

Expression of B-catenin in Human Papilloma virus –Positive in Tonguesquamos Cell carcinoma.(An Immunohistochemistry study)

Dr. Basima yosef*
Ahmad Hamdan**

(Received 22 / 8 / 2017. Accepted 5 / 9 / 2017)

□ ABSTRACT □

High risk human Papilloma virus (Hpv) plays role as oncogen virus of cancer .This study describes changes in cell adhesion Molecules during tumor progression of HPV-related and unrelated Tongue carcinoma.

Methods and Result :

We examind 48 primary tumors of tongue carcinoma samples fortheir HPV status and B-catenin expression.

Appositive HPV polymerase chain reaction finding a correlation with nucleuar B-catenin localization) p=0,03(

Conclusion:

Our study indicate that the nuclear translocation of B-cateninexpression might be crucial steps duringtumor progression of tongue carcinoma

Key words: B-catenin – HPV- tongue carcinoma- Pcr

تحري تعبيرية b-catenin في سرطان شائك الخلايا لقاعدة اللسان الايجابي والسلبي تبعا للاصابة ب الفيروس الحليمي البشري (دراسة نسيجية مناعية)

الدكتور باسمة يوسف*

أحمد حمدان**

(تاريخ الإيداع 22 / 8 / 2017. قُبِلَ للنشر في 5 / 9 / 2017)

□ ملخّص □

تعتبر الفيروسات الحليمية البشرية من أخطر الفيروسات المسببة للاورام وخاصة العالية الخطورة منها . هذه الدراسة تصف التغيرات الجزيئية الحاصلة في جزيئات الربط في سرطان شائك الخلايا للسان وذلك من خلال سير الورم وتبعاً لحالة HPV.

المواد والطرق :

تم دراسة 48 عينة من سرطان شائك الخلايا من أرشيف قسم النسيج والتشريح المرضي للمرضى المراجعين لكلية طب الاسنان وتم توزيع العينات تبعاً للاصابة ب HPV كما تم دراسة التعبير النسيجي ل B-catenin ومقارنتها تبعاً لحالة HPV التي تم تحديدها باستخدام تقنية PCR . تم ايجاد علاقة بين التوضع النووي ل B-catenin و ايجابية ال HPV (0,03).

الاستنتاج : دراستنا توضح ان التوضع النووي لل b-catenin خلال مراحل الاصابة ب الفيروس قد يلعب دوراً هاماً في تطور الاورام البشرية للسان .

الكلمات المفتاحية: بيتا كاتينين - سرطانات اللسان - الفيروس HPV - تقنية PCR

* مدرسة - كلية طب الاسنان - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.
مشرف على الاعمال - كلية طب الاسنان - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

أهمية البحث و أهدافه :

-سرطان الخلايا الشائكة للفق والبلعوم: هوشكل شائع من السرطان البشري ومن اكثر الامراض الخبيثة وجودا في المجرى الهضمي والتنفسي. يتم تشخيص لاكثر من 300000 شخص جديد لديهم حالة المرض من كافة انحاء العالم.

ان الية غزو وانتقال الورم في الخلايا امر معقد جدا واستيعابه غير كامل.دراسات الخطوات الجزيئية والجينية، المتعلقة بتطور الورم ضرورية لتحسين المفاهيم التشخيصية ولايجاد استراتيجيات علاجية جديدة.

تعتبر الفيروسات الحليمية البشرية من العوامل المسببة للأورام البشرية السليمة والخبيثة .إن تأثير HPV ناتج لعمل مجموعتين من البروتينات الفيروسية (E6-E7). اللذين يثيطان وظيفيا نوعين من البروتينات (-PRB P53) مما يؤدي لفقدان لقدرة على تنظيم دورة حياة الخلية وفي حدوث طفرات و عدم استقرار كروموزومي . تعتبر منطقة البلعوم الفموي من أكثر المناطق تعرضا للإصابة بالفيروس HPV. حيث تبلغ نسبة الإصابة 3% من السرطانات في الولايا المتحدة .90% من السرطانات البلعوم الفموي هي سرطان شائك الخلايا وتحديدا في الحفرة الفموية . ولما لقاعدة اللسان أهمية تشريحية في الفم وارتفاع نسبة الافات قبيل السرطانية والسرطانية لمراجعي عيادات كلية طب الاسنان . تم إجراء هذا البحث لتقييم الالية الجزيئية لسرطان شائك الخلايا ممايساهم في غهم آلية سير المرض وإيجاد حلول للتشخيص المبكر للأفة.

