gesamten RCT zur Anwendung. Ferner wurde auch das Rauch- und Alkoholkonsumverhalten vor und während der RCT wöchentlich abgefragt (**Tabelle 3.3.3.**).

<b>Rauchen Sie aktuell?</b>	Ja	Nein		
<b>Wenn ja, wie viele Zigaretten rauchen Sie täglich?</b>	> 20	20-10	< 10	1-2
<b>Trinken Sie aktuell Alkohol?</b>	Ja	Nein		
<b>Wenn ja:</b>	täglich	> 3 x/Woche	< 3 x/Woche	

**Tabelle 3.3.3. Evaluation des Rauch- und Alkoholkonsumverhalten**

Zum Baseline-Zeitpunkt erfolgte in der Patientenkohorte eine Blutentnahme. Laborparameter, die im Kontext einer oralen Mukositis von Bedeutung sein können, umfassen Entzündungswerte wie das C-reaktive Protein (CRP) und die Leukozytenzahl sowie den bakteriellen Sepsismarker Procalcitonin (PCT). Die laborchemischen Untersuchungen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt. Die Quantifizierung der Leukozytenzahl erfolgte mittels einer durchflusszytometrischen Zählung aus venösem Vollblut durch das Blutzellgerät Sysmex XE 5000 (Sysmex, Frankfurt). Der CRP-

Wert wurde aus dem Patientenplasma mit Hilfe einer Immunturbidimetrie bestimmt (Cobac c 702, Roche, Mannheim). Zur Bestimmung von PCT aus Patientenplasma wurde ELECYC BRAHMS PCT, ein Elektrochemolumineszenz-Immunoassay (ECLIA), eingesetzt (Roche Elecsys® Cobas e801).

In der Kontrollgruppe wurden Speichelproben über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen asserviert (**Abb. 3.3.1.**). Die Mundhygiene wurde in Woche 1 evaluiert, das Rauch- und Alkoholkonsumverhalten zu jedem Untersuchungszeitpunkt. Die Dokumentation weiterer klinischer Parameter entfiel ebenso wie Blutentnahmen.

### **3.4. Sekundäre Probenverarbeitung**

Die weitere Probenverarbeitung und Analyse wurden in Zusammenarbeit mit dem LCSB durchgeführt. Nach abgeschlossener Speichelproben-Asservierung wurde das gesammelte Material an Novogene (UK) Company Limited, 25 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 0FW, United Kingdom, Servicepartner des LCSB, gesendet. Der Versand erfolgte auf Trockeneis, um eine ausreichende Kühlung der Proben auf dem Transport sicherzustellen.

Die aus den Speichelproben extrahierte DNS wurde dort mittels NGS (Illumina Inc., CA) sequenziert. Die mikrobielle DNS wurde gemäß des Protokolls des Magnetic Swab DNA Kit nach Angaben des Herstellers (Tiangen, 4992410/4992411) isoliert und gereinigt. Nach der Extraktion der Nukleinsäuren aus den Speichelproben wurde die DNS-Konzentration und Reinheit wie folgt überprüft:

- Die DNS-Degradation und die potenzielle Kontamination wurden auf 1%-igem Agarosegel überprüft.
- Die Reinheit der DNS (OD260/OD280, OD260/OD230) wurde mittels NanoPhotometer®-Spektrophotometer (IMPLEN, CA, USA) überprüft.
- Die DNS-Konzentration wurde mittels Qubit® dsDNA Assay Kit mittels Qubit® 2.0 Fluorimeter (Life Technologies, CA, USA) gemessen.

Nach dieser Qualitätskontrolle folgte im nächsten Schritt die Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken. Hierfür wurde eine Gesamtmenge von 1 µg DNS pro Probe verwendet. Die Sequenzierungsbibliotheken wurden mittels NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit für Illumina (NEB, USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers erstellt. Die Nukleinsäuren wurden mit Indexcodes markiert, um jeder Probe Sequenzen zuordnen zu können.

Im ersten Schritt wurde die genomische DNS auf eine Größe von 350 Basenpaaren mechanisch fragmentiert. Die entstandenen Fragmente wurden an den Enden repariert, polyadenyliert und mit Illumina-Adaptoren ligiert. Die ligierten Fragmente wurden mittels Illumina-Paired-End-Sequenzierung weiterverarbeitet und durch PCR amplifiziert.

Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte gereinigt (AMPure XP System) und auf ihre Größe hin selektiert (Agilent2100 Bioanalyzer). Daraufhin erfolgte die Amplifikation der selektierten und gereinigten DNS-Fragmente mittels Real-Time-PCR. Die amplifizierten Cluster wurden anschließend auf einer Illumina HiSeq-Plattform sequenziert.

Nach der Sequenzierung folgt im nächsten Schritt die Assemblierung des Metagenoms einer jeden Probe sowohl mittels referenzbasierter als auch de-novo Assemblierung. Reads die nicht in der ersten Assemblierung verwendet wurden, wurden für die gemischte Assemblierung zusammengefügt, um die Informationen über Arten mit geringer Häufigkeit in den Proben zu untersuchen.

Die Genvorhersage wurde mittels MetaGeneMark durchgeführt und ein Genkatalog erstellt. Auf Grundlage der effektiven Daten jeder Probe aus dem Genkatalog konnten Abundanzinformationen ermittelt werden. Im nächsten Schritt wurden die metagenomischen Reads mit der Datenbank der taxonomisch informativen Genfamilien verglichen und der jeweiligen mikrobiellen Taxonomie zugeordnet.

Neben der taxonomischen Analyse wurde auch eine funktionelle Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der Datenbank für Antibiotikaresistenz-Gene (CARD) konnte die Häufigkeit von Antibiotikaresistenz-Genen (ARG) und deren Verteilung in der Artenklassifizierung ermittelt werden.

### **3.5. Statistische Auswertung**

Die Artenvielfalt innerhalb einer Probe wird mittels Alpha-Diversität beschrieben. Der Artenreichtum, das heißt die Anzahl der in einem Habitat vorhandenen Arten, ist das einfachste Maß für die Alpha -Diversität. Einige der gängigen Alpha-Diversitätsindizes sind der Shannon- und Chao-Index [20],[114]. Letzterer unterteilt sich in Chao-1 und Chao-2-Index. Der Chao-1-Index basiert seine Berechnungen auf Abundanz-Informationen einer Probe, während der Chao-2-Index das Artenvorkommen, also Daten, die das Fehlen oder Vorhandensein einer Art in einer Probe angeben, benötigt. Der Chao-Index für die Schätzung des Artenreichtums in einem bestimmten Lebensraum ergibt sich aus der folgenden Gleichung [20]:

$$S_{(\max)\text{Chao}} = S_{obs} + (a^2 + b^2)$$

Der Shannon-Index, ist einer der am häufigsten verwendeten Diversitätsindizes in der ökologischen Literatur und misst, im Gegensatz zum Chao1-Index, welcher nur den Artenreichtum misst, auch die Verteilung von Individuen in einer Population [114]. Er quantifiziert die Unsicherheit bei der Vorhersage der Artenidentität eines zufällig aus dem Datensatz entnommenen Individuums und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$H' = -\sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

Während sich die Alpha-Diversität auf die Variation des Artenreichtums innerhalb einer Gemeinschaft bzw. Probe konzentriert, quantifiziert die Beta-Diversität die (Un-)Ähnlichkeiten zwischen Gemeinschaften bzw. Proben. Die in dieser Arbeit verwendeten Beta-Diversitätsmaße sind:

- der Bray-Curtis-Index (für Zusammensetzungsdaten)
- die Unifrac-Distanzen (welche phylogenetische Stammbauminformationen berücksichtigen)

Wird der Bray-Curtis-Algorithmus zur Berechnung des Distanzmaßes verwendet berechnet sich der Beta-Abstand nach der relativen taxonomischen Häufigkeit. Der Bray-Curtis-Index, bestimmt die Verschiedenheit (Ähnlichkeit) von mikrobiellen Gemeinschaften, basierend auf der Manhattan-metric-Funktion, und liegt dabei im Wertebereich zwischen 0 (ähnlich) und 1 (unähnlich) [17]. Die Formel lautet wie folgt:

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

Auf der Grundlage taxonomischer und funktioneller Häufigkeitstabellen werden Clustering-Analysen sowie verschiedene Ordinationsverfahren eingesetzt, um die errechnete Distanzmatrix zwischen Proben in einem zweidimensionalen Diagramm graphisch darzustellen [75]. Ordinationsverfahren zielen darauf ab, so viele Informationen der mikrobiellen Daten wie möglich in einer niedrigdimensionalen Darstellung zu erfassen. Zu den hier verwendeten Ordinationsmethoden gehören:

- Hauptkomponentenanalyse (PCA)
- metrische mehrdimensionale Skalierung (MDS)
- nicht-metrische mehrdimensionale Skalierung (NMDS)

Bei der MDS, auch Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) genannt, entspricht die räumliche Distanz der Proben den Ähnlichkeiten nach Bray-Curtis [17]. Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA) werden die euklidischen Abstände zwischen den Proben berechnet [75]. Es handelt sich um lineare Kombinationen der ursprünglichen Variablen. Bei der NMDS müssen keine Voraussetzungen für die Daten bezüglich ihrer Linearität oder Verteilung erfüllt sein. Der sogenannte „Stress-Wert“ stellt ein Maß für die statistische Güte der Ordination dar, Werte < 0,05 zeigen eine repräsentative Verteilung an [75].

Zur Bewertung der Beta-Diversität wurde zusätzlich die Ähnlichkeitsanalyse („Analysis of Similarity“ – ANOSIM“) verwendet. Es handelt sich um einen nicht-parametrischen Test, welcher Gruppenvergleiche basierend auf einer (Un-)Ähnlichkeitsmatrix erlaubt ohne als Voraussetzung ein konkretes Verteilungsmuster z.B. eine Normalverteilung zu benötigen [24]. Die ANOSIM testet die Nullhypothese ( $H_0$ ), wonach keine Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft der untersuchten Gruppen vorliegen. ANOSIM hilft somit die Angemessenheit der a priori getroffenen Gruppeneinteilung zu bewerten, indem festgestellt wird, ob die Variation zwischen den Gruppen signifikant größer ist als die Variation innerhalb der Gruppen. Der sogenannte Testwert R („Global R“) steht für die Unterscheidbarkeit zwischen den Gruppen und kann einen Wert zwischen -1 und 1 annehmen. Je näher R an 1 liegt, desto größer sind die Unterschiede zwischen den Gruppen im Vergleich zu den Unterschieden innerhalb der Gruppen. Der p-Wert gibt zusätzlich das Konfidenzniveau der statistischen Analyse an, sodass bei  $p < 0,05$  ein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt.

Um unterschiedliche Merkmale wie z.B. mikrobielle Taxa mit signifikanter Variation zwischen zwei oder mehreren Gruppen herauszufiltern können unter anderem eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA) der Effektgröße (LEfSe-Analyse) oder Metastats verwendet werden. LEfSe ist ein Algorithmus, welcher die hochdimensionale Entdeckung von Biomarkern ermöglicht, indem er genomische Merkmale identifiziert, die Unterschiede zwischen zwei oder mehreren biologischen Zuständen charakterisieren [93]. LEfSe bestimmt Merkmale, welche am Wahrscheinlichsten Unterschiede zwischen diesen Gruppen erklären, indem es Standardtests für statistische Signifikanz mit zusätzlichen Tests für biologische Konsistenz und Effektgröße verknüpft. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Dies ermöglicht die Charakterisierung mikrobieller Taxa, die für eine Versuchs- oder Umweltbedingung spezifisch sind, sowie die Identifizierung metagenomischer Biomarker in verschiedenen Gemeinschaften [93].

Metastats wurde im Zusammenhang mit metagenomischen Daten entwickelt, die mehrere Proben umfassen, und stützt sich auf einen nichtparametrischen t-Test zum Nachweis unterschiedlich häufiger Merkmale in metagenomischen Studien [127]. Es wird ein Permutationstest zwischen den Gruppen auf jeder taxonomischen Ebene durchgeführt und einen p-Wert zu erhalten. Anschließend wird die Falscherkennungsrate („False Discovery Rate“ – FDR) nach Benjamini und Hochberg verwendet, um den p-Wert zu korrigieren und einen q-Wert zu erhalten, um somit Taxa mit signifikanter Variation zwischen untersuchten Proben zu entdecken [127].

Die Visualisierung der Ergebnisse der LEfSe-Analyse und Metastats erfolgte in dieser Arbeit mittels Box-Plot-Diagramm und Heatmap. Der absolute Z-Wert der Heatmap stellt den Abstand zwischen Rohwert und Mittelwert der Grundgesamtheit in Einheiten der

Standardabweichung dar. "Z" ist negativ, wenn der Rohwert kleiner als der Mittelwert ist, und positiv, wenn er größer ist. Der Farbbereich der Heatmap reicht von rot für positive Z-Score-Werte bis blau für negative Z-Score-Werte, wobei blau für eine Abreicherung und rot für eine Anreicherung des jeweiligen Taxons in einer Probe steht.

Alle klinischen Parameter, die Anzahl nicht-redundanter Gene sowie die Alpha-Diversitätsindices wurden mit Hilfe eines Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung geprüft. Bei Normalverteilung wurde der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung des Mittelwerts angegeben. Die Lagebeschreibung nicht-normal verteilter Variablen erfolgte durch den Median sowie das 25%- und 75%-Quartil. Zum Gruppenvergleich qualitativer Merkmale diente der Chi-Quadrat-Test, Unterschiede hinsichtlich quantitativer Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Zum Vergleich verbundener Messwerte erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung. Alle Analysen wurden mit dem SPSS-Statistikprogramm (Version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Probandenmerkmale bei Studieneinschluss

Im Zeitraum von März 2017 bis Mai 2018 wurden insgesamt 10 Patienten und 7 gesunde Probanden in die longitudinale, prospektive Zeitreihenstudie eingeschlossen und bis März 2019 nachverfolgt. Initial erfüllten 12 Patienten die Kriterien zur Studienaufnahme. Patient 2 schied im Verlauf auf eigenen Wunsch aus der Studie aus. Im Rahmen der Auswertungen der klinischen sowie Mikrobiom-Daten entschieden wir uns dazu Patient 10 nachträglich aus der Studie auszuschließen. Bei der Grunderkrankung des Patienten hatte es sich um ein zervikales CUP-Syndrom gehandelt, welches nicht als Einschlusskriterium definiert war und somit nicht zur Zielpopulation dieser Studie zählte. **Tabelle 4.1.1.** fasst die erhobenen Probandenmerkmale zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (Baseline) zusammen.

Variable	Patient (n = 10)	Kontrollgruppe (n = 7)	p
Alter	64,4±7,7	31±9,5	0,001
Männlich	10 (100%)	2 (28,6%)	0,001
BMI Baseline	28±6,5	24,7±5,4	0,204
Aktiver Raucher	1 (10%)	3 (42,9%)	0,116
Ex-Raucher	7 (70%)	0	0,004
Nichtraucher	2 (20%)	4 (57,1%)	0,155
Py	41±34	8±2	0,195
Py <10	0 (0%)	2 (67,7%)	0,011
Py 10-39	3 (37,5%)	1 (33,3%)	0,898
Py ≥40	5 (62,5%)	0 (0%)	0,064
Karnofsky-Index (in %)	90 (80-90)	100 (100-100)	<0,0001
Leukozyten	6,8±1,6	n.d.	
Procalcitonin	0,05±0,02	n.d.	
C-reaktives Protein	3 (1,6-10,7)	n.d.	
Symptomlast prätherapeutisch	0 (0-0)	n.d.	
Symptomlast therapeutisch	16 (13-19)	n.d.	
Symptomlast posttherapeutisch	7 (2-9)	n.d.	
Suffiziente Mundhygiene Baseline	5 (50%)	7 (100%)	
Suffiziente Mundhygiene posttherapeutisch	8 (80%)	n.d.	

**Tabelle 4.1.1. Baseline-Charakteristika, Mundhygieneevaluation und Symptomlast**

Abkürzungen: BMI= Body Mass Index, Py = Pack years, n.d. = nicht durchgeführt

Die eingeschlossenen Patienten waren ausschließlich männlich und in einem mittleren Alter von  $64,4 \pm 7,7$  Jahren. Ferner waren die meisten Patienten gemäß dem BMI mit einem mittleren Wert von  $28 \pm 6,5$  kg/m<sup>2</sup> zu Beginn der Studie übergewichtig. In 7 Fällen handelte es sich bei den Patienten um Ex-Raucher (70%), ein Patient war aktiver Raucher (10%). Die Kontrollgruppe bestand aus 7 gesunden Probanden (n = 7), zwei davon waren männlich (28,6%). Die gesunden Probanden waren mit einem mittleren Alter von  $31 \pm 9,5$  Jahren deutlich jünger als die Patienten. Zu der Kontrollgruppe zählten 3 aktive Raucher (42,9%) sowie 4 Nicht-Raucher.

#### 4.2. Tumormerkmale, tumorspezifische Therapie und orale Mukositis

Das Patientenkollektiv gestaltete sich sowohl in Bezug auf die tumorspezifische Therapie als auch in Bezug auf die Tumorlokalisationen als recht homogen. Bei 8 Patienten (80%) wurde ein Oropharynx-Karzinom diagnostiziert, 2 Patienten (20%) litten an einem Mundhöhlen-Karzinom. Histologisch handelt es sich bei allen Tumoren um Plattenepithelkarzinome, welche ebenfalls alle eine p16-Positivität aufwiesen. 50 % der Karzinome waren zusätzlich HPV positiv (**Tabelle 4.2.1.**). Die Hälfte der Patienten wurden mittels adjuvanter Radiochemotherapie behandelt, die andere Hälfte mittels primär definitiver Radiochemotherapie. Bei allen Patienten wurde eine Systemtherapie mit Cisplatin durchgeführt, ein Patient erhielt zusätzlich Paclitaxel. Die Gesamtreferenzdosis der strahlentherapeutischen Behandlung lag zwischen 59,92 und 72 Gy. Alle Patienten konnten die Radiotherapie über insgesamt 6 Wochen komplettieren. Bei einem Patienten konnte der 6. Zyklus Cisplatin aufgrund eines Infektes nicht appliziert werden.

Variable	Patient (n = 10)
Oropharynx-Karzinom	8 (80%)
Mundhöhlen Karzinom	2 (20%)
Plattenepithelkarzinom	10 (100%)
T 3-4	4 (40%)
N +	8 (80%)
M 0	10 (100%)
HPV + / p16 +	5 (50%)
HPV - / p16 +	5 (50%)
Primär definitive Radiochemotherapie	5 (50%)
Adjuvante Radiochemotherapie	5 (50%)
Mundhöhle konturiertes Volumen (ml)	$92,34 \pm 11,62$
Mittlere Dosis Summenplan (Gray)	$62,64 \pm 5,67$
Cisplatin	9 (90%)
Paclitaxel + Cisplatin	1 (10%)

**Tabelle 4.2.1. Tumorlokalisation und -histologie, TNM-Klassifikation sowie Therapieregime**  
Tumorstadien gemäß UICC für p16-positive Oropharynxkarzinome

Abkürzungen: HPV = Humanes Papillomavirus, T = Primärtumor, N = regionäre Lymphknoten, M = Fernmetastasen

In Bezug auf die RIOM wurde die Patientenkohorte in zwei Subgruppen unterteilt (Low-grade [LGM] vs. High-grade Mukositis [HGM]). Bei 90% der Patienten konnte im Verlauf der RCT eine RIOM dokumentiert werden. Fünf Patienten entwickelten im Beobachtungszeitraum eine HGM (50%, n = 10), welche definiert war als Mukositis  $\geq$  Grad 3 auf der RTOG- und/oder der WHO-Skala zu einem beliebigen Zeitpunkt während der RCT. Im Gesamtbeobachtungszeitraum benötigten 5 Patienten eine antibiotische Therapie aufgrund eines Infektes (50%). **Tabelle 4.2.2.** bietet einen detaillierten Überblick über das Therapieregime inklusive etwaiger Antibiotikatherapie sowie dem maximalen Grad der RIOM unter RCT.

Pt.	Lj.	Raucher- status	Tumor- Lokalisation	RCT	Radiatio/ Chemotherapie	ABT	Mukositis (RTOG/WHO)
1	69	Ex-Nikotin	Oropharynx	aRCT	66 Gy à 2 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)		Low-grade
3	69	Nicht- Raucher	Oropharynx	aRCT	59,92 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)	F	Low-grade
4	67	Ex-Nikotin	Oropharynx	pdRCT	63,6 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 2 Zyklen Cisplatin + Paclitaxel	C, U	High-grade
5	68	Raucher	Mundhöhle	aRCT	66 Gy à 2 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)	F, C, V	Low-grade
6	50	Ex-Nikotin	Oropharynx	aRCT	59,92 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)		Low-grade
7	70	Ex-Nikotin	Oropharynx	aRCT	60 Gy à 2 Gy + 1 nicht entfernter LK 67,5 Gy/ 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)		High-grade
8	65	Ex-Nikotin	Oropharynx	pdRCT	72 Gy kombiniert normo- /hyperfraktioniert 2x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)		High-grade
9	69	Ex-Nikotin	Mundhöhle	pdRCT	72 Gy 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)*	D**	High-grade
11	78	Nicht- Raucher	Oropharynx	pdRCT	70 Gy 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)	F	High-grade
12	72	Ex-Nikotin	Oropharynx	pdRCT	70 Gy 1x tgl., 5x wöchentlich 6 Zyklen Cisplatin (wöchentlich)		Keine

**Tabelle 4.2.2. Überblick über verschiedene Patientencharakteristika inklusive detailliertes Therapieregime der Radiochemotherapie sowie Antibiotikatherapie und maximaler Grad der oralen Mukositis unter Radiochemotherapie**

Abkürzungen: ABT = Antibiotikatherapie, F = Fluorchinolone, C = Clindamycin, V = Vancomycin, D = Doxycyclin, U = Unacid, aRCT = adjuvante Radiochemotherapie, pdRCT = primär definitive Radiochemotherapie, Gy = Gray, Lj. = Lebensjahr, Pt. = Patient, LK = Lymphknoten tgl. = täglich, RTOG = Radiation Therapy Group-Skala, WHO World Health Organization- Skala

\*6. Zyklus nicht verabreicht (Infekt)

\*\*während der Nachsorge

Unter der RCT entwickelten einige Patienten eine zunehmende Xerostomie, welche die Speichelprobenentnahme erschwerte. Bei Patient 6 und Patient 7 war die Mundtrockenheit in Therapiewoche 6 so ausgeprägt, dass eine Speichelprobenentnahme nicht mehr möglich war und somit Proben aus Therapiewoche 5 für die NGS-Untersuchungen verwendet werden mussten. Beide Probanden hatten jedoch in Therapiewoche 5 und 6 eine ähnliche klinische Ausprägung der RIOM gezeigt (**siehe Tabelle 4.7.1.**). Sample-IDs und fehlende Speichelproben sind **Tabelle 4.2.3.** zu entnehmen.

