

Humane Papillomviren und maligne Speicheldrüsenneoplasien

- Eine retrospektive Studie an Gewebeproben -

Aus der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Dr. Peter Sieg

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
Doktor der Medizin (Dr. med.)

der

Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Nis-Oke Andresen

aus Flensburg

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Sieg

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Priv.-Doz. Ewan Langan Ph.D.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.12.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.5
1.1. Einführung in die Speicheldrüsenanatomie und -physiologie	S.6
1.2. Speicheldrüsenneoplasien im Allgemeinen	S.8
1.3. Humane Papillomviren (HPV) und Kanzerogenität	S.11
1.4. Rolle der HP-Viren in der Entstehung von Kopf- Halstumoren	S.14
1.5. Rolle der HP-Viren in der Entstehung von Speicheldrüsentumoren	S.16
1.6. Fragestellung	S.18
2. Material und Methoden	S.19
2.1. Patientenkollektiv und Tumorproben	S.19
2.2. Probengewinnung und -umfang	S.20
2.3. Extraktion, Aufreinigung, PCR und Nachweis von HPV-DNA	S.20
2.4. Statistische Auswertung	S.28
3. Ergebnisse	S.29
3.1. Deskriptive Statistik der eingeschlossenen Fälle	S.29
3.2. HPV-Nachweis in malignen Speicheldrüsenneoplasien	S.32
4. Diskussion	S.35
5. Zusammenfassung	S.44
6. Literaturverzeichnis	S.45
7. Danksagung	S.48
8. Anhang	S.49

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Histologie der großen Speicheldrüsen	S.7
Tab. 2: Klassifikation maligner Speicheldrüsentumore	S.9
Tab. 3: Auswahl der Studien zum Thema HPV und Speicheldrüsenneoplasien	S.18
Tab. 4: Verteilung der Lokalisationen der Speicheldrüsentumore	S.31
Tab. 5: Altersverteilung der Kohorte	S.31
Tab. 6: Auswertung der Chipron HPV 3.5 Chips	S.32
Tab. 7: Nachweisgrenzen einzelner HPV-Subtypen	S.33

Abbildungsverzeichnis

Grafik 1: Anatomie der großen, paarigen Kopfspeicheldrüsen	S.6
Grafik 2: Lymphknotenlevel des Halses nach Robbins	S.10
Grafik 3: Aufbau und Funktion des Genoms humaner Papillomviren	S.12
Grafik 4: Einfluss der Early-Genes auf p53 und Rb	S.14
Grafik 5: Prinzip der DNA-Aufreinigung	S.22
Grafik 6: Auszug der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese am Qiaxcel Advanced	S.23
Grafik 7: Testprinzip des HPV 3.5 LCD Arrays	S.24
Grafik 8: Darstellung der eingelesenen HPV-Chips	S.26
Grafik 9: Einzelauswertung der HPV-Subtypenanalyse	S.27
Grafik 10: Array-Pattern des Chipron HPV 3.5 LCD Arrays	S.28
Diagramm 1: Häufigkeitsverteilung der malignen Speicheldrüsentumore	S.29
Diagramm 2: Anzahl eingeschlossener Fälle maligner Speicheldrüsentumoren pro Jahr	S.30

1. Einleitung

„Die Entwicklung aller Speicheldrüsen erfolgt aus der ektodermalen Mundbucht durch solide Epithelprossen der Mundschleimhaut.“⁴⁸

Mit diesem Zitat impliziert Seifert im Jahr 1996, dass sich Mundschleimhaut und Speicheldrüsen nicht nur aus anatomischer Sicht sehr nahestehen, sondern embryologisch aus denselben Vorläuferzellen der ektodermalen Mundbucht hervorgehen.

Wäre es nicht folgerichtig anzunehmen, dass maligne Veränderung dieser beiden Gewebe eine verwandte Genese aufweisen?

Bereits 1983 berichteten Syrjänen et al. über einen möglichen Zusammenhang einer Infektion mit humanen Papillomviren und der Onkogenese oropharyngealer Karzinome.⁵³

In Hinblick auf diese Karzinome ist heute bekannt, dass humane Papillomviren (HPV) ein Initiator der Karzinogenese dieser Tumorentitäten sein können.⁴⁰

Die Ätiologie der Speicheldrüsenkarzinome ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. Zwar lassen sich einigen Speicheldrüsenneoplasien bestimmte Risikofaktoren, wie z.B. Alter, Nikotinabusus und Strahlenexposition zuweisen³³, jedoch ist ein kausaler Pathomechanismus bisher nicht gesichert.