يهدف البحث إلى إجراء تقييم للواسم البشري B-catenin لسرطانات قاعدة اللسان والتي تعتبر من الأجزاء التشريحية للبلعوم الفموي Oropharynx. وذلك لدراسة التغيرات الجزيئية لسرطان شائك الخلايا لقاعدة اللسان الايجابي والسليبي HPV . إن فهم الأسس الجزيئية في آلية حدوث السرطانات لاتزال غير واضحة . لذلك تهدف هذه الدراسة إلى دراسة إجراء تحليل نسيجي مناعي لواسم بشروي هو B-catenin وتحديد ه اعتمادا على حالة HPV التي تم تقييمها باستخدام تقنية PCR .

المواد والطرق :

تم اجراء دراسة ل(48) من العينات المحفوظة في أرشيف قسم النسيج والتشريح المرضي لمرضى المراجعين لكلية طب الأسنان في جامعة تشرين والمصابين بسرطان شائك الخلايا في قاعدة اللسان . وزعت العينات إلى مجموعتين بعد إجراء اختبار PCR لتحري حالة HPV. (25 +HPV -23 -HPV).

تم إجراء الدراسة المناعية لتحري ال B-catenin باستخدام المجموعات التالية :

- Avidin-biotin blocking kit (Vector laboratories, USA)
- Avidin-biotin complex-peroxidase labelled (Vector laboratories, USA)
- Diaminobenzidine (DAB) (DAKO.)

جميع المحاليل المستخدمة في الدراسة هي :

- ISopropanol)Merk ،Germany(
- Ethanol (JT-Baker ،Holland(
- Xylene (Merk, Germany(
- Protinase K (20mg/ml)(Gibco, Germany)

- Glycogen (Roche, Swizerland (
- **PBSBuffer** (10*) PH 7, 4 74 g Nacl
- 15, 8 Na₂hpo₄ *2H₂o
- 3,62g Nah₂po₄ * 2H₂o
- 800MI A.dest

المحاليل المستخدمة للدراسة المناعية :

- Ethanol (JT, Backer ,Holland(
- EDTA) Merk ,Germany(
- Glycerine gelatine Mounting Medium) Merk ,Germany(
- Hydrogen peroxide 30 % (Apotheke(
- Milk powder) Sigma ,Germany(
- Tris)Merk ,Germany(
- Xylene) Merk ,Germany(

الاضداد المستخدمة للدراسة المناعية لل B-catenin هي :

Manual method/DA B	minutes 5*3 (MW(citratePufferPH:6	1:500	BD-Becton Dickinson	Monoclon e mouse	β-Catenin
--------------------	-----------------------------------	-------	---------------------	------------------	------------------

• البادئات المستخدمة لل PCR :

SEQUENCE	Primer Name
TTT GTT A CTG TTG TTG A TAC TAC	GP5+ Forward
GAA TAT GAT TT A CAG TTT A TTTT C	GP6+(reverse)
ATG GAT GCC AAG GAG TTC GAA CC	HS1
TTC TCA GCT CCT GGC TCCT CAT C	HaD3c
GCC ATA ATT ACC TCC TCA GGC AC	HaD4
TCG AAC CTA AAG ACG TAT TGC CC	HS2

المحلول المستخدم لتحري HPV باستخدام PCR :

(Volume(μL	Products
2	DNA
12,5	Qiagen Mix *
9,5	H2O
0,5	Forward Primer
0,5	Reverse Primer

البرنامج المستخدم لل PCR :