Patient	Baseline = 01	RCT Woche 3 = 04		RCT Woche 5 = 06	RCT Woche 6 = 07		Nachsorge Woche 36 = 12
1	P01_01	P01_04		P01_06	P01_07		P01_12
3	P03_01	P03_04		P03_06	P03_07		P03_12
4	P04_01	P04_04		P04_06	P04_07		P04_12
5	P05_01	P05_04		P05_06	P05_07		P05_12
6	P06_01	P06_04		P06_06	P06_07		P06_12
7	P07_01	P07_04		P07_06	P07_07		P07_12
8	P08_01	P08_04		P08_06	P08_07		P08_12
9	P09_01	P09_04		P09_06	P09_07		P09_12
11	P11_01	P11_04		P11_06	P11_07		P11_12
12	P12_01	P12_04		P12_06	P12_07		P12_12
Kontrolle	Woche 1 = 01		Woche 4 = 04			Woche 12 = 10	
1	K01_01		K01_04			K01_10	
2	K02_01		K02_04			K02_10	
3	K03_01		K03_04			K03_10	
4	K04_01		K04_04			K04_10	
5	K05_01		K05_04			K05_10	
6	K06_01		K06_04			K06_10	
7	K07_01		K07_04			K07_10	

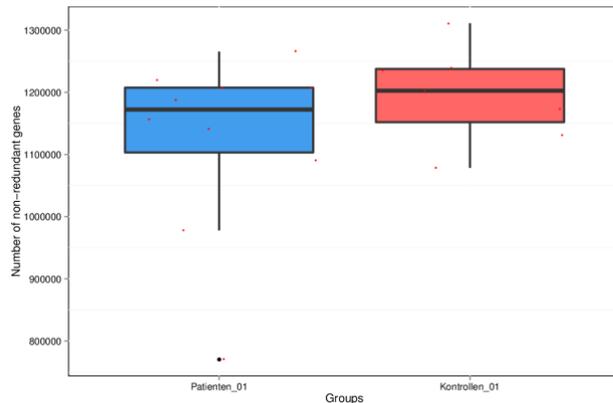
**Tabelle 4.2.3. Sample-IDs der Speichelproben von Patienten und gesunden Kontrollen**

Fehlende Samples sind orange markiert (Xerostomie), für die metagenomischen Untersuchungen des oralen Mikrobioms wurden jeweils Samples aus der vorherigen Therapiewoche verwendet.

Abkürzungen: RCT = Radiochemotherapie

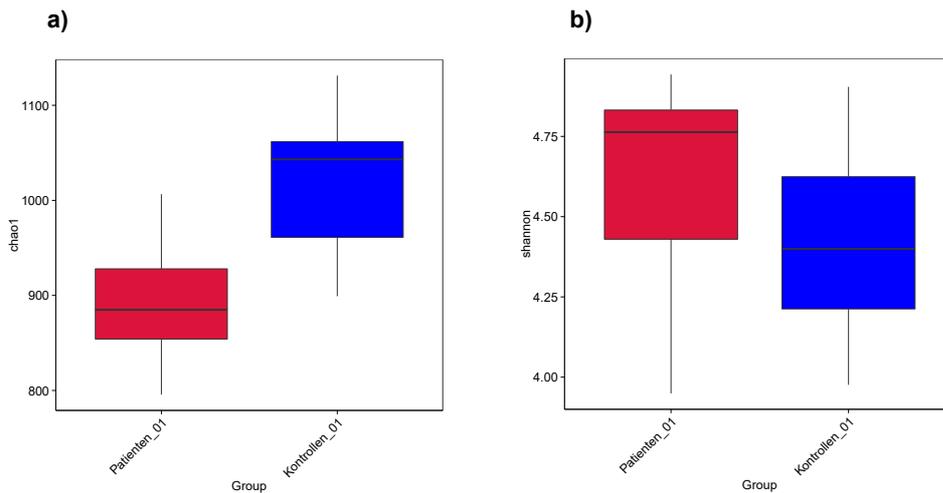
#### 4.3. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen vor Therapiebeginn

Zunächst verglichen wir das orale mikrobielle Profil zwischen gesunden Kontrollen und HNSCC-Patienten vor Therapiebeginn. Zum prätherapeutischen Zeitpunkt wurde in der Patientenkohorte eine niedrigere Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene festgestellt als in der gesunden Kontrollgruppe, diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (Mittelwert  $1122596 \pm 147519$  vs.  $1196003 \pm 76701$ ,  $p = 0,249$ ) (**Abb. 4.3.1.**)



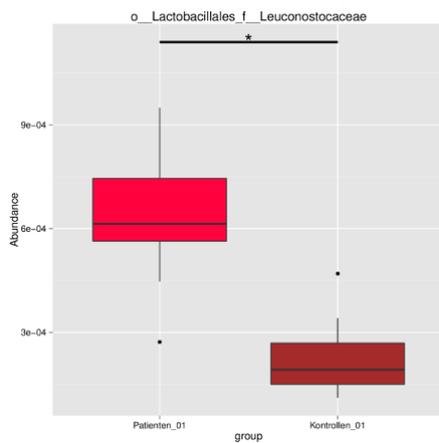
**Abb. 4.3.1.** Boxplot der Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms von Patienten und gesunden Kontrollen vor Beginn einer RCT. Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.

Unsere Ergebnisse zeigten einen signifikant niedrigeren Chao-1-Index bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ( $p = 0,005$ ) auf Gattungsebene, während sich der Shannon-Index nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen zum Baseline-Zeitpunkt unterschied ( $p = 0,27$ ) (**Abb. 4.3.2.**) Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Beta-Diversität feststellen, als wir Patienten und Kontrollen zum Baseline-Zeitpunkt ( $p = 0,182$ ) verglichen.



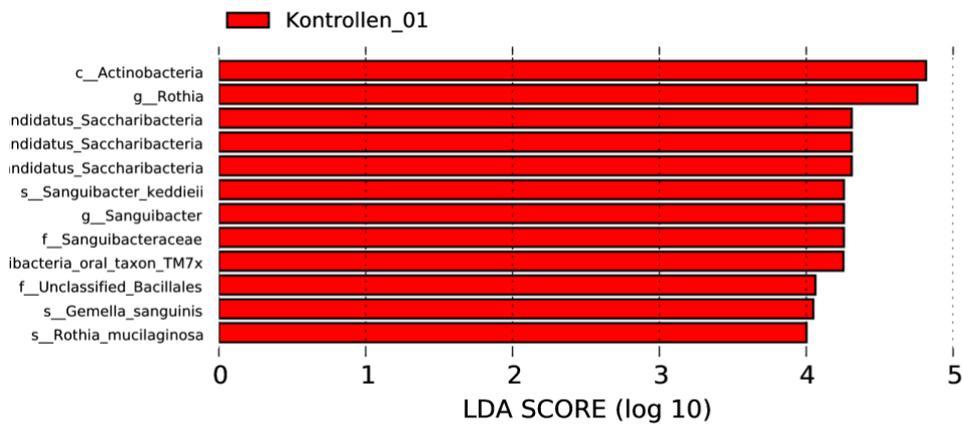
**Abb. 4.3.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms von Patienten und gesunden Kontrollen vor Beginn einer RCT auf Gattungsebene.

In der Metastats-Analyse zeigte sich, dass bakterielle Taxa der Familie Leuconostocaceae in der Patientenpopulation eine höhere relative Abundanz aufwiesen als in der gesunden Kontrollgruppe.



**Abb. 4.3.3.** Boxplot des Taxons Leuconostocaceae mit signifikant abweichender relativer Abundanz ( $p < 0,05$ ) im oralen Mikrobiom zwischen Kontrollgruppe und Patienten vor Beginn einer RCT auf Familienebene. Die relative Häufigkeit des Taxons wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. Oberhalb des Boxplots ist das Taxon aufgetragen, auf das sich der Boxplot bezieht.

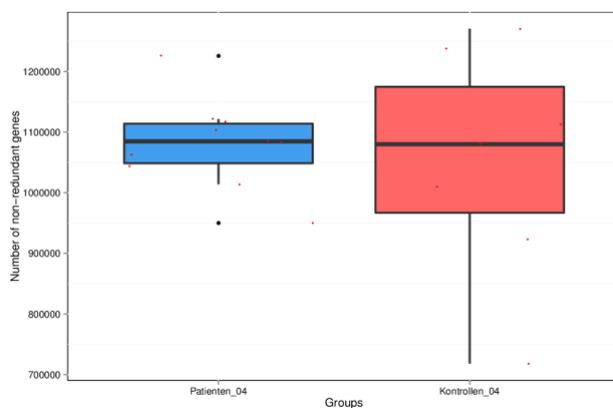
Zwölf Taxa mit signifikant höherer relativer Häufigkeit in der Kontrollgruppe im Vergleich zu Patienten wurden zum prätherapeutischen Zeitpunkt detektiert, unter anderem Klasse Actinobacteria, einschließlich der Gattung *Rothia* und Spezies *Rothia mucilaginosa*, Phylum Candidatus Saccharibacteria, Familie Sanguibacteraceae, einschließlich Gattung *Sanguibacter* und Spezies *Sanguibacter keddiej* sowie Spezies *Gemella sanguinis* waren bei gesunden Probanden signifikant angereichert (**Abb. 4.3.4.**).



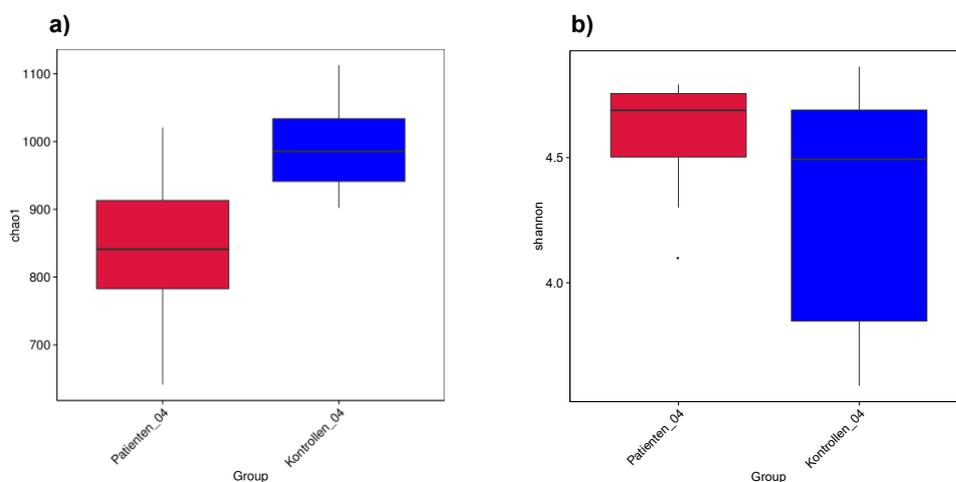
**Abbildung 4.3.4.** LEfSe-Analyse des oralen Mikrobioms von Patienten und gesunden Kontrollen vor Beginn der RCT. Die horizontalen Balken stellen die Effektgröße für jedes Taxon dar. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Er entspricht der Länge der Balken und wird durch vertikale gepunktete Linien angezeigt. Gesunde Kontrollen sind rot gekennzeichnet. Jeder Balken entspricht einem mikrobiellen Taxon mit statistisch signifikant unterschiedlicher relativer Häufigkeit in den untersuchten Gruppen ( $p < 0,05$ ). Der Name der Taxonebene wird als p-Stamm (phylum); c-Klasse (class); o-Ordnung (order); f-Familie (family), g-Gattung (genus) und s-Spezies (species) abgekürzt.

#### 4.4. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen unter Radiochemotherapie

Im nächsten Schritt wurde das orale Mikrobiom der gesunden Kontrollgruppe mit dem oralen Mikrobiom der Patienten während der Radiochemotherapie verglichen. In Therapiewoche 3 unterschied sich die Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene nicht wesentlich zwischen gesunder Kontrollkohorte und Patienten (Mittelwert  $1080801 \pm 72897$  vs.  $1050323 \pm 189834$ ,  $p = 0,698$ ) (**Abb. 4.4.1.**), wobei die Kontrollkohorte eine größere Varianz aufwies. Wir konnten einen signifikant niedrigeren Chao-1-Index bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ( $p = 0,007$ ) unter Radiochemotherapie auf Gattungsebene identifizieren, während sich der Shannon-Index nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen unterschied ( $p = 0,27$ ) (**Abb. 4.4.2.**).

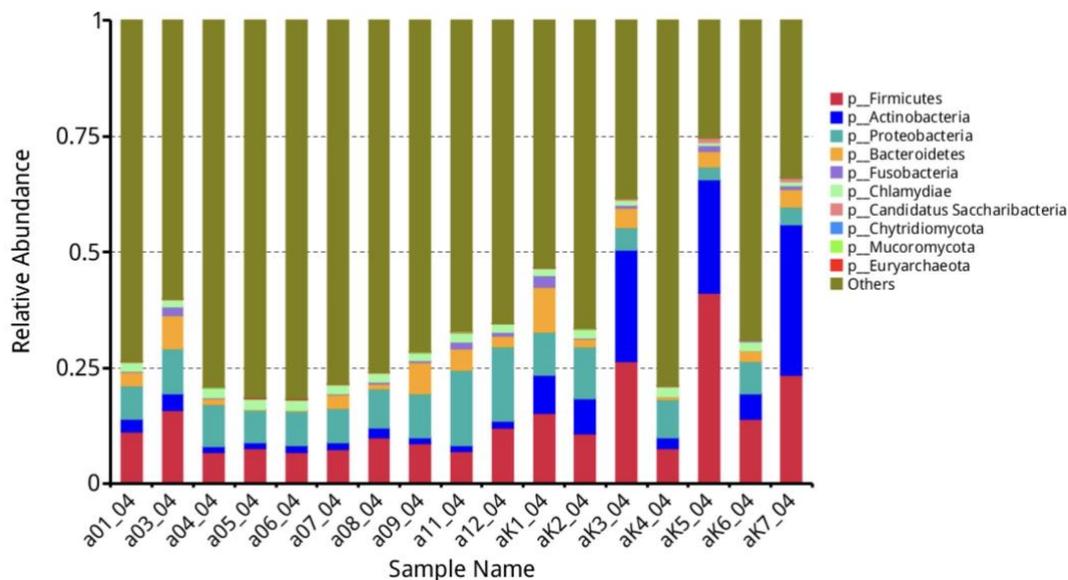


**Abbildung 4.4.1.** Boxplot der Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms von Patienten während der RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen. Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.



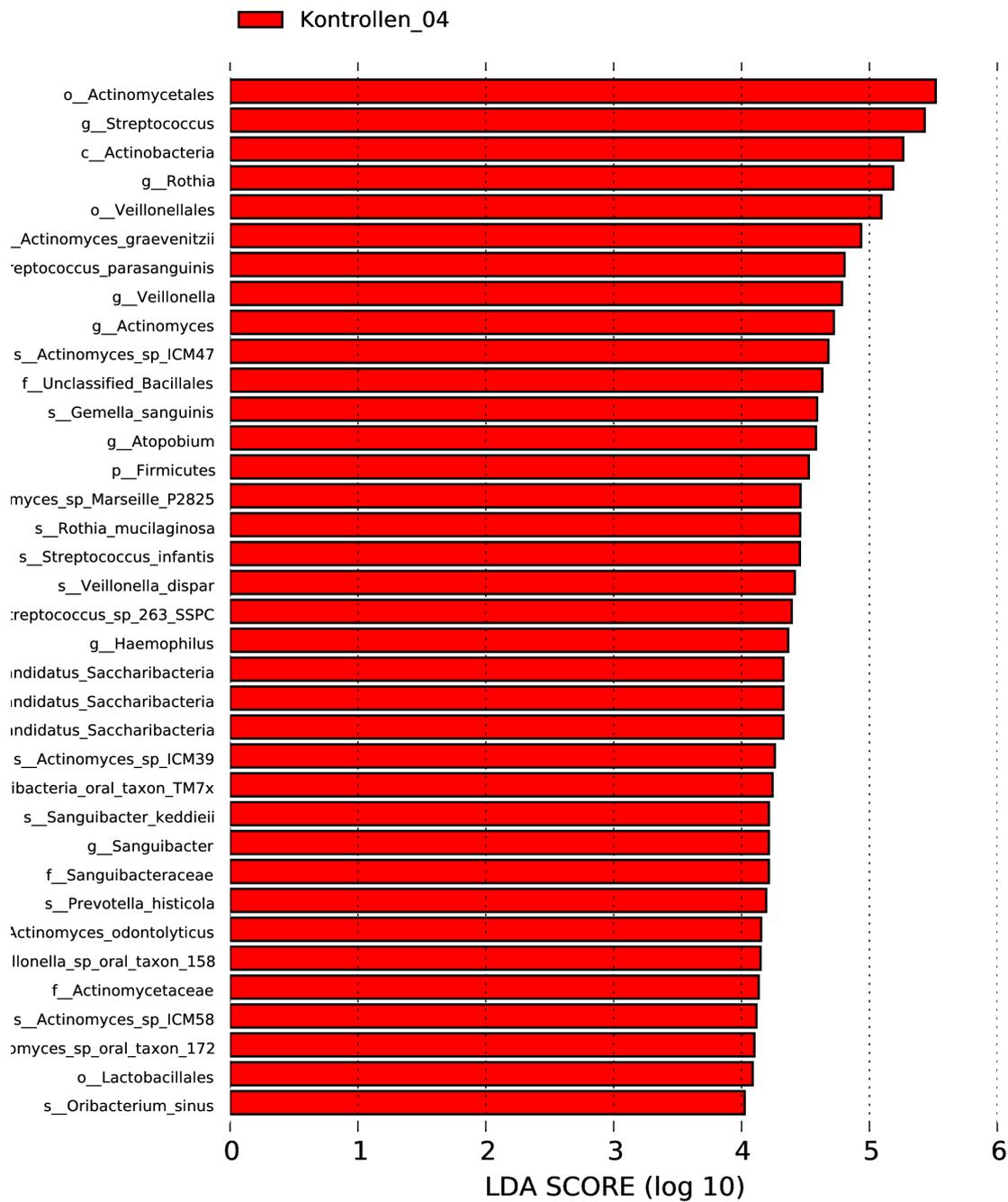
**Abbildung 4.4.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms von Patienten während der RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen auf Gattungsebene.

Die relative Abundanz der 10 häufigsten mikrobiellen Taxa des oralen Mikrobioms von Patienten während der RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen auf Stammebene ist in **Abb. 4.4.3.** dargestellt. Folgenden 5 Phyla dominierten das orale Mikrobiom zu diesem Untersuchungszeitpunkt: Firmicutes (9,29 % vs. 19,81 %), Actinobacteria (1,81 % vs. 14,92 %), Proteobacteria (9,85 % vs. 6,72 %), Bacteroidetes (2,94 % vs. 3,66 %) und Fusobacteria (0,55 % vs. 0,87 %). Sequenzen mit geringer Häufigkeit oder Sequenzen, die keiner bekannten Gruppe zugeordnet werden konnten, wurden unter "Others" zusammengefasst (73,4% vs. 52,13%).



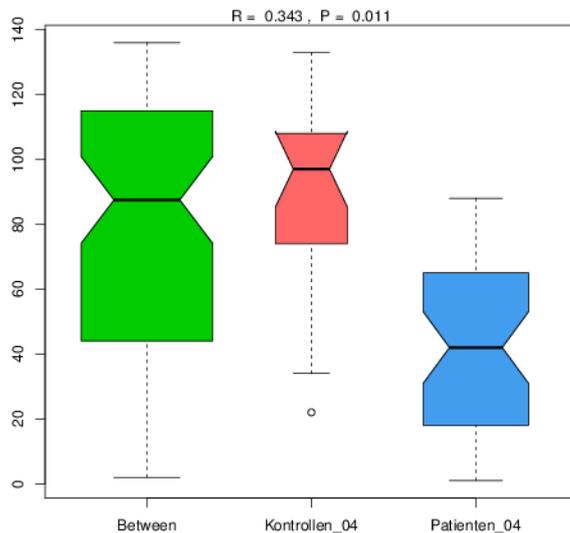
**Abb. 4.4.3.** Balkendiagramm der relativen Abundanz der 10 häufigsten mikrobiellen Taxa des oralen Mikrobioms von Patienten während der RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen auf Stammebene. Die relative Häufigkeit der Taxa wird auf der Y-Achse, die Sample-IDs auf der X-Achse dargestellt. Jeder Balken entspricht einer Probe. Die mikrobiellen Taxa sind nach Farben kodiert und der Legende zu entnehmen. Alle anderen Taxa wurden als "Others" zusammengefasst.