Die anatomische Nähe und embryologische Entwicklung mit starken Gemeinsamkeiten zu Mundschleimhautepithel machen es durchaus naheliegend, Gemeinsamkeiten in der malignen Entartung dieser Gewebe anzunehmen.

Hinsichtlich humaner Papillomviren herrscht ein genereller Konsens bezüglich ihrer Rolle bei der Entstehung oropharyngealer Karzinome, jedoch lässt sich dies bisher nicht für maligne Speicheldrüsenkarzinome belegen. Ebenso wenig lässt sich sagen, inwiefern HP-Viren die Prognose der jeweiligen Neoplasien beeinflussen, wohingegen bekannt ist, dass HPV-induzierte oropharyngeale Karzinome mit einer quod vitam günstigeren Prognose einhergehen.²²

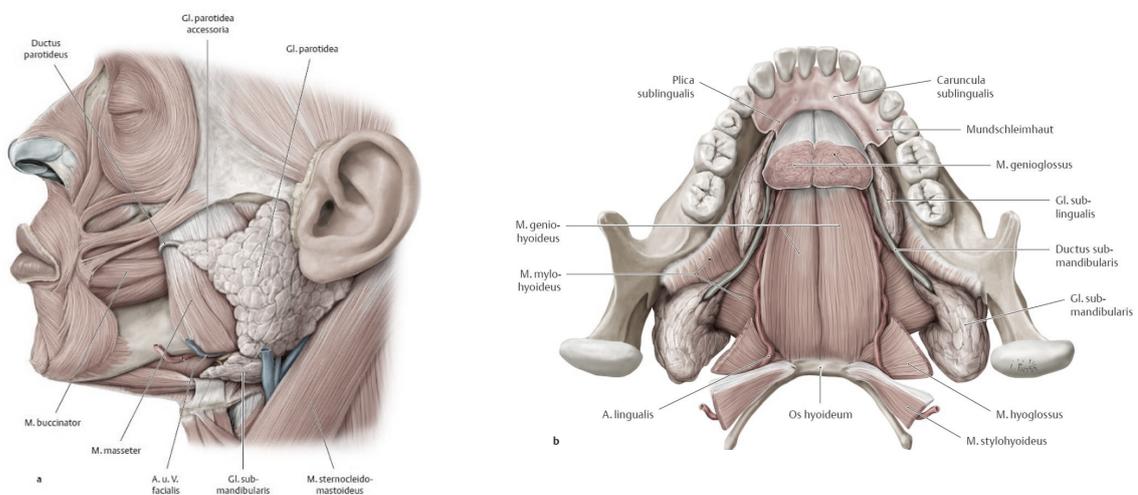
Diese Dissertation widmet sich der Frage, ob und inwieweit der Einfluss humaner Papillomviren auf die Genese maligner Speicheldrüsenneoplasien nachzuweisen ist.

1.1 Einführung in die Speicheldrüsenanatomie und -physiologie

Die Kopfspeicheldrüsen umfassen die paarigen großen Speicheldrüsen (Glandulae salivariae majores), welche in Glandula parotidea (Ohrspeicheldrüse), Gl. submandibularis (Unterkieferspeicheldrüse) und Gl. sublingualis (Unterzungenspeicheldrüse) unterteilt werden. Daneben gibt es zahlreiche kleine Speicheldrüsen (Gll. Salivariae minores) an Lippeninnenseite (Gll. labiales), Wange (Gll. buccales), Gaumen (Gll. palatinae) und der Zunge (Gll. linguales).⁴⁶

In nachfolgender Grafik 1 ist die Anatomie der großen Speicheldrüsen dargestellt:

Grafik 1: Anatomie der großen, paarigen Kopfspeicheldrüsen:



Große Kopfspeicheldrüsen von lateral (links) und kranial (rechts). Grafik übernommen aus: Schünke M, Schulte E, Schumacher U. in Pro-metheus. LernaAtlas der Anatomie, Kopf- und Neuroanatomie (S. 112), Georg Thieme Verlag KG Stuttgart (2006)⁴⁴