15 د للمرحلة الاولى التمسح بدرجة حرارة 95

30 ثانية لدرجة الحرارة 94

90 ثانية لدرجة الحرارة 72 ل 45 دورة تتبع ب 10 د انهاء

النتائج والمناقشة :

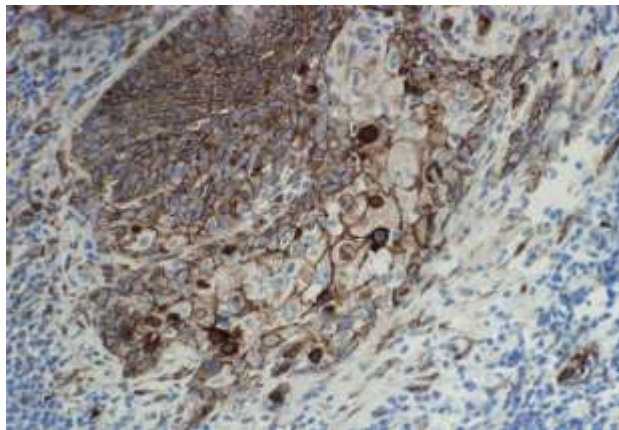
• دراسة نتائج التلوين النسيجي المناعي ل B-catenin :

• أظهرت النتائج تلوين إيجابي لعينات الأورام على الشكل التالي :

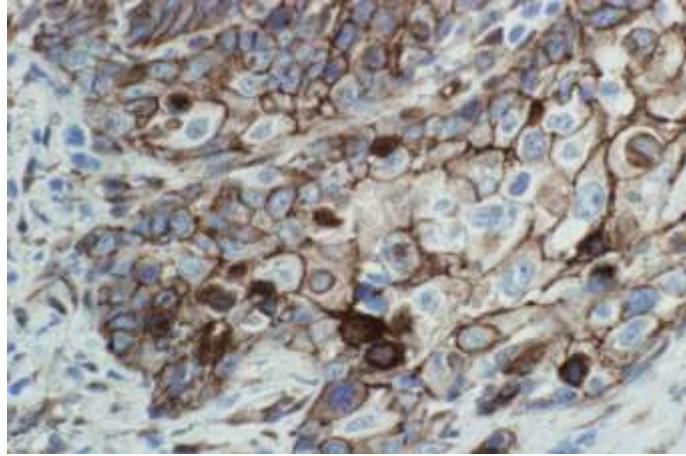
أظهرت الخلايا الورمية تلوينا إيجابيا للغشاء البلاسمي للخلايا بالإضافة إلى أن بعض الأنوية أظهرت تلوينا

إيجابيا . تم اعتماد عدة درجات للتقييم النسيجي وفقا للعدد الخلايا الايجابية بالساحة ونم عرضها بالجدول التالي :

	++ Normal expression	Overexpression +++	Isolated cells +	Negative -
عينات الورم	13	5	30	



شكل رقم (1) يظهر تلوين الغشاء البلاسمي للخلايا الورمية وتلون بعض الانوية



شكل رقم (2) : يظهر تلون الأنوية بشكل إيجابي

نتائج اختبار ال PCR :

نتائج تقييم حالة HPV باستخدام PCR	عدد عينات الورم
Negative سلي	21
Positive إيجابي	27

شكل ك1 يوضح توزيع العينات وفقا لحالة PCR



شكل 2: الدليل المستخدم لتحديد طول DNA ويقدر ب bP



شكل 3: يوضح نتائج ال PCR: تعتبر ايجابي عندما يكون الطول 142 bp



شكل 4: يوضح نتائج ال PCR: تعتبر ايجابي عندما يكون الطول 142 bp

total	HPV+	HPV-	β -catenin
15(100 %)	10 (66.7%)	5 (33.3%)	membranous
20(100 %)	7 (35%)	13 (65%)	membranous, nucleus
13 (100%)	10 (76.9)	3 (23.1%)	nucleus

شكل (5) : يوضح نتائج التلوين النسيجي المناعي تبعا لتوضعه غشائي أو نووي وذلك وفق لحالة HPV

المنافشة:

-للمؤشرات البروتينية البشرية تم اختيار الجزيئ المترابط B-catenin متعدد الوظائف .من جهة أولى فان له دور في البناء الرابط الخلوي ، عندما يتوضع في الغشاء ، ومن جهة ثانية يتعلق في إشارة الخلية والتأثير الانتقالي عندما يتوضع في بلازما الخلية أو في النواة .ان B-catenin ليس فقط بروتين هام مترابط مع الجزيئات البشرية بل أيضا يلعب دور هام في إشارات الخلية الداخلية .التي يمكن ان تعمل كمسبب للورم عندما تكون مرتبطة مع خلية

TCF4 جهة الارتباط في منطقة سايلين Cyclin D. اضافة الى سايلين cyclin D1 يمكن ان تتداخل جينات أخرى بعد ان تتمركز في النواة. لذلك جزيء B-catenin متعدد الوظائف وتعتمدتوظيفته حسي توضع في الخلية ف B-catenin السيئوبلازمي والنووي له دور في نقل اشارة Wnt-wingless وينظم من خلال بروتين APC وغلوكوجين كيناز. تقول بعض الدراسات ان نقص في تعبيرية B-catenin يوجد في كثرة في الاماكن الانتقالية للسرطان شائك الخلايا وهناك دراسات اخرى بينت ان الوظائف الاساسية لل B-catenin هي فقط الروابط بين الخلايا البشرية على عكس بعض الدراسات التي اعتبرته مؤشر تنبؤي لسرطان الصدر و البنكرياس.

Hpv هو عامل مسبب للورم وعلاقته مع B-catenin النووي وتحول موقعه من غشائي الى نووي على صلة قوية . من المعروف عن اورام الفم والبلعوم ان DNA الفيروس تتمركز في نواة الخلية المصابة التي تعمل بشكل انتقائي عندما اثنين من البروتينات (E6-E7) تكون موجودة. هذا يوضح نشاط HPV الذي يساهم في تحول B-catenin الى وظيفة نووية مما يسبب مرحلة مبكرة من حدوث EMT انقلاب خلوي بشروي ميزانثيمي. هنا تبين أن الاصابة ب HPV يغير السيطرة على دورة حياة الخلية أثناء توضع B-catenin في النواة وتدخله مع cyclin D مفتاح تنظيم طور G! من دورة حياة الخلية . فلمعرفة دور ال Cyclin D وعلاقته مع سرطانات الراس والعنق يحتاج للمزيد من الدراسات المستقبلية .

الاستنتاجات و التوصيات :

- 1- تصنف سرطانات البلعوم الفموي إلى إيجابية وسلبية تبعا للاصابة ب HPV
- 2- يحدث الاصابة بالفيروس HPV تغيرا في دورة حياة الخلية مسببا انتقال توضع ال B-catenin من الغشاء البلاسمي للنواة
- 3- يعتبر ال b-catenin واسم نوعي ودليل
- 4- يجب اجراء دراسات مستقبلية لمعرفة دور ال Cyclin D في السرطانات الفموية

المراجع :

1. Al Moustafa, A.E., W.D. Foulkes, N. Benlimame, A. Wong, L. Yen, J. Bergeron, G. Batist, L. Alpert, and M.A. Alaoui-Jamali, E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. *Oncogene*, 2004. 23(2): p8.-350 .
2. Araujo, V.C.d., Vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Oto- Rhinology*, 1993. 250(2): p109.-105 .
3. Asgeirsson, K.S., J.G. Jonasson, L. Tryggvadottir, K. Olafsdottir, J.R. Sigurgeirsdottir, S. Ingvarsson, and H.M. Ogmundsdottir, Altered expression of E-cadherin in breast cancer. patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer*, 2000. 36(9): p106.-1098 .
4. Begum, S., D. Cao, M. Gillison, M. Zahurak, and W.H. Westra, Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(16): p9.-5694 .
5. Begum, S., M.L. Gillison, M.A. Ansari-Lari, K. Shah, and W.H. Westra, Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(17): p75.-6469 .