In der LEfSe-Analyse zeigt sich 36 Mikrobiota auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen, die bei gesunden Individuen im Vergleich zur Patientenkohorte in Therapiewoche 3 signifikant angereichert waren, unter anderem die Phyla Candidatus Saccharibacteria und Firmicutes, ebenso wie Gattung *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Atopobium*, *Haemophilus* und *Sanguibacter* (**Abb. 4.4.4.**). Alle 12 Taxa, die bereits vor Beginn der RCT in der Kontrollgruppe angereichert waren, konnten ebenfalls unter RCT vermehrt in der Kontrollgruppe festgestellt werden (**Abb. 4.3.4.**).



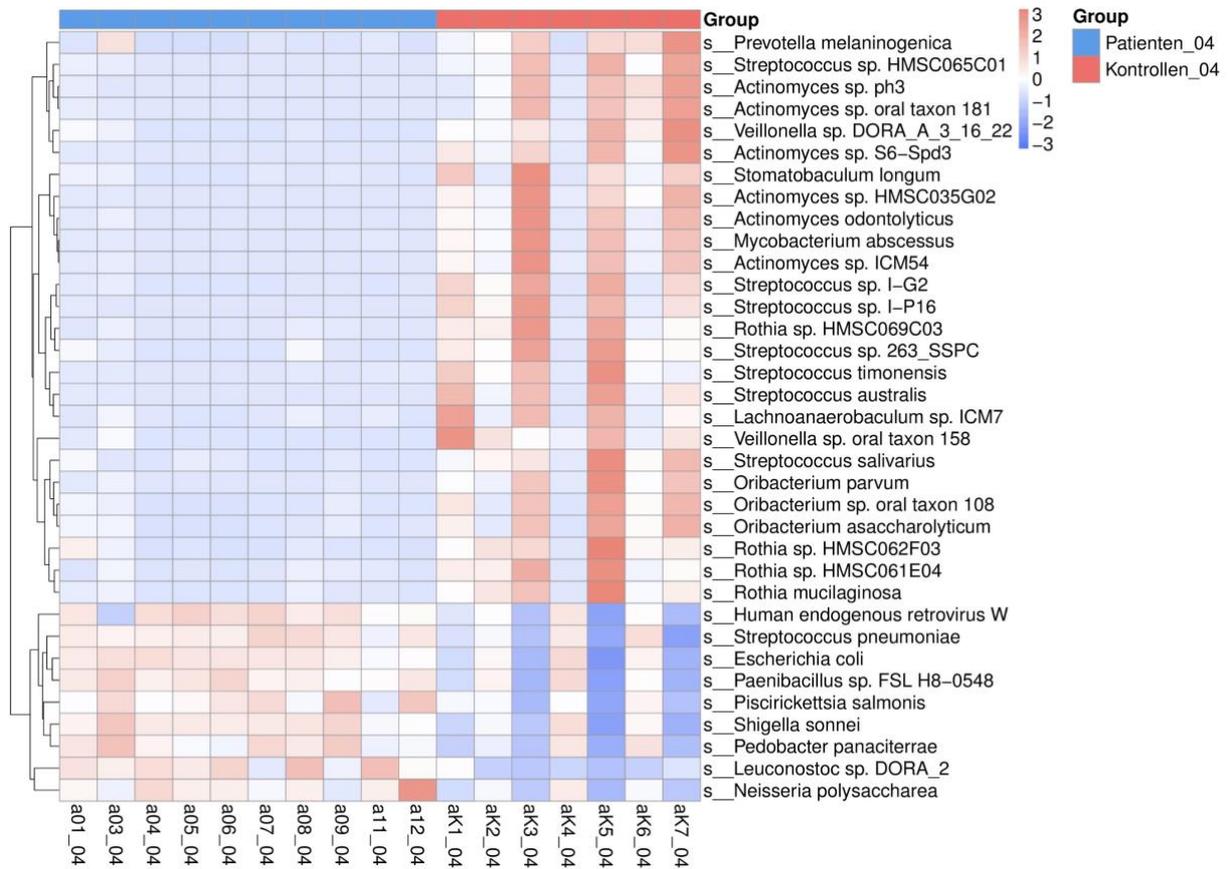
**Abb. 4.4.4.** LEfSe-Analyse des oralen Mikrobioms von Patienten unter RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen. Die horizontalen Balken stellen die Effektgröße für jedes Taxon dar. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Er entspricht der Länge der Balken und wird durch vertikale gepunktete Linien angezeigt. Gesunde Kontrollen sind rot gekennzeichnet. Jeder Balken entspricht einem mikrobiellen Taxon mit statistisch signifikant unterschiedlicher relativer Häufigkeit in den untersuchten Gruppen ( $p < 0,05$ ). Der Name der Taxonebene wird als p-Stamm (phylum); c-Klasse (class); o-Ordnung (order); f-Familie (family), g-Gattung (genus) und s-Spezies (species) abgekürzt.

Außerdem ergab sich eine statistisch signifikant höhere Intergruppenvarianz hinsichtlich des oralen Mikrobioms auf dem Phylum-Level ( $R = 0,343$ ;  $p = 0,011$ ) zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen während der RCT (Therapiewoche 3) im Vergleich zur Intragruppenvarianz (**Abb. 4.4.5.**).



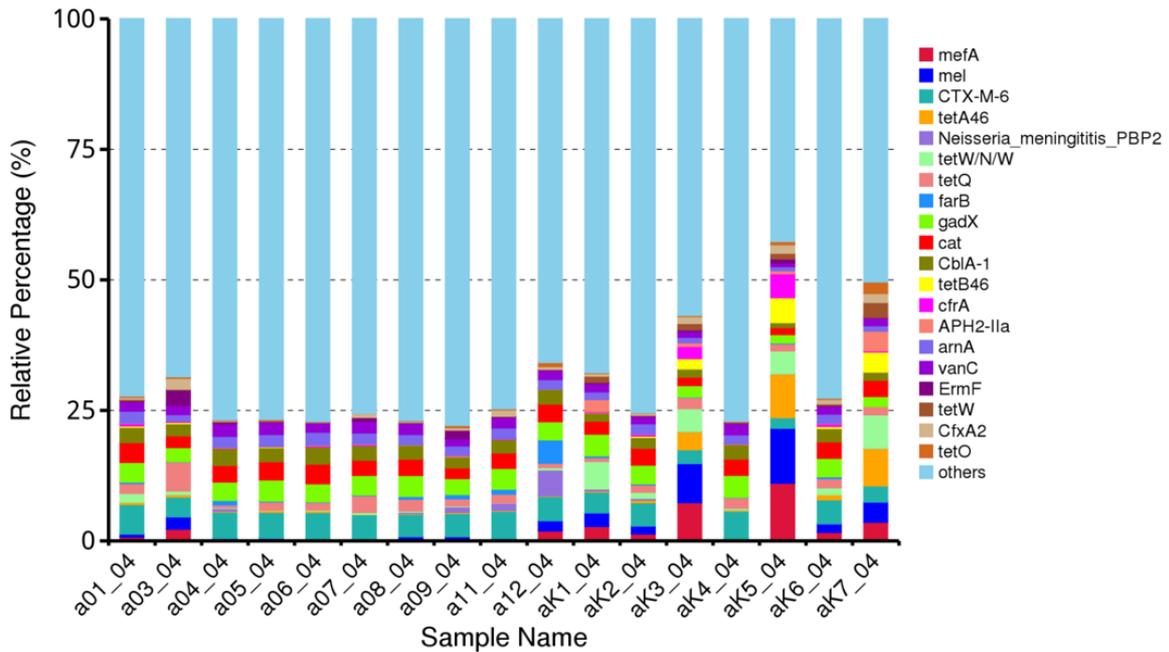
**Abbildung 4.4.5.** ANOSIM des oralen Mikrobioms von Patienten unter RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen auf Stammebene. Der Rangwert ist auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. Der grüne Boxplot zeigt die Intergruppenvarianz, während der rote Boxplot die Intragruppenvarianz der Kontrollkohorte und der blaue Boxplot die Intragruppenvarianz der Patientenkohorte darstellt.

Ferner konnten in der Metastats-Analyse weitere 35 mikrobielle Spezies mit signifikant abweichender relativer Abundanz zwischen den untersuchten Kohorten detektiert werden. Neun der 35 Spezies waren bei den Patienten angereichert ( $q < 0,05$ ), darunter zum Beispiel *Humanes endogenes Retrovirus W*, *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*, während 26 Spezies in der Kontrollgruppe angereichert waren, unter anderem verschiedene *Streptococcus spp.* wie *S. salivarius*, *S. timonensis* und *S. australis* sowie verschiedene *Actinomyces spp.* (**Abb. 4.4.6.**).



**Abbildung 4.4.6.** Hierarchische Z-Score-Clustering-Heatmap. Dargestellt sind 35 mikrobielle Spezies mit signifikant abweichender relativer Abundanz des oralen Mikrobioms zwischen Patienten unter RCT (Therapiewoche 3) und gesunden Kontrollen ( $q < 0,05$ ). Jede Zeile entspricht einer mikrobiellen Spezies, jede Spalte einer Probe. Oberhalb der Heatmap sind Patientenproben blau und Kontrollproben rot gekennzeichnet. Der X-Achse sind die Sample-IDs zu entnehmen. Das Dendrogramm auf der Y-Achse zeigt die hierarchische Clusterung der mikrobiellen Spezies zueinander. Der Farbbereich der Heatmap reicht von rot für positive Z-Score-Werte bis blau für negative Z-Score-Werte, wobei blau für eine Abreicherung und rot für eine Anreicherung der jeweiligen Spezies in einer Probe steht.

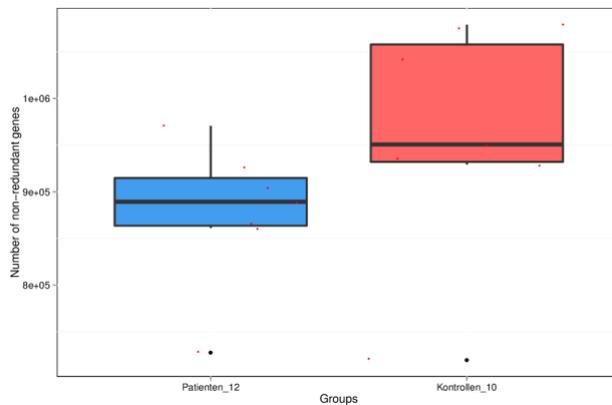
Im Anschluss an die taxonomische Analyse haben wir die Häufigkeit von ARG und deren Verteilung im Rahmen einer funktionellen Analyse untersucht (**Abb. 4.4.7.**). Die ARG mit dem höchsten relativen Anteil in der Patientengruppe während RCT (Therapiewoche 3) waren CTX-M-6 (4,81 %), gadX (3,58 %) und cat (3,09 %), in der Kontrollgruppe mefA (4,02%), mel (3,98%), CTX-M-6 (3,74%), tetW/N/W (3,32%) und gadX (3,03%). Zehn ARG waren in der Patientengruppe angereichert, hierzu gehörten CTX-M-6, Neisseria meningitidis PBP2, tetQ, farB, gadX, cat, CblA-1, arnA, vanC und ErmF.



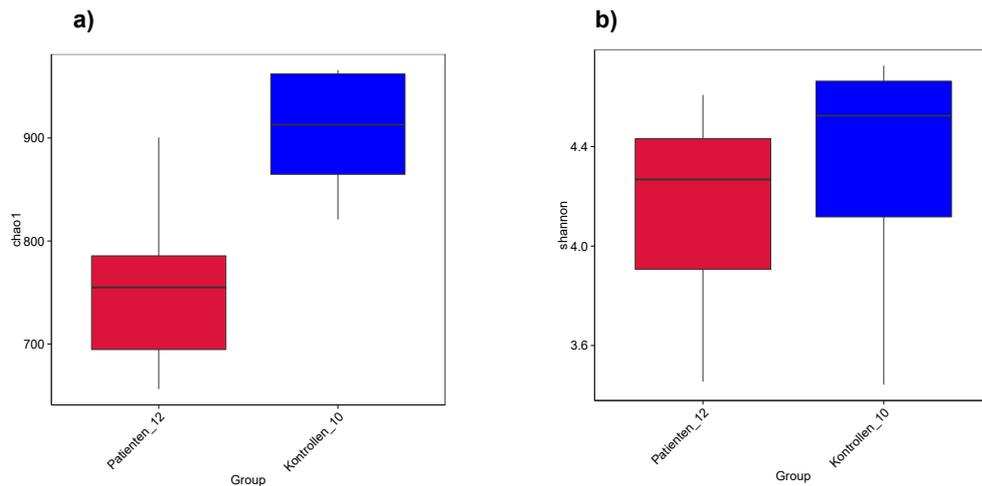
**Abbildung 4.4.7.** Balkendiagramm des relativen prozentualen Anteils von ARG in Speichelproben der Kontrollgruppe und Patientenkohorte in Therapiewoche 3. Der relative Prozentsatz unterschiedlicher ARG ist auf der Y-Achse, die Sample IDs auf der X-Achse dargestellt. Jeder Balken entspricht einer Probe. Die 20 häufigsten ARG sind nach Farben kodiert und der Legende zu entnehmen, die restlichen ARG wurden als "Others" zusammengefasst.

#### 4.5. Vergleich des oralen Mikrobioms von Patienten und Kontrollen im Follow-Up

Vergleicht man die Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene zwischen gesunden Probanden und Patienten in der Nachsorge (neun Monate posttherapeutisch), kann eine tendenziell niedrige Anzahl mikrobieller Gene in der Patientenkohorte verzeichnet werden (Mittelwert  $877786 \pm 75974$  vs.  $961385 \pm 124672$ ,  $p = 0,156$ ) (**Abb. 4.5.1.**). Klinisch waren in der Nachsorge keine Mukositiszeichen mehr nachweisbar. Unsere Ergebnisse zeigten einen signifikant niedrigeren Chao-1-Index bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ( $p = 0,004$ ) zum posttherapeutischen Zeitpunkt auf Gattungsebene, während sich der Shannon-Index nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen unterschied ( $p = 0,456$ ) (**Abb. 4.5.2.**). Ein signifikanter Unterschied in der Beta-Diversität zwischen Patienten und Kontrollen im Follow-Up ergab sich nicht ( $p = 0,912$ ).

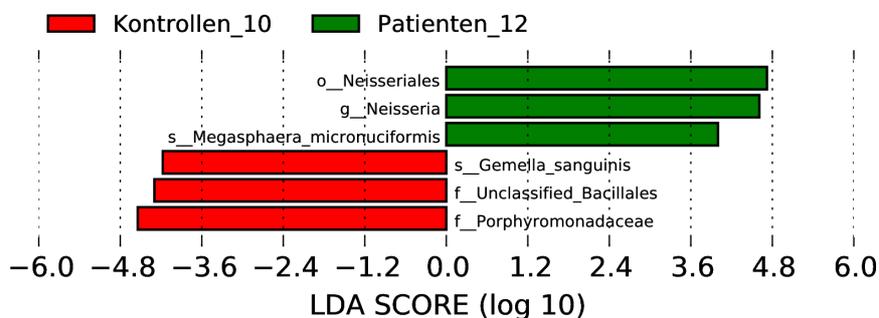


**Abb. 4.5.1.** Boxplot der Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms von Patienten während der Nachsorge (9 Monate posttherapeutisch) und gesunden Kontrollen. Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.



**Abb. 4.5.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms von Patienten während der Nachsorge (9 Monate posttherapeutisch) und gesunden Kontrollen auf Gattungsebene.

Im Follow-Up wurden 6 mikrobielle Taxa mit signifikant abweichender relativer Häufigkeit zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollgruppe detektiert. Ordnung Neisseriales mit Gattung *Neisseria* ebenso wie Spezies *Megasphaera micronuciformis* waren in der Patientenpopulation nach RCT signifikant angereichert, während unter anderem Familie Porphyromonadaceae sowie Spezies *Gemella sanguinis* in der Kontrollgruppe signifikant angereichert waren (**Abb. 4.5.3.**).

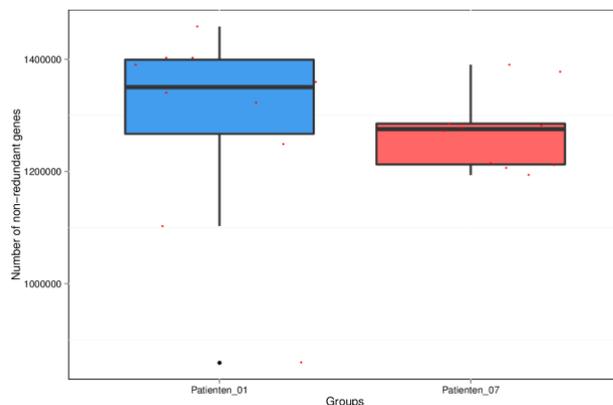


**Abb. 4.5.3.** LEfSe-Analyse des oralen Mikrobioms von Patienten während der Nachsorge (9 Monate posttherapeutisch) und gesunden Kontrollen. Die horizontalen Balken stellen die Effektgröße für jedes Taxon dar. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Er entspricht der Länge der Balken und wird durch vertikale gepunktete Linien angezeigt. Gesunde Kontrollen sind rot, Patienten grün gekennzeichnet. Jeder Balken entspricht einem mikrobiellen Taxon mit statistisch signifikant unterschiedlicher relativer Häufigkeit in den untersuchten Gruppen ( $p < 0,05$ ). Der Name der Taxonebene wird als p-Stamm (phylum); c-Klasse (class); o-Ordnung (order); f-Familie (family), g-Gattung (genus) und s-Spezies (species) abgekürzt.

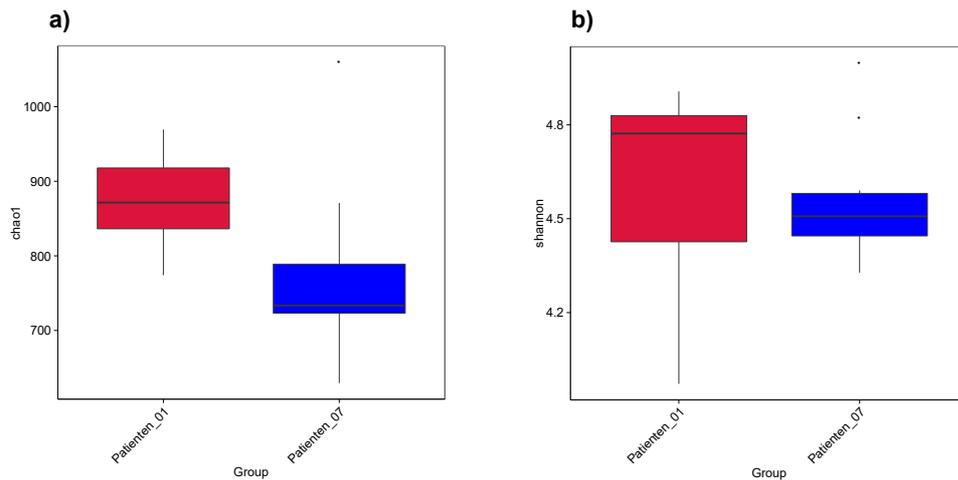
#### 4.6. Charakterisierung der longitudinalen Veränderungen im oralen Mikrobiom des Patientenkollektivs unter Radiochemotherapie

Im nächsten Schritt wurde das orale Mikrobiom der Patientenkohorte während RCT longitudinal untersucht. Dafür wurden Speichelproben vor Therapiebeginn mit Proben aus Therapiewoche 3 und 6 verglichen. Neun von 10 Patienten entwickelten eine orale Mukositis. Diese begann normalerweise in der zweiten Therapiewoche und erreichte ihren Höhepunkt in der fünften bis sechsten Therapiewoche (**Tabelle 4.7.1.**).

Es zeigte sich eine Abnahme der Anzahl nicht-redundanter Gene in Therapiewoche 6 im Vergleich zur Baseline (Median 1350166 vs. 1275319,  $p = 0,218$ ) (**Abb. 4.6.1.**). Der Chao-1-Index auf Gattungsebene war bei Patienten zu Studienbeginn signifikant höher als bei Patienten in Therapiewoche 6 ( $p = 0,015$ ), während der Shannon-Index keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Zeitpunkten aufwies ( $p = 0,529$ ) (**Abb. 4.6.2.**).



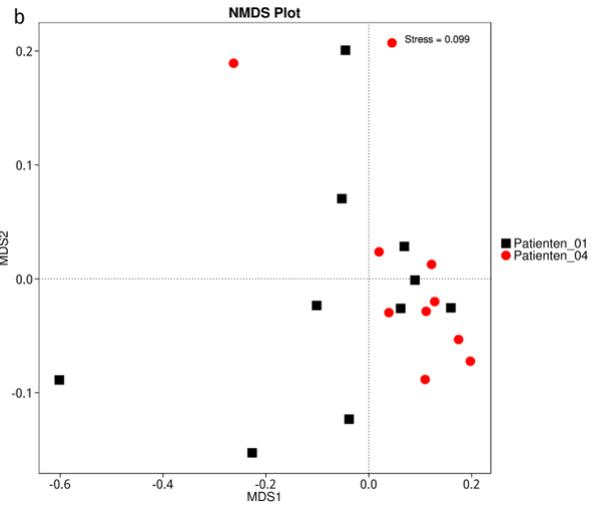
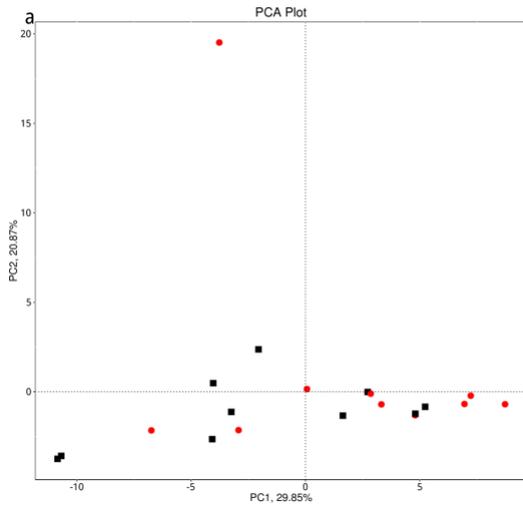
**Abbildung 4.6.1.** Boxplot der Anzahl nicht-redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms von Patienten prätherapeutisch und in der letzten Therapiewoche (Woche 6). Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.