- .6 Chen, R., L.M. Aaltonen, and A. Vaheri, Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol*, 2005. 15(6): p63.-351 .
- .7 D'Souza, G., A.R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W.M. Koch, W.H. Westra, and M.L. Gillison, Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007. 356(19): p56.-1944 .
- .8 de Castro, J., C. Gamallo, J. Palacios, G. Moreno-Bueno, N. Rodriguez, J. Feliu, and M. Gonzalez-Baron, beta-catenin expression pattern in primary oesophageal squamous cell carcinoma. Relationship with clinicopathologic features and clinical outcome. *Virchows Arch*, 2000. 437(6): p604.-599 .
- .9 Gabbert HE, M.W., Schneiders A, Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int JCancer* 1996;69:184-9., 1996.
- .10 Georgolios, A., A. Batistatou, L. Manolopoulos, and K. Charalabopoulos, Role and expression patterns of E-cadherin in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Exp Clin Cancer Res*, 2006. 25(1): p14.-5 .
- .11 Ghosh, S., H.G. Munshi, R. Sen, L.A. Linz-McGillem, R.D. Goldman, J. Lorch, K.J. Green, J.C. Jones, and M.S. Stack, Loss of adhesion-regulated proteinase production is correlated with invasive activity in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2002. 95(12): p33.-2524 .
- .12 Gillison, M.L., W.M. Koch, R.B. Capone, M. Spafford, W.H. Westra, L. Wu, M.L. Zahurak, R.W. Daniel, M. Viglione, D.E. Symer, K.V. Shah, and D. Sidransky, Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(9): p20.-709 .
- .13 Gillison, M.L. and K.V. Shah, Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003(31): p65.-57 .
- .14 Gillison, M.L. and K.V. Shah, Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*, 2001. 13(3): p-183 .
8.
- .15 Goldenberg D, G.A., Joachims HZ, The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head Neck*, 2003. 25.(7): p601.-595:.
- .16 Gruttgen, A., M. Reichenzeller, M. Junger, S. Schlien, A. Affolter, and F.X. Bosch, Detailed gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers. *J Pathol*, 2001. 194(3): p7.-311 .
- .17 Hafkamp, H.C., J.J. Manni, and E.J. Speel, Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol*, 2004. 124(4): p6.-520 .
- .18 Hafkamp, H.C., E.J. Speel, A. Haesevoets, F.J. Bot, W.N. Dinjens, F.C. Ramaekers, A.H. Hopman, and J.J. Manni, A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer*, 2003. 107(3): p400.-394 .
- .19 Harrison, *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach*. 2nd ed. 2004: p ,2004 .pp 306-51.
- .20 Herrero, R., X. Castellsague, M. Pawlita, J. Lissowska, F. Kee, P. Balaram, T. Rajkumar, H. Sridhar, B. Rose, J. Pintos, L. Fernandez, A. Idris, M.J. Sanchez, A. Nieto, R. Talamini, A. Tavani, F.X. Bosch, U. Reidel, P.J. Snijders, C.J. Meijer, R. Viscidi, N. Munoz, and S. Franceschi, Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(23): p .

83.-1772

.21 Hoffmann, T.K., C. Arsov, K. Schirlau, M. Bas, U. Friebe-Hoffmann, J.P. Klussmann, K. Scheckenbach, V. Balz, H. Bier, and T.L. Whiteside, T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer*, 2006. 118(8): p91.-1984.

.22 Karsai, S., U. Abel, M. Roesch-Ely, A. Affolter, C. Hofele, S. Joos, P.K. Plinkert, and F.X. Bosch, Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. *J Pathol*, 2007. 211(3): p22.-314.

.23 Kim, D.H., H.H. Nelson, J.K. Wiencke, S. Zheng, D.C. Christiani, J.C. Wain, E.J. Mark, and K.T. Kelsey, p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2001. 61(8): p24.-3419.

.24 Klaes, R., T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Dallenbach-Hellweg, D. Schmidt, and M. von Knebel Doeberitz, Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, 2001. 92(2): p84.-276.