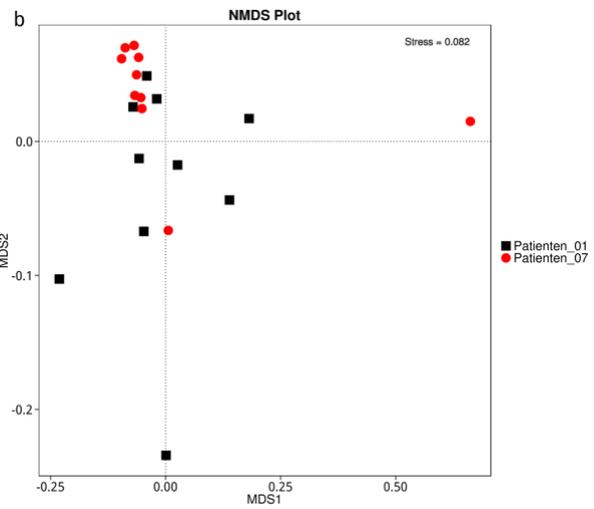
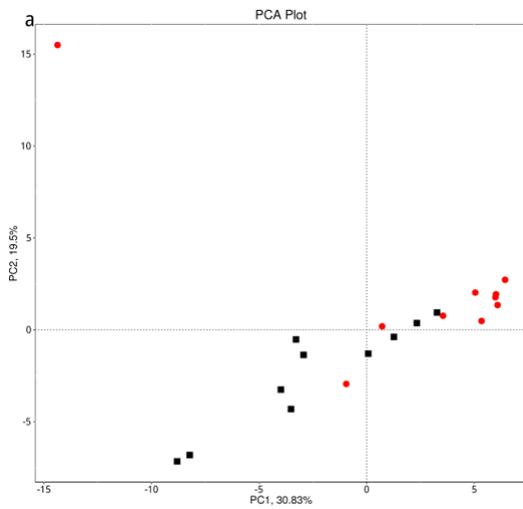
**Abbildung 4.6.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms von Patienten prätherapeutisch und in der letzten Therapiewoche (Woche 6) auf Gattungsebene.

Darüber hinaus zeigte die Beta-Diversität auf Phylum-Ebene einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten zum Baseline-Zeitpunkt und Patienten in Therapiewoche 6, da die Intergruppenvarianz zwischen den Gruppen signifikant höher war als die Intragruppenvarianz ( $R = 0,189$ ,  $p = 0,008$ ). Ferner ergaben unsere Analysen deutlichere Überschneidungen zwischen der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur von Patienten zum Baseline-Zeitpunkt und Patienten in Therapiewoche 3. Mit voranschreiten der RCT und zunehmendem Schweregrad der oralen Mukositis unterschieden sich die mikrobielle Zusammensetzung des OM in Therapiewoche 6 stärker entlang der Hauptkomponentenachse von Proben zum Baseline-Zeitpunkt (**Abb. 4.6.3.**).

1)

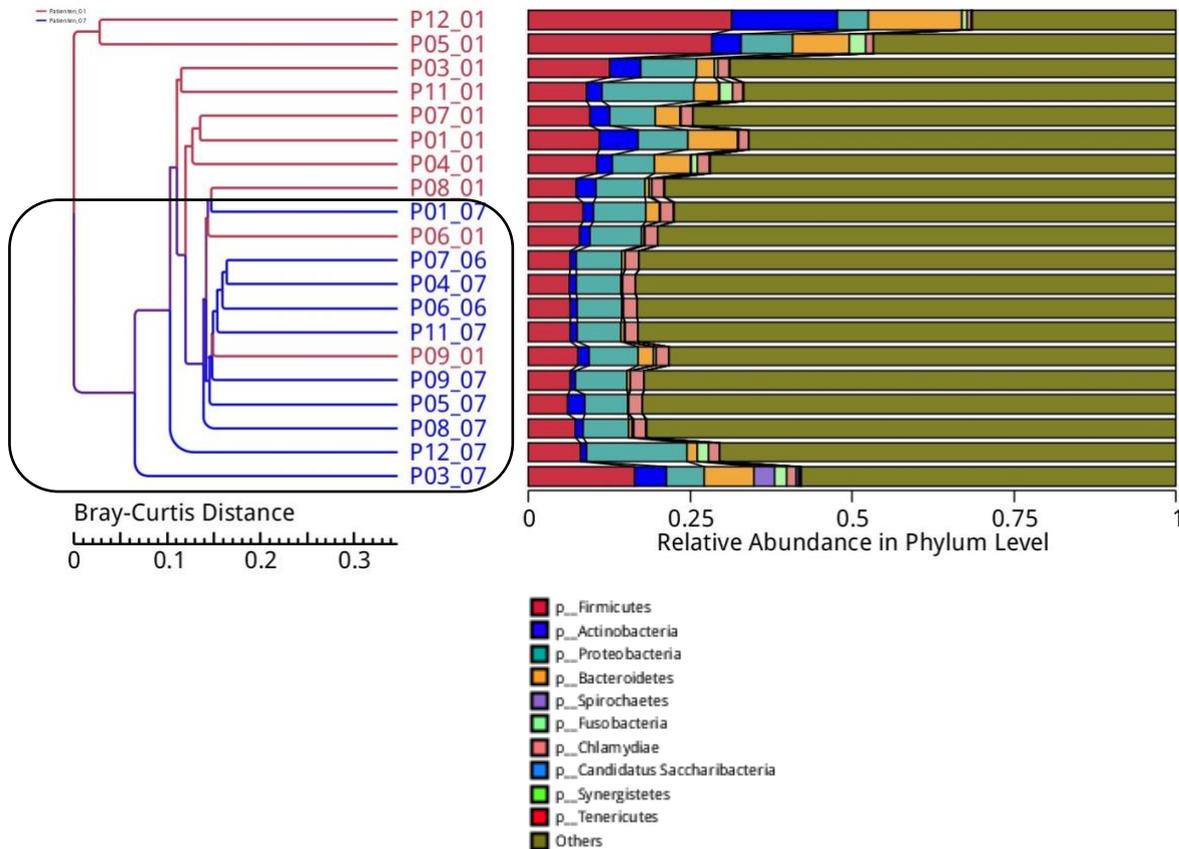


2)



**Abb. 4.6.3. a)** Hauptkomponentenanalyse (PCA) und **b)** nichtmetrische multidimensionale Skalierungsanalyse (NMDS) der Zusammensetzung der oralen mikrobiellen Gemeinschaft der Patienten prätherapeutisch (Baseline) verglichen mit **1)** Therapiewoche 3 und **2)** Therapiewoche 6 auf OTU-Ebene. PC1/MNDS1 bezeichnet die erste Hauptkomponentenachse, PC2/MNDS2 die zweite Hauptkomponentenachse. Jeder Punkt im Diagramm steht für eine Speichelprobe. Patientenproben, die zur gleichen Gruppe gehören, sind in der gleichen Farbe dargestellt.

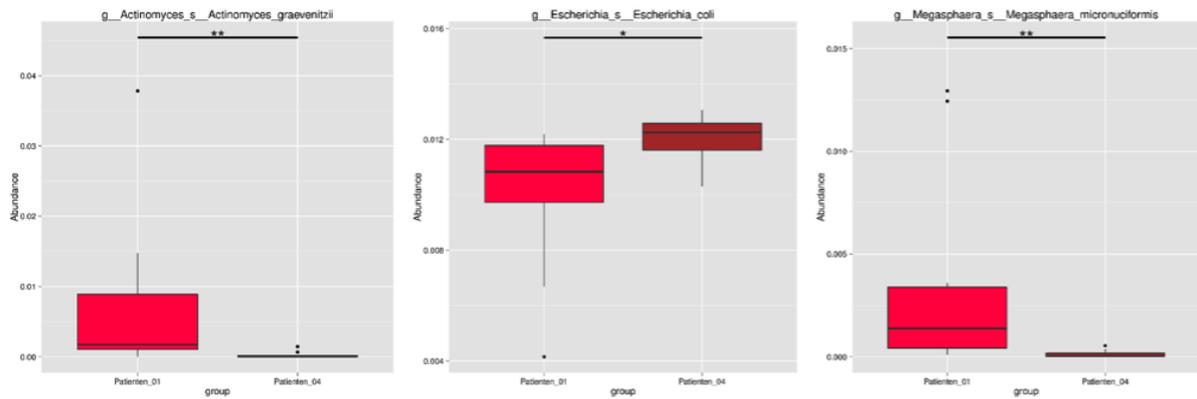
Die hierarchische Clusteranalyse auf Grundlage der Bray-Curtis-Distanz auf Phylum-Ebene zeigte, dass die mikrobiellen Profile der Patienten zu Studienbeginn im Allgemeinen näher beieinander lagen als die der Patienten am Ende der Studie (Therapiewoche 6) und umgekehrt (**Abb. 4.6.4**).



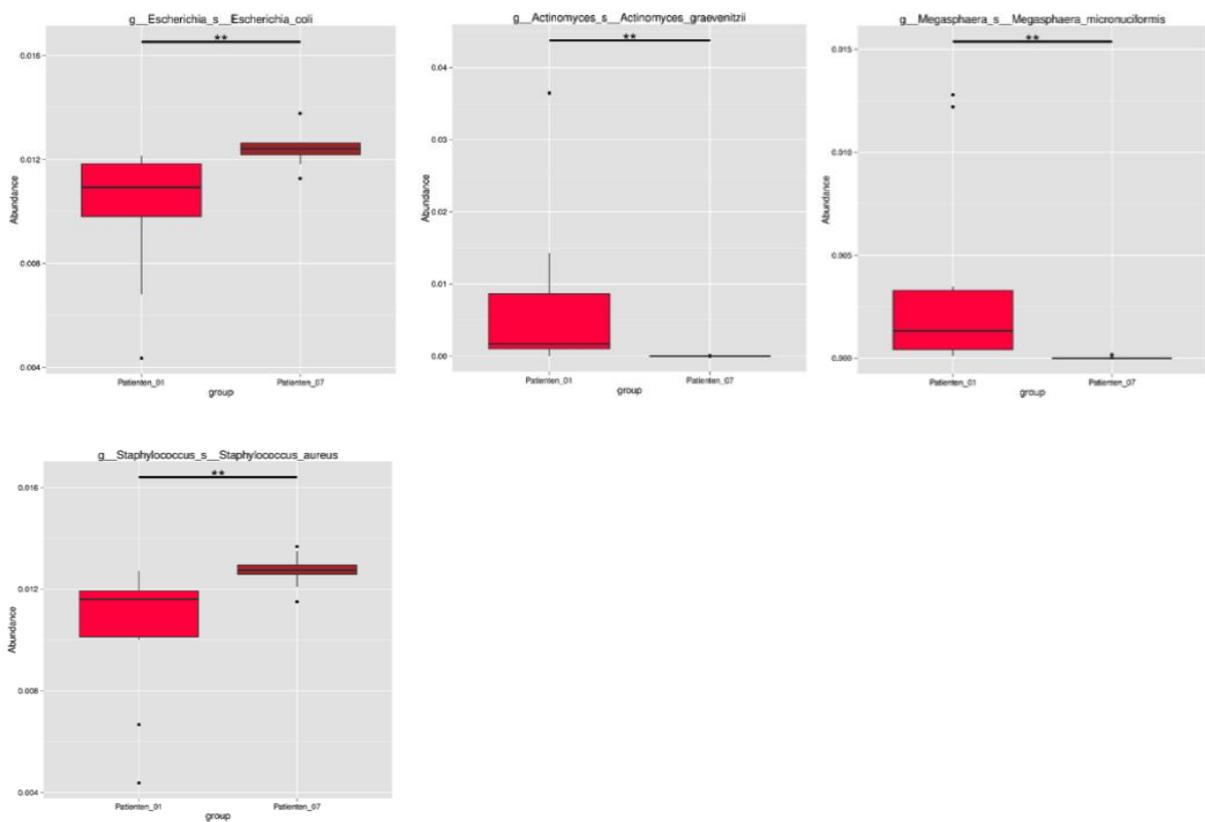
**Abbildung 4.6.4.** Hierarchische Clusterung des oralen Mikrobioms von Patienten prätherapeutisch (Baseline) und unter RCT in Therapiewoche 6 unter Verwendung der Bray-Curtis-Dissimilarität auf Stammebene. Das Dendrogramm (links) zeigt die Clusterung der Speichelproben. Dem Balkendiagramm sind die relativen Abundanzen der zehn häufigsten mikrobiellen Phyla zu entnehmen, ein Balken steht hierbei für eine Probe. Die 10 häufigsten Phyla sind nach Farben kodiert und der Legende zu entnehmen, die restlichen Phyla wurden als "Others" zusammengefasst. Im Dendrogramm sind Patientenproben zum Baseline-Zeitpunkt rot und unter RCT in Therapiewoche 6 blau markiert.

In der Metastats-Analyse konnten mehrere Spezies detektiert werden, deren relative Abundanz sich unter Radiochemotherapie mit zunehmender oraler Mukositis signifikant verringerte. Beispielsweise ließ sich eine niedrigere relative Abundanz der Spezies *Actinomyces graevenitzii* und *Megasphaera micronuciformis* nachweisen. Diese Ergebnisse ließ sich bereits in Therapiewoche 3 nachweisen und waren auch in Therapiewoche 6 reproduzierbar. Ferner ließ sich *Escherichia coli* bei HNSCC-Patienten unter Radiochemotherapie ab Therapiewoche 3 gehäuft feststellen. In Therapiewoche 6 stellten wir zusätzlich zur höheren Abundanz von *Escherichia coli* auch eine höhere Abundanz der Spezies *Staphylococcus aureus* fest (**Abb. 4.6.5**).

a)



b)



**Abb. 4.6.5.** Boxplots einer Auswahl bakterieller Spezies mit statistisch signifikant abweichender relativer Abundanz ( $p < 0,05$ ) im oralen Mikrobiom von Patienten prätherapeutisch (Baseline) vs. Patienten unter RCT in **a)** Therapiewoche 3 und **b)** Therapiewoche 6. Die relative Häufigkeit des jeweiligen Taxons wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. Oberhalb des Boxplots ist der Speziesname aufgetragen, auf den sich der Boxplot bezieht.

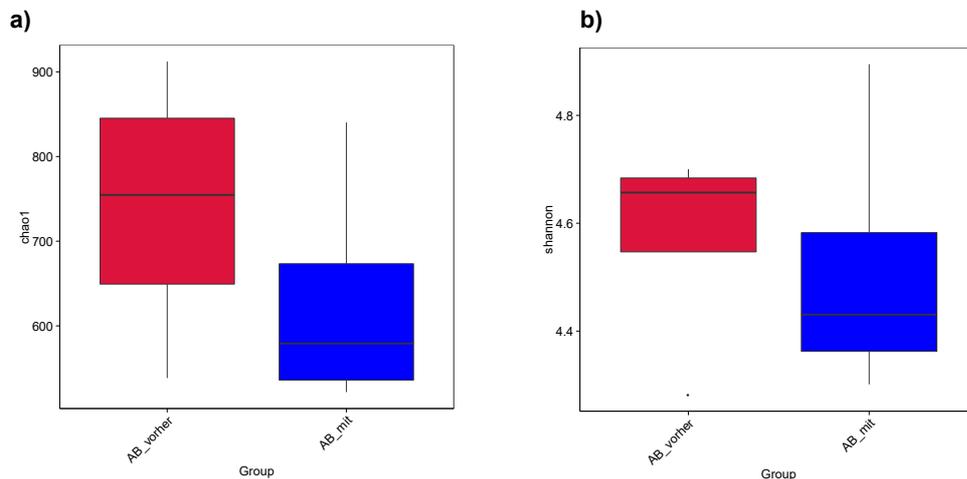
Vier Patienten benötigten während der RCT eine orale oder intravenöse antibiotische Therapie aufgrund eines Infektes. Um die Auswirkungen der antibiotischen Therapie auf das orale Mikrobiom während der RCT zu untersuchen, verglichen wir Speichelproben der jeweiligen Patienten vor und während Antibiotikaeinnahme. Die verabreichten antiinfektiven Substanzen sind **Tabelle 4.6.1.** zu entnehmen.

Patient	RCT Woche 3	RCT Woche 4	RCT Woche 5	RCT Woche 6
3	Keine ABT	Flourchinolone d2 p.o.	Flourchinolone d9 p.o.	Kein AB
4	Keine ABT	Keine ABT	Clindamycin d7/8 iv.	Unacid d2 iv.
5	Keine ABT	Keine ABT	Flourchinolone d1 iv.	Flourchinolone d8 iv., Clindamycin d2 iv., Vancomycin d6 iv.
11	Keine ABT	Keine ABT	Keine ABT	Flourchinolone d5 p.o.

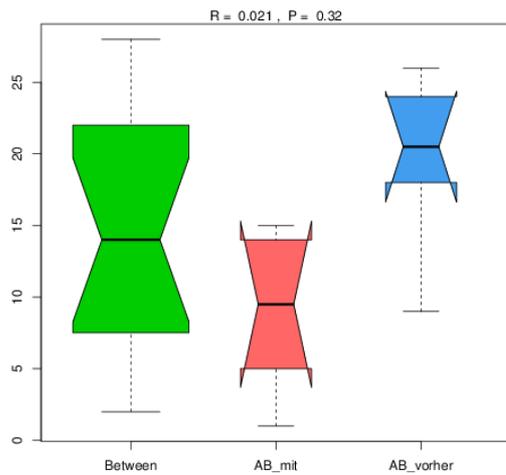
**Tabelle 4.6.1. Antibiotikatherapie von Patient 3,4,5 und 11 unter Radiochemotherapie**

Abkürzungen: ABT= Antibiotikatherapie, iv. = intravenös, p.o. = per os, d = Tag, RCT = Radiochemotherapie

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Alpha-Diversität (Chao1-Index  $p = 0,486$ ; Shannon-Index  $p = 0,886$ ) (**Abb. 4.6.6.**) und Beta-Diversität ( $p = 0,32$ ) (**Abb. 4.6.7.**) der mikrobiellen Profile von Patienten vor und während der Antibiotikaeinnahme gefunden. Außerdem wurden keine Taxa mit statistisch signifikant unterschiedlicher relativer Häufigkeit zwischen den Gruppen detektiert.



**Abbildung 4.6.6.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes a) Chao1-Index und b) Shannon-Index des orales Mikrobiom von Patienten vor Antibiotikatherapie und unter Antibiotikatherapie während der RCT auf Gattungsebene.



**Abb. 4.6.7.** ANOSIM von Patienten vor und während Antibiotikatherapie unter RCT auf Stammebene. Der Rangwert ist auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. Der grüne Boxplot zeigt die Intergruppenvarianz, während der rote Boxplot die Intragruppenvarianz der Patientenkohorte unter Antibiotikatherapie und der blaue Boxplot die Intragruppenvarianz der Patientenkohorte vor Antibiotikatherapie darstellt.

#### 4.7. Subgruppenvergleiche in der Patientenkohorte

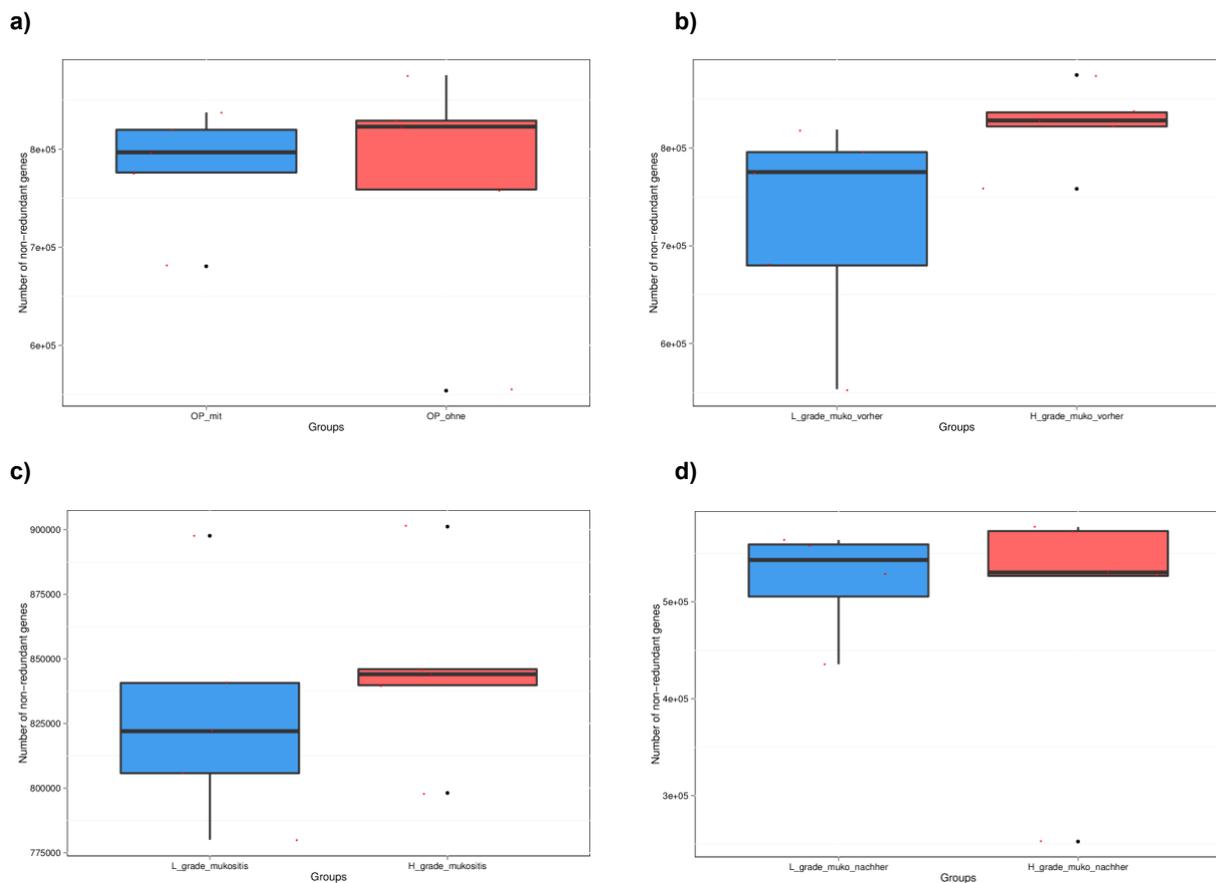
Wir verglichen das orale Mikrobiom von Patienten, die während RCT eine HGM entwickelten vs. Patienten, die keine oder nur eine LGM entwickelten, um zusätzliche Erkenntnisse über die Beziehung zwischen oralem Mikrobiom und dem Auftreten einer HGM zu gewinnen. Das orale Mikrobiom beider Subgruppen wurde unter RCT und im Follow-Up verglichen sowie retrospektiv zum prätherapeutischen Zeitpunkt. In Therapiewoche 6 litten fünf Patienten an einer HGM, während vier Patienten an einer LGM litten (**Tabelle 4.7.1.**). Ein Patient hatte während der gesamten Behandlungsdauer keine Mundschleimhautentzündung entwickelt. Ferner wurde das orale Mikrobiom von Patienten verglichen, die sich einer primär definitiven RCT ohne Operation unterzogen vs. Patienten, die eine adjuvante Radiochemotherapie erhielten. Dieser Vergleich fand zum prätherapeutischen Zeitpunkt nach Tumoroperation jedoch vor Beginn der RCT statt.

Patient	Therapie	RCT W 1 (RTOG/ WHO)	RCT W 2 (RTOG/ WHO)	RCT W 3 (RTOG/ WHO)	RCT W 4 (RTOG/ WHO)	RCT W 5 (RTOG/ WHO)	RCT W 6 (RTOG/ WHO)
1	aRCT	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2
3	aRCT	0/0	0/0	2/2	2/2	2/2	2/1
4	pdRCT	0/0	1/1	3/3	3/3	3/3	3/3
5	aRCT	0/0	0/0	1/1	2/2	2/2	2/2
6	aRCT	0/0	2/1	1/1	2/1	2/1	2/2
7	aRCT	0/0	2/2	2/4	2/4	2/4	3/4
8	pdRCT	0/0	1/1	2/3	3/2	3/4	3/3
9	pdRCT	0/0	2/2	2/2	2/2	3/2	3/3
11	pdRCT	0/0	2/2	2/2	2/1	3/3	2/2
12	pdRCT	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

**Tabelle 4.7.1. Onset der oralen Mukositis sowie Schweregrad der oralen Mukositis unter RCT nach WHO- und RTOG-Kriterien.** Der Schweregrad der oralen Mukositis ist nach Farben kodiert, grün = keine Mukositis, orange = Low-grade Mukositis, rot = High-grade Mukositis

Abkürzungen: RCT = Radiochemotherapie, aRCT = adjuvante Radiochemotherapie, pdRCT = primär definitive Radiochemotherapie, W = Woche, RTOG = Radiation Therapy Group-Skala, WHO = World Health Organization-Skala

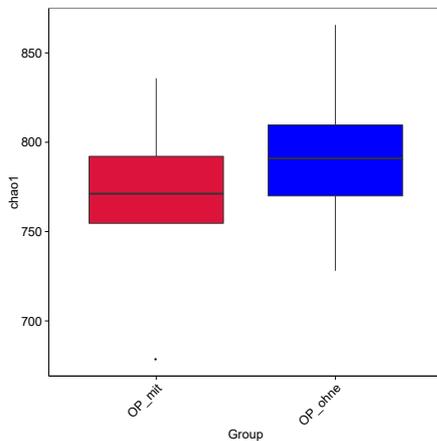
Patienten, die im Verlauf der RCT eine HGM entwickelten, hatten bereits prätherapeutisch etwas mehr nicht-redundante mikrobielle Gene als Patienten, die eine LGM entwickelten (Mittelwert  $724698 \pm 109512$  vs.  $824036 \pm 42051$ ,  $p = 0,095$ ). Auch in der therapeutischen Phase (Therapiewoche 6) konnten in der HGM-Gruppe etwas mehr nicht-redundante Gene festgestellt werden (Mittelwert  $823253 \pm 44276$  vs.  $845859 \pm 36688$ ,  $p = 0,537$ ). Posttherapeutisch (Mittelwert  $521469 \pm 29619$  vs.  $492023 \pm 135775$ ,  $p = 0,701$ ) und bei Patienten mit vs. ohne OP (Mittelwert  $782132 \pm 61368$  vs.  $768108 \pm 126614$ ,  $p = 0,829$ ) war die Anzahl nicht-redundanter Gene sehr ähnlich (**Abb. 4.7.1.**).



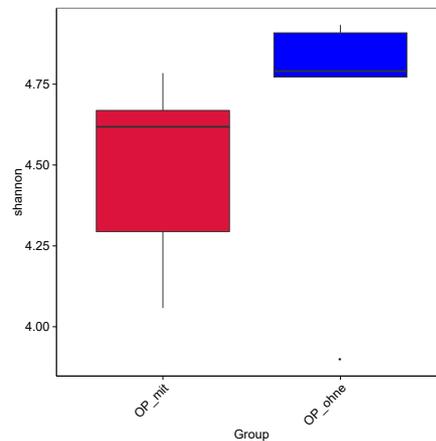
**Abb. 4.7.1.** Boxplots der Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms von HNSCC-Patienten **a)** mit OP vs. ohne OP (Baseline) **b)** Low-grade vs. High-grade Mukositis (Baseline) **c)** Low-grade vs. High-grade Mukositis unter RCT (Therapiewoche 6) **d)** Low-grade vs. High-grade Mukositis posttherapeutisch (9 Monate Nachsorge). Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.

Prätherapeutisch war der Shannon-Index auf Gattungsebene in der HGM-Gruppe höher als in der LGM-Gruppe ( $p = 0,008$ ). Der Chao-1-Index wies zum Baseline-Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen HGM- und LGM-Gruppe auf ( $p = 0,310$ ) (**Abb. 4.7.2.**). In Therapiewoche 6 und während des Follow-Up (9 Monate posttherapeutisch) wiesen die Alpha-Diversitätsindizes keine signifikanten Unterschiede zwischen der HGM- und der LGM-Gruppe auf (Chao-1-Index  $p = 0,421$ ; Shannon-Index  $p = 0,421$ ). Die Beta-Diversität zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Abweichungen zwischen HGM und LGM (Baseline  $p = 0,87$ ; Follow-Up  $p = 0,847$ ), obwohl wir in Therapiewoche 6 eine höhere Intergruppenvarianz feststellen konnten, welche jedoch statistisch nicht signifikant war ( $p = 0,055$ ). Auch beim Vergleich primär definitive RCT vs. adjuvante RCT zum Baseline-Zeitpunkt konnten keine Unterschiede bei der Alpha-Diversität (Chao-1-Index  $p = 0,22$ ; Shannon-Index  $p = 0,69$ ) oder der Beta-Diversität ( $p = 0,84$ ) festgestellt werden (**Abb. 4.7.2.**).

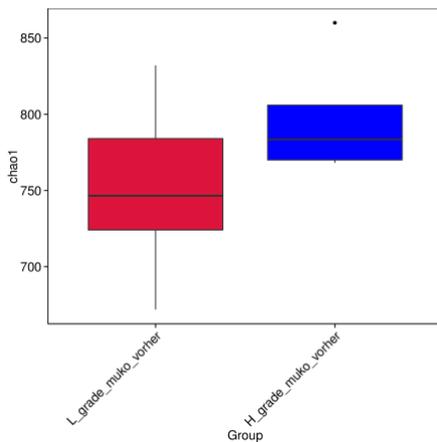
a1)



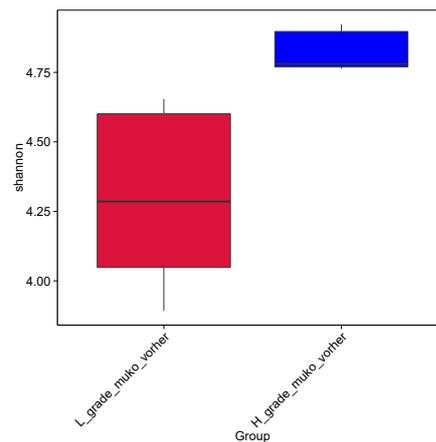
b1)



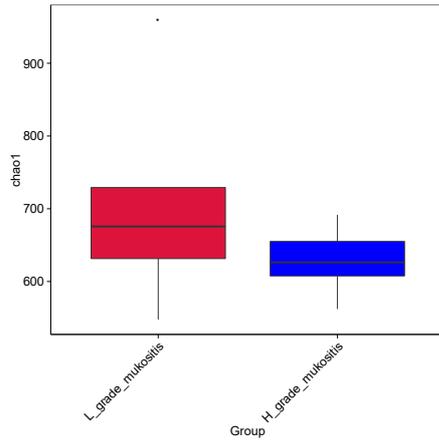
a2)



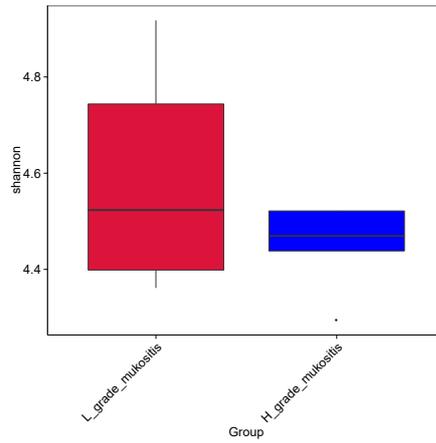
b2)



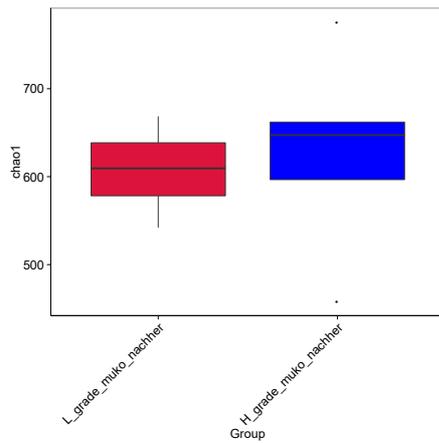
a3)



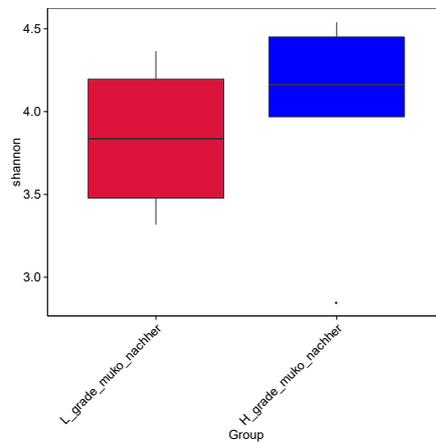
b3)



a4)

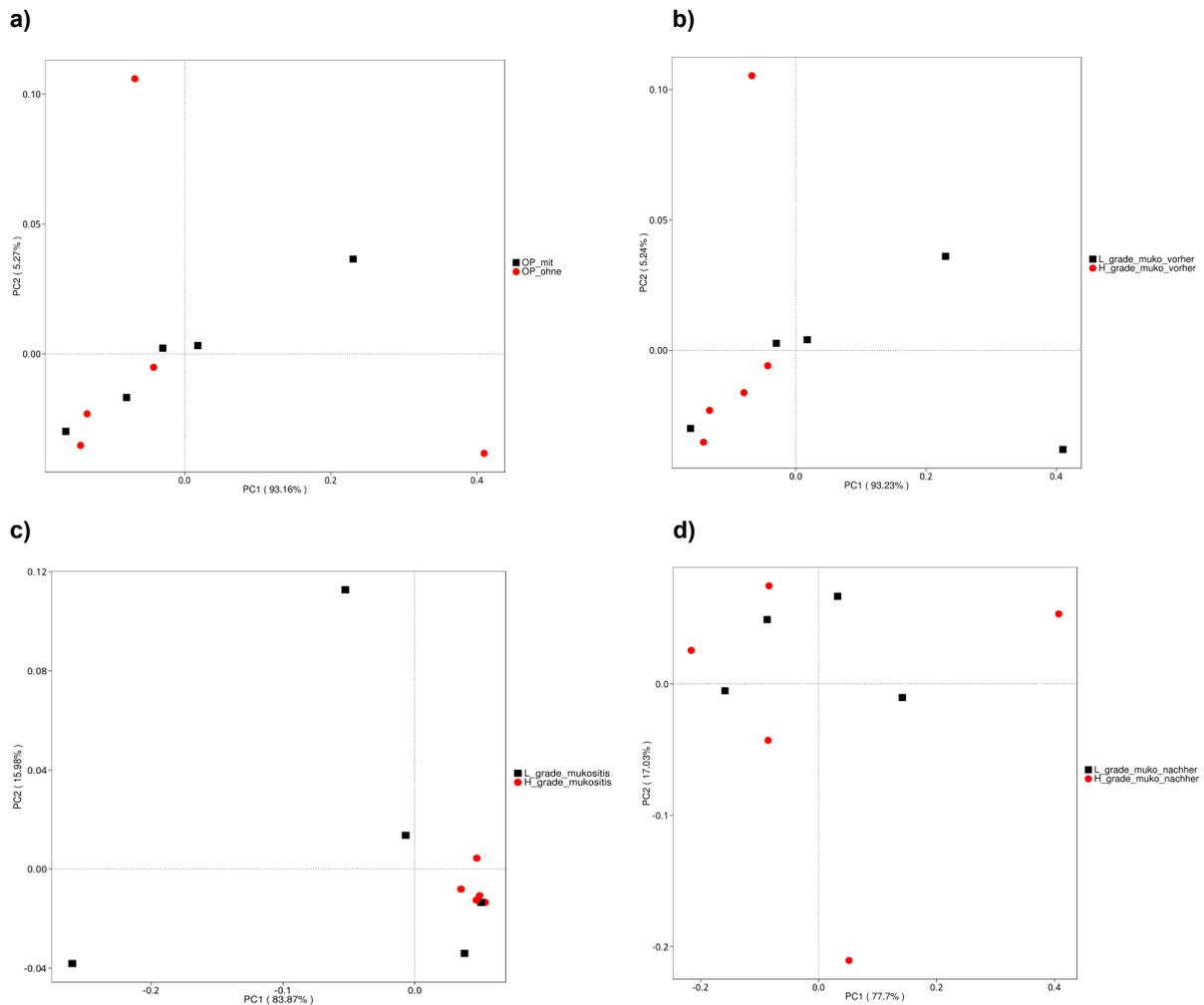


b4)



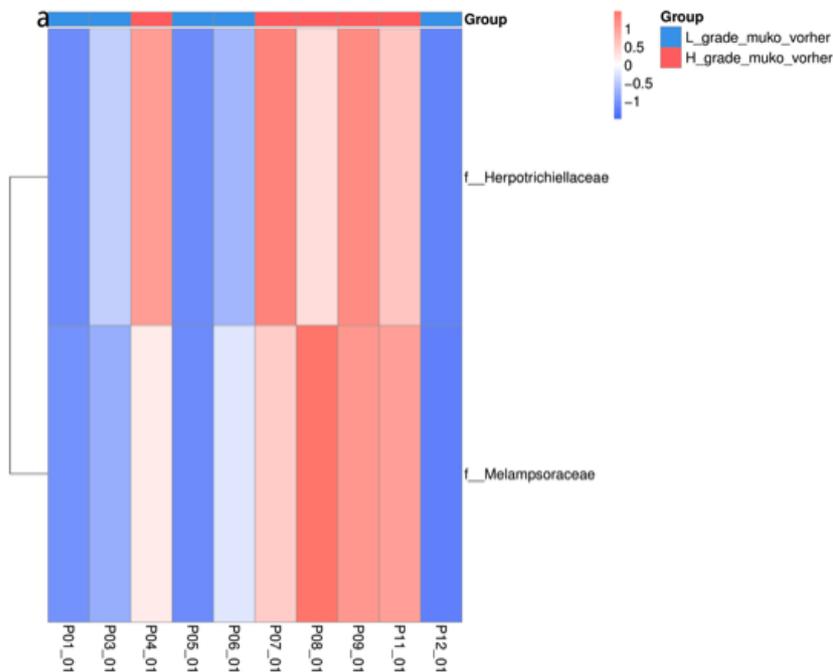
**Abb. 4.7.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms von HNSCC-Patienten **1)** mit primär definitiver RCT vs. adjuvanter RCT (Baseline) **2)** Low-grade vs. High-grade Mukositis (Baseline) **3)** Low-grade vs. High-grade Mukositis unter RCT (Therapiewoche 6) **4)** Low-grade vs. High-grade Mukositis posttherapeutisch (9 Monate Nachsorge) auf Gattungsebene. Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt.

Die Bray-Curtis-basierte PCoA zeigt in Therapiewoche 6 eine stärkere Clusterung von HGM-Patienten als von LGM-Patienten. Zum Baseline-Zeitpunkt sowie während des Follow-Up wiesen alle Proben eine breite Überlappung ohne eindeutige Subclusterung auf (**Abb. 4.7.3.**).



**Abb. 4.7.3.** Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) auf Basis der Bray-Curtis-Distanz der Zusammensetzung der oralen mikrobiellen Gemeinschaft von Patienten **a)** mit primär definitiver RCT vs. adjuvante RCT (Baseline) **b)** Low-grade vs. High-grade Mukositis (Baseline) **c)** Low-grade vs. High-grade Mukositis unter RCT (Therapiewoche 6) **d)** Low-grade vs. High-grade Mukositis posttherapeutisch (9 Monate Nachsorge). Die X-Achse entspricht der ersten Hauptkoordinatenachse, die Y-Achse der zweiten Hauptkoordinatenachse. Die Eigenwerte der Hauptkoordinaten erklären **a)** 98,4% **b)** 98,4% **c)** 99,8% **d)** 94,7% der Gesamtvariation des Datensatzes. Jeder Punkt im Diagramm steht für eine Speichelprobe. Patientenproben, die zur gleichen Gruppe gehören, sind in der gleichen Farbe dargestellt.

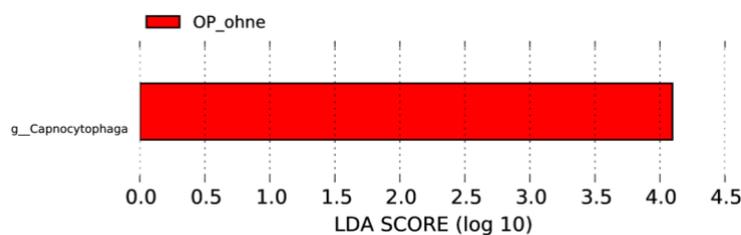
Bei Patienten, die im Verlauf eine HGM entwickelten, konnte zum prätherapeutisch in der Metastats-Analyse eine signifikant höhere relative Abundanz von zwei Pilzfamilien nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um Familie Melampsoraceae und Familie Herpotrichiellaceae (**Abb. 4.7.4.**). Diese Ergebnisse waren in allen Speichelproben kongruent.



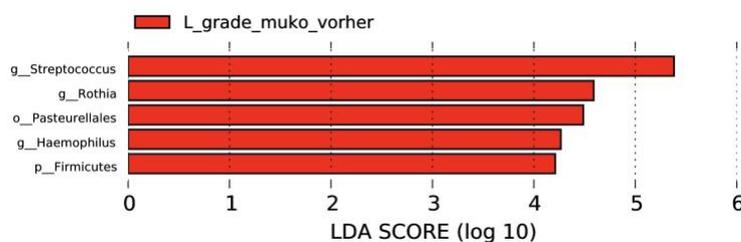
**Abb. 4.7.4.** Hierarchische Z-Score-Clustering-Heatmap. Dargestellt sind 2 Pilzfamilien mit signifikant abweichender relativer Abundanz im oralen Mikrobiom von Patienten zum prätherapeutischen Untersuchungszeitpunkt (Baseline), die später eine Low-grade Mukositis vs. High-grade Mukositis entwickelten ( $q < 0,05$ ). Jede Zeile entspricht einer Pilzfamilie, jede Spalte einer Probe. Oberhalb der Heatmap sind Low-grade Mukositis-Proben blau und High-grade Mukositis-Proben rot gekennzeichnet. Der X-Achse sind die Sample-IDs zu entnehmen. Das Dendogramm auf der Y-Achse zeigt die hierarchische Clusterung der mikrobiellen Taxa zueinander. Der Farbbereich der Heatmap reicht von rot für positive Z-Score-Werte bis blau für negative Z-Score-Werte, wobei blau für eine Abreicherung und rot für eine Anreicherung des jeweiligen Taxons in einer Probe steht.

In der durchgeführten LEfSe-Analyse ergab sich eine signifikante Anreicherung der Gattung *Rothia*, des Phylums Firmicutes inklusive der Gattung *Streptococcus* sowie der Ordnung Pasteurellales inklusive der Gattung *Haemophilus* in der Low-grade Mukositis-Gruppe zum prätherapeutischen Zeitpunkt. Während der RCT (Therapiewoche 6) konnten keine mikrobiellen Taxa detektiert werden, die sich signifikant zwischen HGM- und LGM-Gruppe unterschieden. Posttherapeutisch ließen sich signifikant mehr Bakterien der Familie Neisseriaceae in der HGM-Gruppe nachweisen. Prätherapeutisch konnte bei Patienten ohne Tumoroperation mit Indikation zur adjuvanten RCT vermehrt Gattung *Capnocytophaga* nachgewiesen werden (**Abb. 4.7.5.**).