.25 Klussmann, J.P., Expression of p16 Protein Identifies a Distinct Entity of Tonsillar Carcinomas Associated with Human Papillomavirus. *American Journal of Pathology*, 2003. 162(3).

.26 Klussmann, J.P., S. Dinh, O. Guntinas-Lichius, C. Wittekindt, S. Weissenborn, U. Wieland, H.P. Dienes, T. Hoffmann, E. Smith, L. Turek, E.J. Speel, and H.J. Pfister, [HPV-associated tonsillar cancer. An update]. *Hno*, 2004. 52(3): p18.-208.

.27 Klussmann, J.P., S.J. Weissenborn, U. Wieland, V. Dries, H.E. Eckel, H.J. Pfister, and P.G. Fuchs, Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol*, 2003. 192(3): p32.-129.

.28 Koskinen, W.J., K. Brondbo, H. Mellin Dahlstrand, T. Luostarinen, T. Hakulinen, I. Leivo, A. Molijn, W.G. Quint, T. Roysland, E. Munck-Wikland, A.A. Makitie, I. Pyykko, J. Dillner, A. Vaheri, and L.M. Aaltonen, Alcohol, smoking and human papillomavirus in laryngeal carcinoma: a Nordic prospective multicenter study. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007. 133(9): p8.-673.

.29 Kovacs A, D.J., Walker RA, Expression of Pcadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *Mol Pathol*, 2003. 56: p22.-318.

.30 Kreimer, A.R., G.M. Clifford, P. Boyle, and S. Franceschi, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. 14(2): p75.-467.

.31 Kudo, Y., S. Kitajima, I. Ogawa, M. Hiraoka, S. Sargolzaei, M.R. Keikhaee, S. Sato, M. Miyauchi, and T. Takata, Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(16): p63.-5455.

.32 Kumar, R.V., S.S. Kadkol, R. Daniel, A.M. Shenoy, and K.V. Shah, Human papillomavirus, p53 and cyclin D1 expression in oropharyngeal carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2003. 32(5): p43.-539.

.33 Li, W., C.H. Thompson, Y.E. Cossart, C.J. O'Brien, E.B. McNeil, R.A. Scolyer, and B.R. Rose, The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck*, 2004. 26(1): p9.-1.

.34 Lipponen P, S.E., Ji H., Lipponen P, Saarelainen E, Ji H, et al. Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer.

JP athol 1994;174:101-9., 1994.

.35 Lydiatt, W.M., B.J. Davidson, S.P. Schantz, S. Caruana, and R.S. Chaganti, 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer. *Head Neck*, 1998. 20(2): p8.-113 .

.36 M Heatley, C.W., P Maxwell, P Toner, Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *J Clin Pathol*, 1993. 46: p445.-441 .

.37 Mahomed, F., M. Altini, and S. Meer, Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis*, 2007. 13(4): p92.-386 .

.38 Mannic, L.-A.v.d.V.H.E.S.J.J. and F.C.S.R.W. Kuijperse, Expression of Cytokeratin Subtypes and Vimentin in Squamous Cell Carcinoma of the Floor of the Mouth and the Mobile Tongue. *Otorhinolaryngol Nova* 2001;11:186-192, 2001.

.39 Mellin Dahlstrand, H., D. Lindquist, L. Bjornestal, A. Ohlsson, T. Dalianis, E. Munck-Wikland, and G. Elmberger, P16(INK4a) correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res*, 2005. 25(6C): p83.-4375 .

.40 Meyers, A., <http://www.oto.theclinics.com/article/PIIS0030666505001696/fulltext>. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 2006. Volume 39(Issue 2): p .Pages 229-402.

.41 Mork, J., A.K. Lie, E. Glatte, G. Hallmans, E. Jellum, P. Koskela, B. Moller, E. Pukkala, J.T. Schiller, L. Youngman, M. Lehtinen, and J. Dillner, Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 2001. 344(15): p31.-1125 .

.42 Munger, K., The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci*, 2002. 7: p .d641-9.

.43 Munger K, H., Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 2002. 89: p228.-213 .

.44 Munoz N, B.F., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348: p527.-518 .