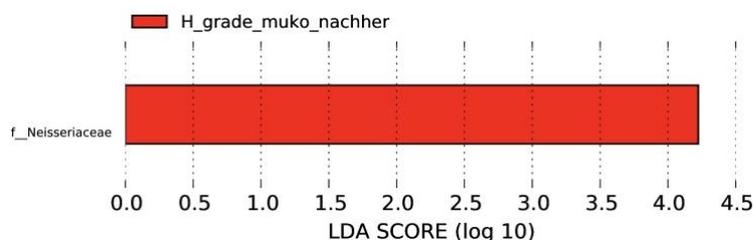
a)



b)



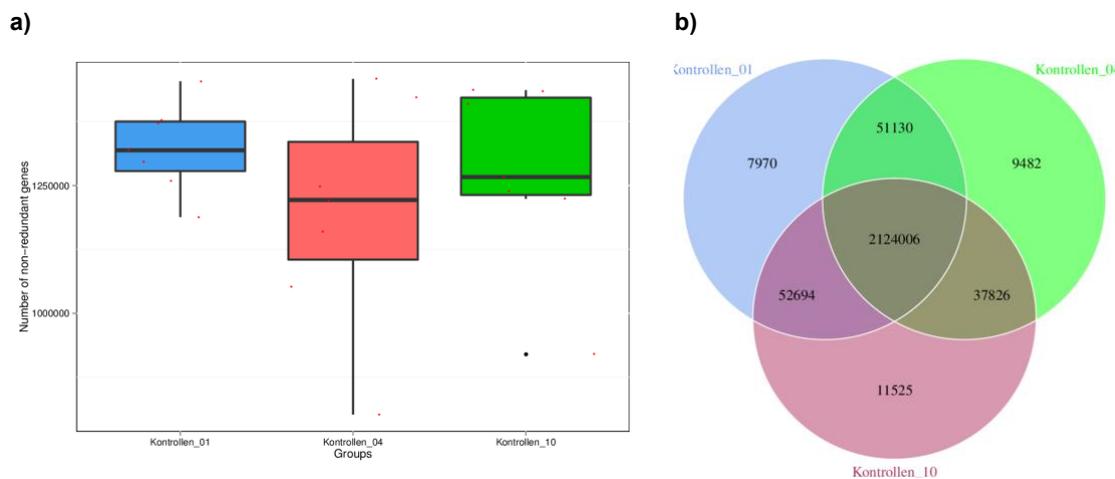
c)



**Abb. 4.7.5.** LEfSe-Analyse des oralen Mikrobioms von Patienten mit **a)** primär definitive RCT vs. adjuvante RCT (Baseline) **b)** Low-grade vs. High-grade Mukositis-Gruppe (Baseline) **c)** Low-grade vs. High-grade Mukositis-Gruppe posttherapeutisch (9 Monate Nachsorge). Die horizontalen Balken stellen die Effektgröße für jedes Taxon dar. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Er entspricht der Länge der Balken und wird durch vertikale gepunktete Linien angezeigt. Jeder Balken entspricht einem mikrobiellen Taxon mit statistisch signifikant unterschiedlicher relativer Häufigkeit in den untersuchten Gruppen ( $p < 0,05$ ). Der Legende ist die jeweilige Gruppe zu entnehmen, in der die detektierten Taxa angereichert sind. Der Name der Taxonebene wird als p-Stamm (phylum); c-Klasse (class); o-Ordnung (order); f-Familie (family), g-Gattung (genus) und s-Spezies (species) abgekürzt.

#### 4.8. Charakterisierung der longitudinalen Veränderungen im oralen Mikrobiom der gesunden Kontrollgruppe

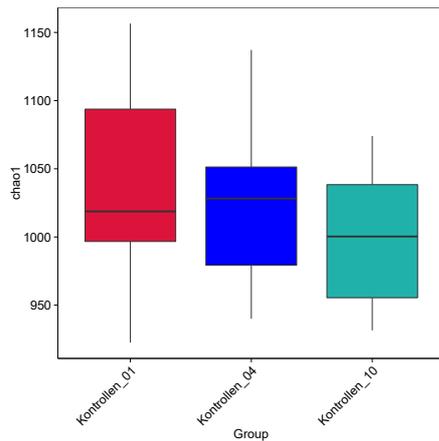
Um sich die Veränderungen des oralen Mikrobioms in der Kontrollgruppe anzuschauen, wurden zunächst die Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten longitudinal miteinander verglichen (Woche 1 vs. Woche 4 vs. Woche 12). Diese blieb zu allen Untersuchungszeitpunkten recht konstant (ANOVA: 1318968 vs. 1221845 vs. 1266695,  $p_1 = 0,386$ ;  $p_2 = 0,863$ ;  $p_3 = 0,666$ ) (**Abb. 4.8.1.a**). 92,5% der Gene waren gemeinsame Gene und veränderten sich über den Zeitraum von 9 Monaten nicht (**Abb. 4.8.1.b**). Der prozentuale Anteil einzigartiger Gene blieb ebenfalls recht konstant (Woche 1 = 0,34 %, Woche 4 = 0,41%, Woche 12 = 0,5%).



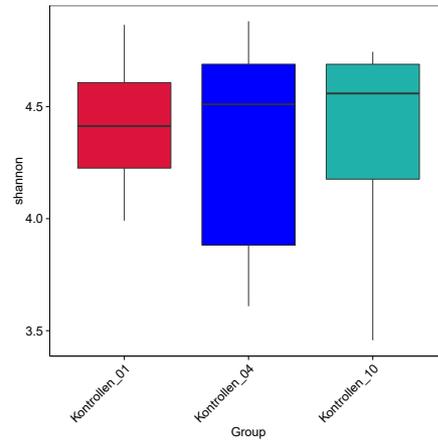
**Abb. 4.8.1. a)** Boxplot und **b)** Venn-Diagramm der Anzahl nicht redundanter mikrobieller Gene des oralen Mikrobioms gesunder Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Woche 1, Woche 4, Woche 12). **a)** Die Anzahl nicht redundanter Gene wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. **b)** Jeder Kreis repräsentiert die Kontrollgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten und ist farblich kodiert (blau = Woche 1, grün = Woche 4, rot = Woche 12). Die Zahlen in den Kreisen entsprechen der Anzahl einzigartiger mikrobieller Gene der jeweiligen Gruppe, den sich überschneidenden Anteilen ist die Anzahl gemeinsamer Gene zwischen den einzelnen Gruppen zu entnehmen.

Wir konnten keine signifikanten Unterschiede in der Alpha-Diversität bei gesunden Kontrollen im Untersuchungszeitraum von 3 Monaten feststellen (Chao-1-Index Baseline vs. Woche 4:  $p = 0,898$ , Woche 4 vs. Woche 12:  $p = 0,776$ , Baseline vs. Woche 12  $p = 0,511$ ; Shannon-Index Baseline vs. Woche 4:  $p = 0,877$ , Woche 4 vs. Woche 12:  $p = 0,975$ , Baseline vs. Woche 12  $p = 0,960$ ) (**Abb. 4.8.2**).

a)

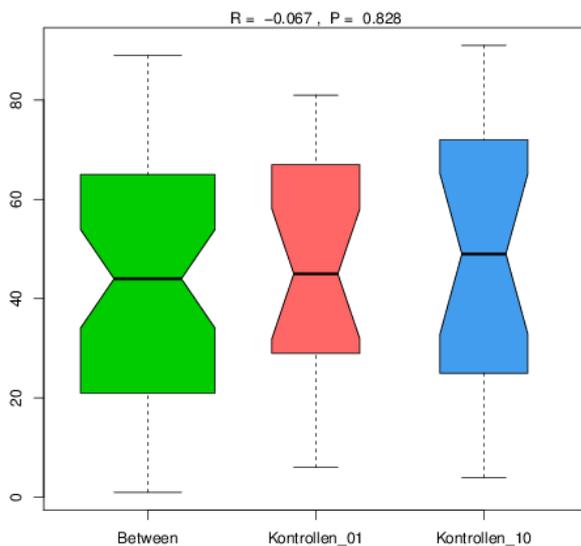


b)



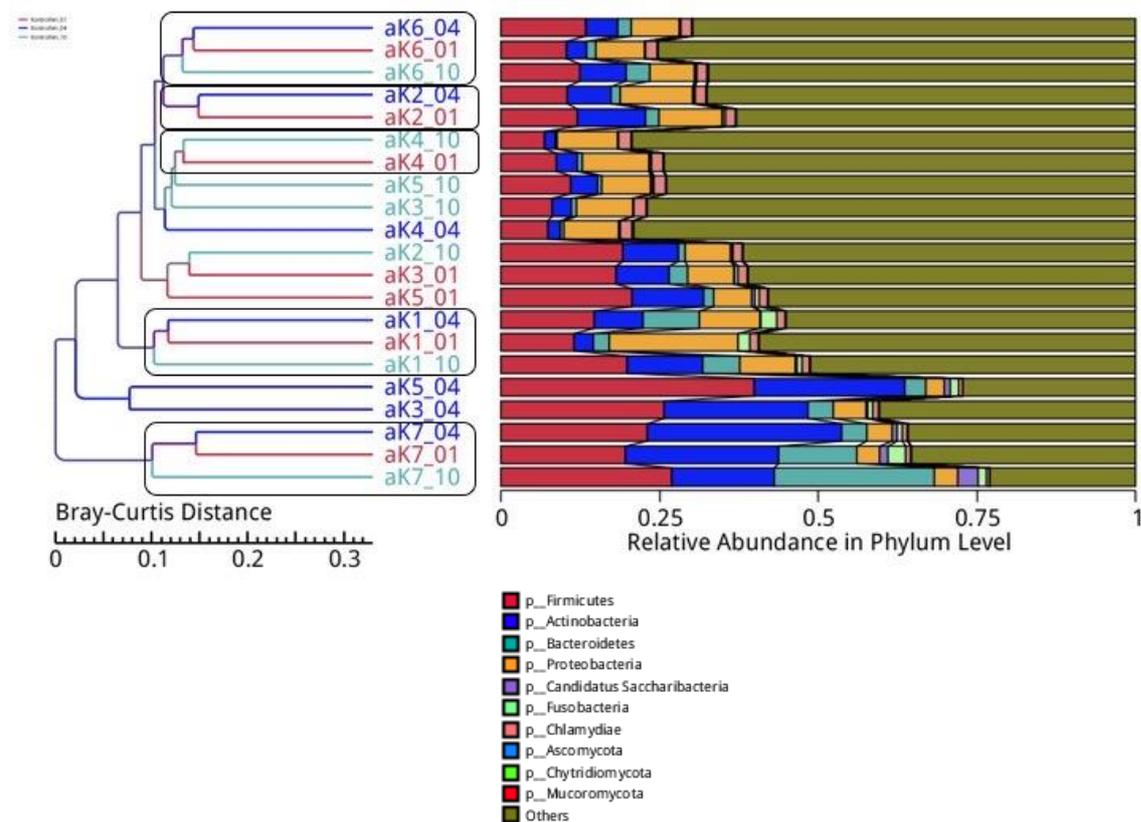
**Abb. 4.8.2.** Boxplot der Alpha-Diversitätsindizes **a)** Chao1-Index und **b)** Shannon-Index des oralen Mikrobioms gesunder Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Woche 1, Woche 4, Woche 12) auf Gattungsebene.

Die Beta-Diversität zeigte ebenfalls keine Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung des oralen Mikrobioms der Kontrollgruppe an (**Abb. 4.8.3.**). Ferner konnten zu keinem Zeitpunkt Taxa mit unterschiedlicher relativer Abundanz in der Kontrollgruppe detektiert werden.



**Abb. 4.8.3.** ANOSIM der gesunden Kontrollgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf Stammebene (Woche 1, Woche 12). Der Rangwert ist auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. Der grüne Boxplot zeigt die Intergruppenvarianz, während der rote Boxplot die Intragruppenvarianz der Kontrollkohorte in Woche 1 und der blaue Boxplot die Intragruppenvarianz der Kontrollkohorte in Woche 12 darstellt.

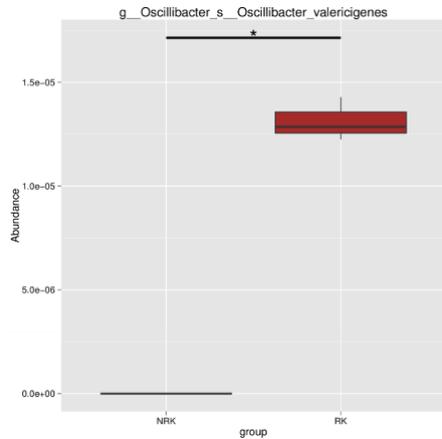
Proben, die derselben gesunden Person zuzuordnen sind, gruppierten sich über den Untersuchungszeitraum von 12 Wochen typischerweise zusammen, d. h. sie lagen in der hierarchischen Clusterung näher beieinander als Proben verschiedener Probanden zu denselben Zeitpunkten (**Abb. 4.8.4.**). Aktive Raucher gruppierten sich an den Rändern des Dendrogramms (Kontrollproband 6 und 7).



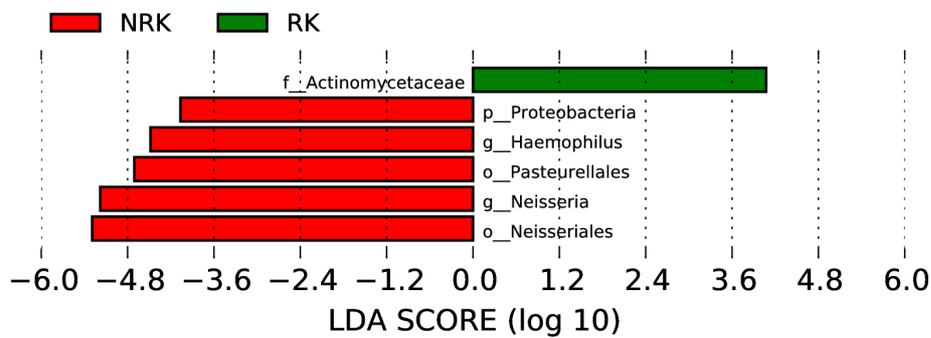
**Abb. 4.8.4.** Hierarchische Clusterung des oralen Mikrobioms gesunder Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Woche 1, Woche 4, Woche 12) unter Verwendung der Bray-Curtis-Dissimilarität auf Stammebene. Das Dendrogramm (links) zeigt die Clusterung der Speichelproben. Dem Balkendiagramm sind die relativen Abundanzen der zehn häufigsten mikrobiellen Phyla zu entnehmen, ein Balken steht hierbei für eine Probe. Die 10 häufigsten mikrobiellen Phyla sind nach Farben kodiert und der Legende zu entnehmen, die restlichen Phyla wurden als "Others" zusammengefasst. Kontrollen in Woche 1 sind rot, in Woche 4 blau und in Woche 12 grün markiert.

Um die Unterschiede im oralen Mikrobiom von gesunden Probanden anhand ihrer Raucheranamnese genauer zu untersuchen, wurde die Kontrollkohorte in 2 Subgruppen unterteilt, aktive Raucher (n = 3) vs. Nie-Raucher (n = 4). Die Proben in Woche 1 wurden für diesen Vergleich verwendet. Unsere Analyse ergab, dass Phylum Proteobakterien, einschließlich Ordnung Neisseriales und Gattung *Neisseria*, sowie Ordnung Pasteurellales, einschließlich Gattung *Haemophilus* bei Nichtrauchern angereichert war, während Familie Actinomycetaceae bei aktiven Rauchern angereichert war (**Abb. 4.8.5.b**). Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass die Spezies *Oscillibacter valericigenes* bei aktiven Rauchern ebenfalls signifikant angereichert war (**Abb. 4.8.5.a**).

a)



b)



**Abb. 4.8.5. a)** Boxplot der bakteriellen Spezies *Oscillibacter valericigenes* mit signifikant abweichender relativer Abundanz zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern. Die relative Häufigkeit des Taxons wird auf der Y-Achse, die Gruppennamen auf der X-Achse dargestellt. **b)** LEfSe-Analyse des oralen Mikrobioms gesunder Raucher und Nichtraucher. Die horizontalen Balken stellen die Effektgröße für jedes Taxon dar. Der Schwellenwert des logarithmischen LDA-Scores für diskriminierende Merkmale wurde auf 4,0 festgelegt. Er entspricht der Länge der Balken und wird durch vertikale gepunktete Linien angezeigt. Nichtraucher sind rot, Raucher grün gekennzeichnet. Jeder Balken entspricht einem mikrobiellen Taxon mit statistisch signifikanter Veränderung ( $p < 0,05$ ) in der relativen Häufigkeit zwischen den untersuchten Gruppen. Der Name der Taxonebene wird als p-Stamm (phylum); c-Klasse (class); o-Ordnung (order); f-Familie (family), g-Gattung (genus) und s-Spezies (species) abgekürzt.

## 5. Diskussion

In unserer prospektiven Längsschnittstudie stellten wir zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine reduzierte Alpha-Diversität des oralen Mikrobioms der HNSCC-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen fest. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die RCT Veränderungen im oralen Mikrobiom herbeiführt, was mit den Ergebnissen früherer Studien übereinstimmt [61],[133]. Die von uns unter RCT beobachteten Veränderungen im oralen mikrobiellen Profil waren nach Beendigung der Therapie weitgehend reversibel. Bereits prätherapeutisch fanden wir einige Taxa mit unterschiedlicher relativer Abundanz zwischen Patienten und Kontrollen. Unsere Ergebnisse können somit hinweisend dafür sein, dass sowohl HNSCC selbst als auch die tumorspezifische Therapie mit dem oralen Mikrobiom interagieren.

### 5.1. Einordnung der Methodik in der Mikrobiomanalytik

Der Einfluss der RCT auf das orale Mikrobiom von Patienten mit HNSCC wurde bereits mittels kulturabhängiger und kulturunabhängiger Verfahren untersucht [61]. Mittels kulturabhängiger Methoden konnten Almstahl et. al beispielsweise eine Assoziation von *Candida albicans* mit strahleninduzierter Hyposalivation nachweisen sowie die Anwesenheit von *Lactobacillus spp.* bei > 90% der Patienten nach Radiotherapie feststellen [2]. Kulturabhängige Methoden eignen sich jedoch nur bedingt zur Analyse des oralen Mikrobioms, da die hohe Diversität der Proben und insbesondere die in geringer Konzentration vorkommenden Spezies nur sehr eingeschränkt erfasst werden können. Neben der Tatsache, dass viele Mikrobiota bis heute noch nicht kultivierbar sind, besteht ein enormer labortechnischer Aufwand, insbesondere bei großen Probensätzen [120].

Kulturunabhängige Verfahren stellen heutzutage den Standard in der Mikrobiomanalytik dar [35]. Ergebnisse können jedoch aufgrund unterschiedlicher Sequenzierungstechniken, differierender methodischer Ansätze, Studienpopulationen und/oder Studiendesigns variieren. Dies und viele andere Faktoren führen dazu, dass Ergebnisse nicht immer durch andere Studien bestätigt werden können. Zwei Studien, in denen das orale Mikrobiom mithilfe von 16S-rRNA-Gensequenzierung untersucht wurde, konnten beide ebenfalls eine signifikante Reduktion der oralen mikrobiellen Diversität unter Therapie nachweisen. Die eingeschlossene Studienpopulation und/oder die Therapiemodalitäten unterschieden sich jedoch von unserer Studie. Zum einen handelte es sich um Patienten mit Nasopharynxkarzinom mit Indikation zur Strahlentherapie mit oder ohne Chemotherapie [61], zum anderen um Patienten mit multiplem Myelom, welche mittels Hochdosis-Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden [133]. Die 16S-rRNA-Gensequenzierung stellt gegenwärtig aufgrund ihrer Kosteneffizienz, der Verfügbarkeit ähnlicher Studien zu Vergleichszwecken sowie einem vergleichsweise geringerem bioinformatischen Analyseaufwand die am häufigsten angewendete Methode zur Analyse des menschlichen Mikrobioms dar [38]. Zu den Nachteilen der 16S-rRNA-basierten Methoden, welche die

Interpretation der Ergebnisse einschränken können, gehören unter anderem die Verwendung uneinheitlicher „universeller“ Primer bei der PCR-Amplifikation. Dies kann zu Verzerrungen bei der Bewertung von Taxon-Häufigkeiten führen inklusive Überrepräsentation von Bakterien [38]. Außerdem ist die taxonomische Auflösung nur bis zur Gattungsebene möglich. Die Sequenzierung unterschiedlicher variabler Regionen ja nach bakteriellem Taxon kann zusätzlich die Variabilität der Ergebnisse erhöhen [88].

In unserer Studie verwendeten wir die metagenomische Shotgun-Sequenzierung. Mit dieser Methode wird die gesamte DNS einer Probe sequenziert und die gesamte genetische Information einer Probe analysiert, einschließlich Viren, Pilzen und Parasiten, da keine gezielte PCR-Amplifikation mit Restriktion auf ein Ziel-Gen erforderlich ist. Sie ermöglicht eine zuverlässigere Bewertung der taxonomischen Zusammensetzung einer Probe bis auf Speziesebene sowie die Charakterisierung des funktionellen Profils, was zu einem tieferen Verständnis des Mikrobioms beiträgt [31]. Funktionelle Analysen ermöglichen beispielsweise den Nachweis von ARG. Nachteile dieser Sequenzierungsmethode sind die höheren Kosten und die wesentlich komplexere bioinformatische Datenaufbereitung. Die metagenomische Shotgun-Sequenzierung wurde unseres Wissens nach bisher noch nicht in einer oralen Mikrobiomstudie von Patienten mit HNSCC mit unserer Fragestellung eingesetzt.

## **5.2. Stabilität und Zusammensetzung des gesunden oralen Mikrobioms**

Mittlerweile liegen große Datensätze vor, die Aufschluss über die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms gesunder Probanden in Bezug auf die relativen Häufigkeiten der wichtigsten die Mundhöhle besiedelnden mikrobiellen Gattungen geben. Hierzu gehören unter anderem *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia* spp., *Neisseria* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp. und nicht klassifizierte Gattungen [94]. Darüber hinaus umfasst das gesunde orale Kernmikrobiom 78 Gattungen und 34 Taxa höherer Ordnung [129] und scheint interessanterweise in der Mundhöhle größer zu sein als in anderen Körperregionen. In unserer Studie konnten wir ebenfalls in der Kontrollgruppe über 3 Monate vor allem Kommensalen der Mundhöhle feststellen, die als Bestandteil eines gesunden oralen Mikrobioms gelten [94]. Unter anderem waren *Streptococcus* spp. wie *S. salivarius*, *S. timonensis* und *S. australis* sowie verschiedene *Actinomyces* spp. in der gesunden Kontrollgruppe angereichert. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen die Gesamtzahl der Streptokokken einschließlich *S. sanguis*, *S. oralis* und *S. salivarius* mit einem gesunden oralen Mikrobiom in Verbindung gebracht wurden [2], ebenso wie Gattung *Actinomyces* [94]. Der Kernmikrobiom-Anteil nicht-redundanter mikrobieller Gene war unseren Ergebnissen zufolge in der Kontrollgruppe 4,8% höher als in der Patientenkohorte. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass das orale Mikrobiom der Kontrollkohorte über einen Zeitraum von drei Monaten stabil blieb, wie zuvor bereits in anderen Studien beschrieben. Costello et al. konnten mithilfe der 16S-rRNA-

Gensequenzierung zeigen, dass das mikrobielle Profil verschiedener menschlicher Habitate, darunter auch die Mundhöhle, ohne äußere Einflüsse über einen Zeitraum von 3 Monaten wenigen Schwankungen unterworfen war und eine Reihe charakteristischer Taxa beherbergte [27].

### **5.3. Einfluss von Tabakkonsum auf das orale Mikrobiom**

Rauchen kann sich sowohl direkt als auch indirekt auf das OM auswirken und eine orale Dysbiose verursachen sowie die mikrobielle Diversität und das funktionelle Potenzial der mikrobiellen Taxa beeinträchtigen [45]. Einige potentielle Mechanismen, die diese Veränderungen hervorrufen, sind Sauerstoffmangel, Immunsuppression, Biofilmbildung sowie der direkte Kontakt mit in Tabak und Zigaretten enthaltenen Mikrobiota [50]. In der Kontrollgruppe konnten bei Nichtrauchern Proteobakterien einschließlich Ordnung Neisseriales und Gattung *Neisseria* sowie Ordnung Pasteurellales inklusive Gattung *Haemophilus* vermehrt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse passen zu früheren Studien, bei denen bei Rauchern ein signifikanter Mangel an Proteobakterien wie *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. und *Lautropia* spp. nachgewiesen wurde [118]. Darüber hinaus stellten wir fest, dass Familie Actinomycetaceae inklusive Spezies *Oscillibacter valericigenes* bei Rauchern signifikant angereichert war. Gregory et al. untersuchten die Zusammensetzung des Lungen-Viroms in Abhängigkeit vom Raucherstatus und fanden Unterschiede in der Häufigkeit bestimmter Phagengruppen im Raucher- und Nichtraucher-Virom. Unter anderem waren *Prevotella*-, *Actinomyces*- und *Capnocytophaga*-Phagen im Raucher-Virom angereichert, während *Lactobacillus*- und *Gardnerella*-Phagen häufiger im Nichtraucher-Virom vorkamen [41]. Ein Fall von Bakteriämie verursacht durch *Oscillibacter valericigenes*, wurde 2020 bei einem 55-jährigen Patienten beschrieben, der wegen Osteomyelitis und Beinamputation ins Krankenhaus eingeliefert wurde [18]. Daten, die diese Spezies mit dem oralen Mikrobiom in Verbindung bringen liegen bislang noch nicht vor, was einmal mehr die Wichtigkeit weiterer Untersuchungen unterstreicht.

### **5.4. Veränderungen des oralen Mikrobioms von Patienten unter Radiochemotherapie**

Im nächsten Schritt schauten wir uns die Veränderungen des oralen Mikrobioms von Patienten unter RCT an. Wir konnten bei HNSCC-Patienten unter RCT eine Abnahme der relativen Abundanz vieler oraler Mikrobiota auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen feststellen. Wir konnten zeigen, dass die Diversität und Komplexität des oralen Mikrobioms unter RCT abnahm und dass sich das orale Mikrobiom der Patienten während der Bestrahlung in seiner Komposition signifikant von dem gesunder Kontrollen unterschied. Unsere Ergebnisse belegen, dass die RCT einen erheblichen Einfluss auf das orale Mikrobiom hat, wie bereits in früheren Studien beschrieben [61],[133]. In Woche 3 der Bestrahlung litten 50% der Patienten

an einer LGM, 30% der Patienten hatten bereits eine HGM entwickelt, während in Woche 6 der Bestrahlung 50% eine HGM und 40% eine LGM entwickelt hatten. Nur ein Patient entwickelte während des gesamten Behandlungszeitraums keine orale Mukositis.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass es in Therapiewoche 3 im Vergleich zur Baseline noch größere Überschneidungen im mikrobiellen Profil der Patientenproben vorhanden waren, während sich das OM mit steigender kumulativer Strahlendosis und Voranschreiten der oralen Mukositis in Therapiewoche 6 zunehmend veränderte und von dem Profil prätherapeutischer Proben unterschied und umgekehrt. In Therapiewoche 6 konnten wir im Vergleich zum Studienbeginn einen signifikant abnehmenden Artenreichtum nachweisen, während sich die Artenverteilung nicht signifikant unterschied.

Neben der Feststellung, dass viele Taxa in der Patientengruppe unter RCT im Vergleich zu gesunden Kontrollen abgereichert waren, fanden wir zwei Spezies, die in Therapiewoche 6 eine signifikant höhere relative Häufigkeit aufwiesen, nämlich *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Bei *S. aureus* und *E. coli* handelt es sich um fakultative Anaerobier. Sie wurden in früheren Studien bereits aus dem Speichel HNSCC-Patienten isoliert, die sich einer RCT unterzogen [110]. Es wurde gezeigt, dass die Prävalenz von *S. aureus* in der ulzerativen Phase von RIOM erhöht ist und dass *Staphylococcus spp.* mit dem Vorhandensein einer ulzerativen oralen Mukositis assoziiert sind [61]. Bei *S. aureus* handelt es sich um ein gram-positives, opportunistisches Bakterium, welches mit oralen Superinfektionen und Episoden von Bakteriämie bei Patienten mit oraler Mukositis in Verbindung gebracht wird, welches jedoch auch eine Vielzahl anderer Infektionen wie z.B. Endokarditiden oder Pneumonien auslösen kann [80].

Bakteriämie ausgelöst durch eine orale Mukositis ist wie bereits erwähnt einerseits mit aeroben gram-positiven Kokken (Koagulase-negative Staphylokokken, Viridansstreptokokken, *Streptococcus spp.* oder *S. aureus*) vergesellschaftet, andererseits aber auch mit aeroben gramnegativen Bazillen (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*) [119]. Sonalika et al. fanden heraus, dass *E. coli* neben anderen Spezies, zur Exazerbation einer oralen Mukositis beiträgt [100].

Weitere potenziell humanpathogene Spezies, welche wir vermehrt bei Patienten unter RCT feststellen konnten, waren unter anderem *Streptococcus pneumoniae* und *humanes endogenes Retrovirus W*. Unsere Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass bei Patienten die sich einer RCT unterziehen, eine Verschiebung des mikrobiellen Profils zu potenziell virulenteren Taxa im Sinne einer Dysbiose entsteht. Ein tieferes Verständnis der Rolle des OM in der Pathogenese der oralen Mukositis ist von Bedeutung um Präventions- sowie Behandlungsstrategien für lokale und/oder systemische sowie möglicherweise lebensbedrohliche Infektionen zu entwickeln. Es wird allgemein angenommen, dass ein stabiles und vielfältiges orales Mikrobiom für verschiedene physiologische Prozesse wie z.B.

die Immunfunktion der Schleimhäute von wesentlicher Bedeutung ist, da die normale mikrobielle Flora der Mundhöhle und des Oropharynx die Besiedlung mit exogenen Krankheitserregern und eine Überwucherung von pathogenen Mikroben verhindert [10]. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zu einer Dysregulation des Immunsystems führen und das Risiko für die Entwicklung verschiedener Erkrankungen erhöhen sowie dazu führen, dass sich pathogene Bakterien unkontrolliert ausbreiten.

## **5.5. Orales Mikrobiom und HNSCC**

Neben den Veränderungen des oralen Mikrobioms durch die RCT konnten wir bereits vor Therapiebeginn signifikante Unterschiede im OM zwischen Patienten und Kontrollen feststellen. Dies kann hinweisend sein auf eine Interaktion zwischen OM und HNSCC. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in unserer Studie eine gewisse Heterogenität zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Baseline-Charakteristika einschließlich Geschlecht und Alter bestand, welche ebenfalls zu den Unterschieden im mikrobiellen Profil beigetragen haben könnten.

Alle Taxa, die in der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie angereichert waren, ließen sich auch vermehrt bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu Patienten unter RCT nachweisen. Dies unterstreicht die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse. Ferner könnte die longitudinale Analyse der Proben dazu beigetragen haben, Confounder zu reduzieren.

Während des Follow-Up konnten klinisch keine Mukositiszeichen mehr nachgewiesen werden. Ferner konnten die während der RCT beobachteten Unterschiede im OM zwischen Patienten und Kontrollen nicht mehr in der Ausprägtheit festgestellt werden. Daraus lässt sich Schlussfolgern, dass die durch die RCT verursachten Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung größtenteils reversibel sind.

Ein Taxon, Familie Leuconostocaceae aus der Ordnung Lactobacillales, wies in der Patientenkohorte prätherapeutisch eine signifikant höhere relative Häufigkeit auf. Dieses Taxon konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht mit dem oralen Mikrobiom von HNSCC-Patienten assoziiert werden. Es könnte jedoch von Bedeutung sein, seine Rolle in der Pathogenese von HNSCC weiter zu untersuchen. Sonalika et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Patienten mit OSCC („oral squamous cell carcinoma“ - OSCC) eine signifikant höhere Anzahl an oralen Aerobiern, Anaerobiern, Coliformen und gramnegativen anaeroben Bakterien aufwiesen als gesunde Personen [100].

Interessanterweise konnten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gattung *Capnocytophaga* und Patienten feststellen, die sich einer primär definitiven RCT unterzogen im Vergleich zu Patienten, die eine adjuvante RCT erhielten. *Capnocytophaga* spp. war bei Patienten zum Baseline-Zeitpunkt überrepräsentiert, die sich keiner Tumoroperation unterzogen hatten, was unterstreicht, dass das Tumorgewebe selbst die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms beeinflussen kann. Gattung *Capnocytophaga* wurde bereits in der

Vergangenheit mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle in Verbindung gebracht. Mager et al. konnten zeigen, dass die 3 Spezies, *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* und *Streptococcus mitis*, signifikant bei OSCC-Patienten angereichert waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Sie konnten sogar mit einer relativ hohen Sensitivität sowie Spezifität (beides > 80%) als diagnostische Marker für OSCC eingesetzt werden [71]. Zhu et al. konnten nachweisen, dass die Spezies *Capnocytophaga gingivalis* außerdem in OSCC-Gewebe eindringen und eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen könnte, indem es die Tumorinvasion und -metastasierung durch Induktion der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) fördert, welche die Umwandlung von Epithelzellen in mesenchymale Zellen bezeichnet und eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Metastasen hat [132]. Ob Veränderungen im oralen Mikrobiom Ursache oder Folge von HNSCC sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Um diese Frage zu klären, sind weitere Studien notwendig.

#### **5.6. Zusammenhang zwischen oralem Mikrobiom und der Inzidenz der höhergradigen Mukositis**

Nicht alle unsere HNSCC-Patienten entwickelten während der RCT eine HGM. Dies warf die Frage auf, ob Unterschiede im OM von Patienten mit LGM vs. HGM vorliegen. In der ulzerativen Phase der RIOM sind Mikroorganismen, die in einem Biofilm wachsen wesentlich resistenter gegen antimikrobielle Agenzien als freilebende Mikroorganismen [133]. Sobald sich im Rahmen der RIOM eine Pseudomembran in der Mundhöhle bildet, können Mundspüllösungen die im Biofilm lebenden Mikrobiota nur zu einem geringen Grad entfernen. Dies führt zu Herausforderungen bei der Behandlung einer schweren oralen Mukositis und kann eine Erklärung dafür sein, wieso die Anwendung topischer, antimikrobieller Substanzen das Auftreten einer schweren Mukositis in früheren Studien nicht sicher verhindern konnten [133]. In unserer Studie wies die Patientengruppe, die später eine HGM entwickelte, zum Baseline-Zeitpunkt eine größere mikrobielle Artenvielfalt auf als die LGM-Subgruppe, was sich anhand des signifikant höheren Shannon-Index äußerte. Außerdem konnten zwei mikrobielle Taxa identifiziert werden, die in der HGM-Subgruppe zum Baseline-Zeitpunkt eine signifikant höhere relative Abundanz hatten. Es handelte sich hierbei um zwei Pilzfamilien, Melampsoraceae und Herpotrichiellaceae. Melampsoraceae sind eher mit der Umwelt als mit dem menschlichen Mikrobiom assoziiert [78]. Auch Herpotrichiellaceae wurden in früheren Studien noch nicht mit RIOM oder HNSCC in Verbindung gebracht. Es sind jedoch opportunistische, humanpathogene Arten aus der Familie der Herpotrichiellaceae in der Literatur beschrieben [28]. In der LGM-Gruppe waren zum Baseline-Zeitpunkt unter anderem *Rothia* spp., *Streptococcus* spp. and *Haemophilus* spp. angereichert. Es könnte von großem prognostischem und therapeutischem Interesse sein, mikrobielle Taxa zu identifizieren, die als

potentielle Biomarker zur Risiko-Stratifizierung von Patienten dienen, bei denen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer HGM im Rahmen einer RCT besteht.

Während der RCT wies die HGM-Gruppe eine Tendenz zu größeren Überschneidungen in der mikrobiellen Zusammensetzung auf, als die LGM-Gruppe, auch wenn dies nicht statistisch signifikant war. Es wurden außerdem keine mikrobiellen Taxa gefunden, die sich während der RCT zwischen LGM- und HGM-Gruppe unterschieden. Die detektierten Unterschiede im mikrobiellen Profil von LGM vs. HGM-Gruppe zum Baseline-Zeitpunkt konnten unter RCT nicht mehr nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Daten. Zhu et al. zeigten beispielsweise, dass Patienten in der LGM-Gruppe vom Auftreten eines sichtbaren Erythems bis zum Beginn einer schweren Mukositis (RTOG 3) eine signifikant höhere Alpha-Diversität aufwiesen und dass Patienten, die schließlich ein schwere RIOM entwickelten bereits vorher einen deutlich höheren Anteil an *Actinobacillus* spp. beherbergten. Sie postulierten, dass *Actinobacillus* spp. das mikrobielle Gleichgewicht des Oropharynx beeinflusst und somit einen prädisponierenden Faktor für die Entwicklung einer schweren Mukositis darstellen könnte. Wir konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Außerdem fanden wir, anders als zuvor von Almstahl et al beschrieben [2], keinen Zusammenhang zwischen *Candida* spp. und der Entstehung der RIOM. Dies könnte jedoch auf unterschiedliche Behandlungsmodalitäten, Tumorlokalisationen und Sequenzierungsmethoden zurückzuführen sein.

### **5.7. Einfluss der antibiotischen Therapie auf das orale Mikrobiom**

Interessanterweise zeigten unsere Daten keinen signifikanten Einfluss einer Antibiotikabehandlung auf die durch die RCT ausgelösten mikrobiellen Veränderungen im OM der HNSCC-Patienten. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Antibiotikatherapie das orale Mikrobiom nur geringfügig und vorübergehend beeinflusst, anders als es beim Darmmikrobiom der Fall ist. Zaura et al. kamen zu dem Schluss, dass es bei gesunden Probanden, die eine antibiotische Monotherapie erhielten, zu erheblichen mikrobiellen Verschiebungen und vermehrter Expression von ARG im Darmmikrobiom kam, während die Zusammensetzung des Speichelmikrobioms unerwartet stabil blieb [131]. Das Verständnis der Resilienz des Speichelmikrobioms gegenüber einer Antibiotikatherapie könnte sich als nützlich erweisen, um in Zukunft Lösungen zur Vorbeugung mikrobieller Dysbiosen zu finden. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass eine antibiotische Therapie nicht alle mikrobiellen Gene beeinflusst, Pilz- und Virus-Gene sind hiervon beispielsweise ausgeschlossen.

## **5.8. Antibiotikaresistenzgene unter Radiochemotherapie**

In unserer funktionellen Analyse konnten wir als ARG mit den höchsten relativen Anteilen in der Patientengruppe während RCT CTX-M-6, gadX und cat identifizieren. CTX-M-6 gehört zur strukturellen Familie der Extended-Spectrum-Betalaktamasen (ESBL). Über Betalaktamasen vom Typ CTX-M wurde erstmals in den 1980er Jahren berichtet. Seitdem hat ihre Verbreitung unter Bakterien rapide zugenommen [14]. Sie werden von übertragbaren Plasmiden kodiert und kommen in verschiedenen Enterobakterien vor. CTX-M-6 ist vor allem mit *Salmonella typhimurium* assoziiert [39]. GadX ist ein Regulator der AraC-Familie, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung multiresistenter Erreger spielt [76]. Die Produktion des Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat)-Gens bildet den Hauptmechanismus der Resistenzbildung gegen Chloramphenicol [91]. Insgesamt konnten wir feststellen, dass das Profil der ARG in der Kontrollgruppe vielfältiger war als in der Patientenkohorte in Therapiewoche 3, was auf die Auswirkungen der RCT zurückzuführen sein könnte. Die funktionelle Analyse von Mikrobiomen ermöglicht nicht nur den Nachweis von ARG, sondern auch die Untersuchung von Genfamilien und Stoffwechselwegen [11]. Dieser Punkt könnte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

## **5.9. Limitationen der Studie**

Positiv hervorzuheben ist, dass unsere Patientenkohorte in Bezug auf die Behandlungsmodalitäten, die Strahlendosis sowie die Tumorentität und die Baseline-Charakteristika sehr homogen war. Das longitudinale Studiendesign sowie der Vergleich der Patientenkohorte mit einer Kontrollgruppe könnte dazu beigetragen haben, Fehlerquellen zu reduzieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass Speichelproben für Mikrobiom-Studien an HNSCC-Patienten repräsentativ sind [79]. Zwei Limitationen unserer Studie sind die Stichprobengröße sowie die Heterogenität zwischen Patientenkohorte und Kontrollgruppe in Bezug auf die Baseline-Charakteristika. Zusätzliche Parameter wie Mundhygiene und HPV-Status, die ebenfalls zu Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung des oralen Mikrobioms beitragen können, wurden zwar dokumentiert und überwacht, jedoch nicht mit dem oralen Mikrobiom korreliert. Dies sollte in künftigen Studien berücksichtigt werden. Da einige unserer Patienten vor allem am Ende der RCT und während des Follow-Up an Hyposalivation litten, könnte dies ebenfalls unsere Ergebnisse beeinflusst haben.

Zusammenfassend haben wir die Dynamik des oralen Mikrobioms von HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen vor, während und 9 Monate nach RCT untersucht und gezeigt, dass sich das OM von Patienten und Kontrollen bereits vor Beginn der RCT unterscheidet. Wir konnten zeigen, dass die RCT signifikante Veränderungen im oralen Mikrobiom hervorruft und diese auch mit dem Schweregrad der RIOM korrelieren. Die Veränderungen im oralen Mikrobiom waren im Follow-Up 9 Monate nach RCT reversibel. Interessanterweise wiesen Patienten, die

im Verlauf eine HGM entwickelten, zum prätherapeutischen Zeitpunkt bereits mikrobielle Taxa auf, die sich signifikant von der LGM-Gruppe unterschieden. Während der RCT fanden wir keine Taxa mit unterschiedlicher relativer Abundanz zwischen LGM- und HGM-Gruppe. Darüber hinaus war *Capnocytophaga* spp. mit Patienten assoziiert, die mit einer primär definitiven RCT behandelt wurden. Unsere Studie kann somit als Pilotstudie für weitere Untersuchungen an größeren Kohorten dienen, um ein tieferes Verständnis der Auswirkungen des oralen Mikrobioms auf Gesundheit und Krankheit zu erlangen und potenzielle Biomarker für das Screening von Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer HGM haben.