.45 Onoue, T., D. Uchida, N.M. Begum, Y. Tomizuka, H. Yoshida, and M. Sato, Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2006. 29(5): p-1133 . 8.

.46 Rajasekaran, J.J.C.a.A.K., Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: (17). September 1, 2006, 2006.

.47 Rawnsley, J.D., E.S. Srivatsan, R. Chakrabarti, K.R. Billings, and M.B. Wang, Deletion analysis of the p16/CDKN2 gene in head and neck squamous cell carcinoma using quantitative polymerase chain reaction method. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1997. 123(8): p7.-863 .

.48 Reed, A.L., J. Califano, P. Cairns, W.H. Westra, R.M. Jones, W. Koch, S. Ahrendt, Y. Eby, D. Sewell, H. Nawroz, J. Bartek, and D. Sidransky, High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 1996. 56(16): p3.-3630 .

.49 Reimers, N., H.U. Kasper, S.J. Weissenborn, H. Stutzer, S.F. Preuss, T.K. Hoffmann, E.J. Speel, H.P. Dienes, H.J. Pfister, O. Guntinas-Lichius, and J.P. Klusmann, Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*, 2007. 120(8): p8.-1731 .

- .50 Ringstrom, E., E. Peters, M. Hasegawa, M. Posner, M. Liu, and K.T. Kelsey, Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(10): p92.-3187.
- .51 Rosenquist, K., J. Wennerberg, K. Annertz, E.B. Schildt, B.G. Hansson, A. Bladstrom, and G. Andersson, Recurrence in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: human papillomavirus and other risk factors. *Acta Otolaryngol*, 2007. 127(9): p7.-980.
- .52 Rosivatz, E., I. Becker, M. Bamba, C. Schott, J. Diebold, D. Mayr, H. Hofler, and K.F. Becker, Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*, 2004. 111(5): p9.-711.
- .53 Stambuk, H.E., S. Karimi, N. Lee, and S.G. Patel, Oral cavity and oropharynx tumors. *Radiol Clin North Am*, 2007. 45(1): p20.-1.
- .54 Syrjanen, S., HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*, 2004. 57(5): p55.-449.
- .55 Tanaka, N., Expression of E-cadherin, a-catenin, and b-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2003. 89: p563. – 557.
- .56 van der Velden LA, S.H., Manni JJ, Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Otorhinolaryngol Nova*, 1997. 254: p.383–376.
- .57 Velden, L.-A.v.d., Expression of Cytokeratin Subtypes and Vimentin in Squamous Cell Carcinoma of the Floor of the Mouth and the Mobile Tongue. *Otorhinolaryngol Nova*, 2001. 11: p192.–186.
- .58 Venuti, A., G. Badaracco, C. Rizzo, B. Mafera, S. Rahimi, and M. Vigili, Presence of HPV in head and neck tumours: high prevalence in tonsillar localization. *J Exp Clin Cancer Res*, 2004. 23(4): p6.-561.
- .59 von Knebel Doeberitz, M., New molecular tools for efficient screening of cervical cancer. *Dis Markers*, 2001. 17(3): p8.-123.
- .60 Weinberger, P.M., Z. Yu, B.G. Haffty, D. Kowalski, M. Harigopal, C. Sasaki, D.L. Rimm, and A. Psyrrri, Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(17): p91.-5684.
- .61 Wijnhoven BPL, D.W., Pignatelli M., E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*, 2000. 87: p1005.-992.
- .62 Wittekindt, C., E. Gultekin, S.J. Weissenborn, H.P. Dienes, H.J. Pfister, and J.P. Klussmann, Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol*, 2005. 62: p80.-72.
- .63 Yu-Jun Li, X.-R.J., Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2003. 9(2): p372.-368.
- .64 Yu, Z., P.M. Weinberger, E. Provost, B.G. Haffty, C. Sasaki, J. Joe, R.L. Camp, D.L. Rimm, and A. Psyrrri, beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(7): p7.-2471.
- .65 Yuen, P.W., M. Man, K.Y. Lam, and Y.L. Kwong, Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*, 2002. 55(1): p.60-58.