## 6. Bibliographie

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732
2. Almståhl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B (2008) Microflora in oral ecosystems in subjects with radiation-induced hyposalivation. *Oral Dis* 14:541–549
3. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *The Lancet* 371:1695–1709
4. Balducci L, Extermann M (2000) Management of Cancer in the Older Person: A Practical Approach. *The Oncologist* 5:224–237
5. Barasch A, Peterson DE (2003) Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol* 39:91–100
6. Baumann M, Hölscher T, Begg AC (2003) Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* 69:121–125
7. Behjati S, Tarpey PS (2013) What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98:236–238
8. Beitler JJ, Zhang Q, Fu KK, Trotti A, Spencer SA, Jones CU, Garden AS, Shenouda G, Harris J, Ang KK (2014) Final results of local-regional control and late toxicity of RTOG 9003: a randomized trial of altered fractionation radiation for locally advanced head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89:13–20
9. Belazi M, Veleglaki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, Eliopoulou C, Destouni E, Antoniadis D (2004) Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol* 19:347–351
10. Belkaid Y, Hand T (2014) Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* 157:121–141
11. Bercovici S, Sharon I, Pinter RY, Shlomi T (2010) Pathway-Based Functional Analysis of Metagenomes. Springer, Berlin, Heidelberg
12. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin EM, Jacobs JR, Jassem J, Ang K-K, Lefèbvre JL (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
13. Blum HE (2017) The human microbiome. *Adv Med Sci* 62:414–420
14. Bonnet R (2004) Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1
15. Braam PM, Roesink JM, Moerland MA, Raaijmakers CPJ, Schipper M, Terhaard CHJ (2005) Long-term parotid gland function after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol* 62:659–664
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424
17. Bray JR, Curtis JT (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27:326–349
18. Broutin L, Deroche L, Michaud A, Le Moal G, Burucoa C, Gayet L-E, Plouzeau C, Pichon M (2020) First description of bacteremia caused by *Oscillibacter valericigenes* in a patient hospitalized for leg amputation. *Anaerobe* 64:102244
19. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278–288
20. Chao A (1984) Non-parametric estimation of the classes in a population. *Scand J Stat* 11:265–270
21. 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
22. Chen S-C, Lai Y-H, Huang B-S, Lin C-Y, Fan K-H, Chang JT-C (2015) Changes and predictors of radiation-induced oral mucositis in patients with oral cavity cancer during active treatment. *Eur J Oncol Nurs* 19:214–219

23. Cheng KK-F (2007) Oral mucositis, dysfunction, and distress in patients undergoing cancer therapy. *J Clin Nurs* 16:2114–2121
24. Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol* 18:117–143
25. Clifton Stephens L, Kian Ang K, Schultheiss TE, King GK, Brock WA, Peters LJ (1986) Target cell and mode of radiation injury in rhesus salivary glands. *Radiother Oncol* 7:165–174
26. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LMD (2008) Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 122:2811–2819
27. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R (2009) Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* 326:1694–1697
28. Crous PW, Schubert K, Braun U, de Hoog GS, Hocking AD, Shin H-D, Groenewald JZ (2007) Opportunistic, human-pathogenic species in the Herpotrichiellaceae are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the Venturiaceae. *Stud Mycol* 58:185–217
29. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG (2010) The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017
30. Dörr W, Grötz KA, Hartmann JT, Riesenbeck D (2007) Orale Mukositis: Experimentelle und klinische Ansätze zur Prävention und Behandlung. *Onkologe* 13:150–157
31. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A (2021) Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci Rep* 11:3030
32. Eilers J, Million R (2011) Clinical Update: Prevention and Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Semin Oncol Nurs* 27:e1–e16
33. Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan RM, Bowen J, Gibson R, Saunders DP, Zadik Y, Ariyawardana A, Correa ME, Ranna V, Bossi P (2020) MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* 126:4423–4431
34. Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS (2007) Risk, Outcomes, and Costs of Radiation-Induced Oral Mucositis Among Patients With Head-and-Neck Malignancies. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys* 68:1110–1120
35. Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A (2015) The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet* 6:348
36. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C (1999) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 35:375–378
37. Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, Fricke A, Rube CE, Rube C (2011) The Impact of Individual In Vivo Repair of DNA Double-Strand Breaks on Oral Mucositis in Adjuvant Radiotherapy of Head-and-Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol* 81:1465–1472
38. Ganly I, Hao Y, Rosenthal M, Wang H, Migliacci J, Huang B, Katabi N, Brown S, Tang Y-W, Pei Z, Yang L (2022) Oral Microbiome in Nonsmoker Patients with Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma, Defined by Metagenomic Shotgun Sequencing. *Cancers* 14:6096
39. Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouveleakis LS (1998) Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 165:289–293
40. Gillison M, Lowy D (2004) A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *The Lancet* 363:1488–1489
41. Gregory AC, Sullivan MB, Segal LN, Keller BC (2018) Smoking is associated with quantifiable differences in the human lung DNA virome and metabolome. *Respir Res* 19:174
42. Grundmann O, Mitchell GC, Limesand KH (2009) Sensitivity of Salivary Glands to Radiation. *J Dent Res* 88:894–903
43. Guobis Ž, Kareivienė V, Basevičienė N, Paipalienė P, Niedzelskienė I, Sabalys G, Kubilius R, Gervickas A (2011) Microflora of the oral cavity in patients with xerostomia. *Med Kaunas Lith* 47:646–651
44. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso

- L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang Z-F, Berthiller J, Boffetta P (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99:777–789
45. Hashibe M, Brennan P, Chuang S, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, Vecchia CL, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang Z-F, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P (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 Prev Biomark* 18:541–550
46. Hayes RB, Ahn J, Fan X, Peters BA, Ma Y, Yang L, Agalliu I, Burk RD, Ganly I, Purdue MP, Freedman ND, Gapstur SM, Pei Z (2018) Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol* 4:358–365
47. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3:733
48. Hillbertz NS, Hirsch J-M, Jalouli J, Jalouli MM, Sand L (2012) Viral and molecular aspects of oral cancer. *Anticancer Res* 32:4201–4212
49. Hu Y, Shao Z, Wang Q, Jiang Y, Ma R, Tang Z, Liu Z, Liang J, Huang Z (2013) Exploring the Dynamic Core Microbiome of Plaque Microbiota during Head-and-Neck Radiotherapy Using Pyrosequencing. *PLoS ONE* 8:
50. Huang C, Shi G (2019) Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J Transl Med* 17:225
51. Huang SH, O’Sullivan B (2017) Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18:40
52. Humphrey SP, Williamson RT (2001) A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85:162–169
53. Irune E, Dwivedi RC, Nutting CM, Harrington KJ (2014) Treatment-related dysgeusia in head and neck cancer patients. *Cancer Treat Rev* 40:1106–1117
54. Javed F, Warnakulasuriya S (2016) Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. *Crit Rev Oncol Hematol* 97:197–205
55. Jensen S, Pedersen A, Reibel J, Nauntofte B (2003) Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 11:207–225
56. Jensen S, Pedersen A, Reibel J, Nauntofte B (2003) Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 11:207–225
57. Kerr AR (2015) The oral microbiome and cancer. *J Dent Hyg JDH* 89 Suppl 1:20–23
58. Koch-Institut R Krebs in Deutschland | 2015/2016. 163
59. Krishnan K, Chen T, Paster BJ (2017) A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis* 23:276–286
60. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, Zackrisson B, Szutkowski Z, Suwiński R, Poulsen M, O’Sullivan B, Corvò R, Laskar SG, Fallai C, Yamazaki H, Dobrowsky W, Cho KH, Beadle B, Langendijk JA, Viegas CMP, Hay J, Lotayef M, Parmar MKB, Aupérin A, Herpen C van, Maingon P, Trotti AM, Grau C, Pignon J-P, Blanchard P, Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, Pignon JP, Bernier J, Le Q-T, Overgaard J, Parmar MK, Trotti A, Agarwal JP, Aupérin A, Ang KK, Awwad HK, Bacigalupo A, Bartelink H, Benhamou E, Bernier J, Blanchard P, Bourhis J, Budach W, Chitapanarux I, Cho KH, Collette L, Corvò R, Dani C, Dische S, Dobrowsky W, Denham JW, Driessen CM, Fallai C, Beadle B, Laskar SG, Ghoshal S, Grau C, Gregoire V, Hay JH, Herpen C van, Hliniak A, Johansen J, Kristiansen CA, Krstevska V, Lacas B, Langendijk JA, Lapeyre M, Le Q-T, Lotayef M, Maciejewski B, Maingon P, Michalski W, Moon SH, Nilsson P, Olmi P, Nankivell M, Nishiyama K, O’Sullivan

- B, Overgaard J, Parmar MK, Pignon J-P, Poulsen MG, Ramadas K, Rishi A, Rosenthal DI, Sanguineti G, Saunders MI, Sire C, Skladowski K, Souhami L, Suwinski R, Szutkowski Z, Tandon N, Tinteren H van, Torri V, Tripcony L, Trotti A, Viegas CMP, Waldron J, Widder J, Wong S, Wu JS, Yamazaki H, Zackrisson B, Zhang Q (2017) Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 18:1221–1237
61. Laheij AMGA, Raber-Durlacher JE, Koppelmans RGA, Huysmans M-CDNJM, Potting C, van Leeuwen SJM, Hazenberg MD, Brennan MT, von Bültzingslöwen I, Johansson J-E, de Soet JJ, Haverman TM, Buijs MJ, Brandt BW, Rozema FR, Blijlevens NMA, Zaura E (2019) Microbial changes in relation to oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Sci Rep* 9:16929
62. Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE (2008) Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Dent Clin North Am* 52:61–viii
63. Lambert R, Sauvaget C, Cancela M de C, Sankaranarayanan R (2011) Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23:633–641
64. Langer T (2019) S3-Leitlinie Larynxkarzinom. 147
65. Laudadio I, Fulci V, Palone F, Stronati L, Cucchiara S, Carissimi C (2018) Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *OMICS J Integr Biol* 22:248–254
66. Lerner A, Aminov R, Matthias T (2016) Dysbiosis May Trigger Autoimmune Diseases via Inappropriate Post-Translational Modification of Host Proteins. *Front Microbiol* 7:84
67. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C (2017) Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics* 7:4313–4321
68. Lionel D, Christophe L, Marc A, Jean-Luc C (2006) Oral mucositis induced by anticancer treatments: physiopathology and treatments. *Ther Clin Risk Manag* 2:159–168
69. Long J, Cai Q, Steinwandel M, Hargreaves MK, Bordenstein SR, Blot WJ, Zheng W, Shu XO (2017) Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *J Periodontal Res* 52:636–643
70. Lucenteforte E, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C (2009) Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncol* 45:461–467
71. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM (2005) The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med* 3:27
72. Marron M, Boffetta P, Zhang Z-F, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Schwartz SM, Rudnai P, Purdue MP, Olshan AF, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, McClean M, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, Vecchia CL, Koifman S, Kelsey K, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Maso LD, Curado MP, Cadoni G, Chen C, Castellsague X, Boccia S, Benhamou S, Ferro G, Berthiller J, Brennan P, Møller H, Hashibe M (2010) Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol* 39:182–196
73. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P (2004) Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis—Complicating the Treatment of Cancer. *Neoplasia N Y N* 6:423–431
74. Napeñas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB (2007) Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103:48–59
75. Nielsen S (2000) Numerical Ecology. Legendre P. and Legendre L., second ed., Elsevier, Amsterdam, p. 853, 1998. *Ecol Model - ECOL MODEL* 132:303–304
76. Nishino K, Senda Y, Yamaguchi A (2008) The AraC-family regulator GadX enhances multidrug resistance in *Escherichia coli* by activating expression of *mdtEF* multidrug efflux genes. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* 14:23–29
77. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, Miles EA, Miah AB, Newbold K, Tanay M, Adab F, Jefferies SJ, Scrase C, Yap BK, A'Hern RP, Sydenham MA, Emson M, Hall E (2011) Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 12:127–136

78. Ono Y, Weng Y, Xue Y (2020) Rust fungi collected in the Liupanshan Mountains and adjacent areas, Ningxia Hui Autonomous Region, China.
79. Pandey D, Szczesniak M, Maclean J, Yim HCH, Zhang F, Graham P, El-Omar EM, Wu P (2022) Dysbiosis in Head and Neck Cancer: Determining Optimal Sampling Site for Oral Microbiome Collection. *Pathogens* 11:1550
80. Panghal M, Kaushal V, Kadayan S, Yadav JP (2012) Incidence and risk factors for infection in oral cancer patients undergoing different treatments protocols. *BMC Oral Health* 12:22
81. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, Aquino G, Pedicillo MC, Cagiano S, Campisi G, Rubini C, Papagerakis S, De Rosa G, Tornesello ML, Buonaguro FM, Staibano S, Bufo P (2012) Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer* 7:4
82. Peterson DE, Bensadoun R-J, Roila F (2011) Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 22:vi78–vi84
83. Pignon J-P, Maître A le, Maillard E, Bourhis J (2009) Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 92:4–14
84. Pratesi N, Mangoni M, Mancini I, Paia F, Simi L, Livi L, Cassani S, Buglione M, Grisanti S, Almici C, Polli C, Saieva C, Magrini SM, Biti G, Pazzagli M, Orlando C (2011) Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 99:356–361
85. Ragin CCR, Taioli E (2007) Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121:1813–1820
86. Rand KH, Kramer B, Johnson AC (1982) Cancer chemotherapy associated symptomatic stomatitis. Role of herpes simplex virus (HSV). *Cancer* 50:1262–1265
87. Rasmussen JH, Grønhøj C, Håkansson K, Friborg J, Andersen E, Lelkaitis G, Klusmann JP, Wittekindt C, Wagner S, Vogelius IR, von Buchwald C (2019) Risk profiling based on p16 and HPV DNA more accurately predicts location of disease relapse in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 30:629–636
88. Rausch P, Rühlemann M, Hermes BM, Doms S, Dagan T, Dierking K, Domin H, Fraune S, von Frieling J, Hentschel U, Heinsen F-A, Höppner M, Jahn MT, Jaspers C, Kissoyan KAB, Langfeldt D, Rehman A, Reusch TBH, Roeder T, Schmitz RA, Schulenburg H, Soluch R, Sommer F, Stukenbrock E, Weiland-Bräuer N, Rosenstiel P, Franke A, Bosch T, Baines JF (2019) Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome* 7:133
89. Rose-Ped AM, Bellm LA, Epstein JB, Trotti A, Gwede C, Fuchs HJ (2002) Complications of Radiation Therapy for Head and Neck Cancers: The Patient's Perspective. *Cancer Nurs* 25:461–467
90. Sami A, Elimairi I, Stanton C, Ross RP, Ryan CA (2020) The Role of the Microbiome in Oral Squamous Cell Carcinoma with Insight into the Microbiome-Treatment Axis. *Int J Mol Sci* 21:
91. Schwarz S, Cardoso M (1991) Nucleotide sequence and phylogeny of a chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1551–1556
92. Scully C, Sonis S, Diz PD (2006) Oral mucositis. *Oral Dis* 12:229–241
93. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60
94. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J (2012) Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol* 13:R42
95. Segata N, Boernigen D, Tickle TL, Morgan XC, Garrett WS, Huttenhower C (2013) Computational meta-omics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* 9:666
96. Seiwert TY, Cohen EEW (2005) State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* 92:1341–1348

97. Semrau R (2017) The Role of Radiotherapy in the Definitive and Postoperative Treatment of Advanced Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat* 40:347–352
98. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* 14:e1002533
99. Sio TT, Le-Rademacher JG, Leenstra JL, Loprinzi CL, Rine G, Curtis A, Singh AK, Martenson JA, Novotny PJ, Tan AD, Qin R, Ko SJ, Reiter PL, Miller RC (2019) Effect of Doxepin Mouthwash or Diphenhydramine-Lidocaine-Antacid Mouthwash vs Placebo on Radiotherapy-Related Oral Mucositis Pain. *JAMA* 321:1481–1490
100. Sonalika WG, Amsavardani Tayaar S, Bhat KG, Patil BR, Muddapur MV (2012) Oral microbial carriage in oral squamous cell carcinoma patients at the time of diagnosis and during radiotherapy – A comparative study. *Oral Oncol* 48:881–886
101. Sonis S (2011) Oral mucositis. *Anticancer Drugs* 22:607–612
102. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, Hayden V, Eilers J, Epstein JB, LeVeque FG, Miller C, Peterson DE, Schubert MM, Spijkervet FKL, Horowitz M (2001) Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 19:2201–2205
103. Sonis ST (2004) Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol* 2:3–8
104. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB (2004) Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. *Cancer* 100:1995–2025
105. Sonis ST (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4:277–284
106. Sonis ST (2009) Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol* 45:1015–1020
107. Sonis ST (2013) Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet*
108. Stokman MA, Spijkervet FKL, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JLN, de Vries EGE (2006) Preventive Intervention Possibilities in Radiotherapy- and Chemotherapy-induced Oral Mucositis: Results of Meta-analyses. *J Dent Res* 85:690–700
109. Stromberger C (2019) Primäre und adjuvante Radio(chemo)therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Onkol* 25:240–245
110. Subramaniam N, Muthukrishnan A (2019) Oral mucositis and microbial colonization in oral cancer patients undergoing radiotherapy and chemotherapy: A prospective analysis in a tertiary care dental hospital. *J Investig Clin Dent* 10:e12454
111. Szturz P, Wouters K, Kiyota N, Tahara M, Prabhash K, Noronha V, Castro A, Licitra L, Adelstein D, Vermorken JB (2017) Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *The Oncologist* 22:1056–1066
112. Tezal M, Sullivan MA, Hyland A, Marshall JR, Stoler D, Reid ME, Loree TR, Rigual NR, Merzianu M, Hauck L, Lillis C, Wactawski-Wende J, Scannapieco FA (2009) Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 18:2406–2412
113. Tezal M, Sullivan Nasca M, Stoler DL, Melendy T, Hyland A, Smaldino PJ, Rigual NR, Loree TR (2009) Chronic periodontitis-human papillomavirus synergy in base of tongue cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135:391–396
114. Thukral A (2017) A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agric Res J* 54:1
115. Treister N, Sonis S (2007) Mucositis: biology and management: *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15:123–129
116. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD (2003) Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 66:253–262
117. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 449:804–810

118. Vallès Y, Inman CK, Peters BA, Ali R, Wareth LA, Abdulle A, Alsafar H, Anouti FA, Dhaheri AA, Galani D, Haji M, Hamiz AA, Hosani AA, Houqani MA, Junaibi AA, Kazim M, Kirchhoff T, Mahmeed WA, Maskari FA, Alnaeemi A, Oumeziane N, Ramasamy R, Schmidt AM, Weitzman M, Zaabi EA, Sherman S, Hayes RB, Ahn J (2018) Types of tobacco consumption and the oral microbiome in the United Arab Emirates Healthy Future (UAEHFS) Pilot Study. *Sci Rep* 8:11327
119. Vanhoecke B, Ryck TD, Stringer A, Wiele TV de, Keefe D (2015) Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. *Oral Dis* 21:17–30
120. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG (2010) Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309:1–7
121. Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP (1998) Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 34:284–291
122. Venkatesh GH, Manjunath VB, Mumbrekar KD, Negi H, Fernandes DJ, Sharan K, Banerjee S, Bola Sadashiva SR (2014) Polymorphisms in radio-responsive genes and its association with acute toxicity among head and neck cancer patients. *PLoS One* 9:e89079
123. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S (2006) Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer* 106:329–336
124. Verma D, Garg PK, Dubey AK (2018) Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 200:525–540
125. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP (2003) Oral Sequelae of Head and Neck Radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 14:199–212
126. Warnakulasuriya S (2009) Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. *Evid Based Dent* 10:4–5
127. White JR, Nagarajan N, Pop M (2009) Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* 5:e1000352
128. Yang B, Wang Y, Qian P-Y (2016) Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17:135
129. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W (2009) Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 9:259
130. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJF (2014) Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 4:
131. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MPM, Rashid M-U, Weintraub A, Nord CE, Savell A, Hu Y, Coates AR, Hubank M, Spratt DA, Wilson M, Keijser BJF, Crielaard W (2015) Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio* 6:e01693-01615
132. Zhu W, Shen W, Wang J, Xu Y, Zhai R, Zhang J, Wang M, Wang M, Liu L *Capnocytophaga gingivalis* is a potential tumor promotor in oral cancer. *Oral Dis* n/a:
133. Zhu X-X, Yang X-J, Chao Y-L, Zheng H-M, Sheng H-F, Liu H-Y, He Y, Zhou H-W (2017) The Potential Effect of Oral Microbiota in the Prediction of Mucositis During Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *EBioMedicine* 18:23–31

## **7. Publikationen / Danksagung**

### **7.1. Publikationen**

Während der vorgelegten Dissertation entstanden folgende Publikationen bzw. Vorträge auf nationalen Kongressen:

D. Torozan, C. Laczny, K. Roomp, P. Wilmes, J. Fleckenstein, J. Schneider

**Metagenomic Profiling of Oral Microbiome Dynamics during Chemoradiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients.** Cancer Medicine: in review.

J. Fleckenstein, C. Rube, D. Torozan

**Untersuchungen zum Stellenwert des oralen Mikrobioms in der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Karzinomen: erste Ergebnisse der SMART-Studie**

22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, 28.05.2022

## 7.2. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Rübe für die Möglichkeit bedanken, an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes zu promovieren. Er zeigte sich stets an meiner Arbeit interessiert und unterstützte mich tatkräftig.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Jochen Fleckenstein für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die ausgezeichnete und unermüdliche Betreuung meiner Dissertation bedanken. Ich habe nicht nur von seiner fachlichen Expertise profitieren können, auch menschlich stand er mir immer motivierend und Rat gebend zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Jochen Schneider vom Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, der von Beginn an maßgeblich an der Ideenfindung sowie Umsetzung der Promotion beteiligt war. Für seine beharrliche und exzellente fachliche Unterstützung möchte ich mich herzlichst bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Cédric Laczny und Frau Dr. Kirsten Roomp vom Luxembourg Centre for Systems Biomedicine meinen Dank für die herausragende Hilfe vor allem bei der statistischen Auswertung der Mikrobiomanalysen aussprechen. Ihre kompetente und freundschaftlichen Betreuung hat diese Arbeit besonders geprägt.

Herrn Dr. med. Oliver Wick und Frau Iris Adrian gebührt ein großer Dank für die Unterstützung, vor allem in der Patientenrekrutierung, Probenasservierung sowie Probenverarbeitung. Ihr Einsatz vor allem in der frühen Phase der Dissertationsarbeit ist hervorzuheben.

Ausdrücklich möchte ich mich auch bei allen ärztlichen Kollegen und dem Pflegepersonal für die Betreuung der Studienpatienten bedanken.

Zuletzt gebührt mein größter Dank meinen Eltern Cornelius und Mihaela Torozan, meiner Freundin Dr. med. Charlotte Kraetzer und meinem Partner Dr. med. Jan Wintrich, ohne die meine Dissertation niemals möglich gewesen wären.

## **8. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 06. Juni 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Rube

Prof. Dr. med. Sören Leif Becker