Sie entwickeln sich zwischen der 6. und 7. Embryonalwoche aus der ektodermalen Mundbucht durch solide Epithelsprossen der Mundschleimhaut.^{1,48}

Die Ohrspeicheldrüse entwickelt sich aus einer ektodermalen Knospe, welche in das anliegende Mesenchym vorwächst. Dadurch entstehen Zellverbände mit kolbenartig verdickten Enden. In den Zellverbänden der späteren Ausführungsgänge treten Lumina auf und die Enden differenzieren sich zu sezernierenden Endstücken. Interstitielles Gewebe und Kapsel entstehen aus dem umliegenden Mesenchym.

Die Unterkieferspeicheldrüse entsteht, indem Zellverbände aus dem Mundbodenepithel nach dorsal und lateral wachsen. Die Differenzierung ähnelt der der Ohrspeicheldrüse. Der laterale Zellverband wird zum Ausführungsgang.

Die Unterzungenspeicheldrüse entwickelt sich analog zu den oben genannten Speicheldrüsen durch zahlreiche Aussprossungen aus dem Mundbodenepithel im Bereich des Zungenbandes.^{1,13}

Eine Übersicht über die Histologie der großen Speicheldrüsen wird nachfolgend in Tab. 1 dargestellt.

Tab.1: *Histologie der großen Speicheldrüsen*

<i>Gl. parotidea</i> (serös)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Beerenförmige Azini als sezernierende Endstücke, Schaltstücke mit niedrigem, einschichtigem Epithel, Streifenstücke mit einreihigem kubischen Epithel ▪ Interlobuläre Ausführungsgänge mit 2-reihigem hochprismatischem Epithel ▪ Ductus parotideus mit mehrschichtigem Zylinderepithel und Becherzellen (Mündung: Plattenepithel)
<i>Gl. submandibularis</i> (seromukös)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muköse Tubuli mit serösen Halbmonden (von-Ebner- Halbmonde) ▪ Schaltstücke, zahlreiche lange Streifenstücke ▪ Interlobuläre Ausführungsgänge mit hochprismatischem Epithel ▪ Ductus submandibularis (mehrreihig bis mehrschichtig angeordnete zylindrische Gangepithelien; Mündung: Plattenepithel)
<i>Gl. sublingualis</i> (mukoserös)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muköse Tubuli mit serösen Halbmonden (häufiger als in der Gl. submandibularis) ▪ Wenige Schaltstücke bei Überwiegen der mukösen Tubuli, wenige kurze Streifenstücke ▪ Interlobuläre Ausführungsgänge mit hochprismatischem Epithel ▪ Ductus sublingualis major

Anm. Eigene Darstellung, Inhalte übernommen und ergänzt aus Bisdas et al. Kopfspeicheldrüsen. In: Reiß M. (eds) Facharztwissen HNO-Heilkunde. Springer, Berlin, Heidelberg; 2009¹ sowie Lüllmann-Rauch R, Asan E. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag; 2015³⁰

Zusammen produzieren die Speicheldrüsen ca. 500-1500ml Speichel am Tag. Dabei tragen die verschiedenen Speicheldrüsen einen unterschiedlichen Anteil zur Bedarfs- und Ruhesekretion bei.²⁹ Die kleinen Speicheldrüsen, ebenso wie die Gl. sublingualis, produzieren überwiegend mukösen Speichel. Die Gl. parotidea produziert ausschließlich serösen Speichel, die Gl. submandibularis produziert diesen überwiegend.⁵²

Die Ruhesekretion des Speichels stellt die permanente Befeuchtung der Mund- und Pharynxschleimhaut sicher. Die Bedarfssekretion dient einerseits der Erleichterung des Schluckens von Nahrung, andererseits enthält der Speichel Verdauungsenzyme sowie antibakterielle Substanzen und Antikörper zur Immunabwehr.³⁵ Angeregt wird der Speichelfluss durch

parasympathische Fasern aus dem Nervus facialis (Gll. submandibularis et sublingualis) sowie dem Nervus glossopharyngeus (Gl. parotidea).²³ Die Bedarfssekretion kann die Ruhesekretion um ein vielfaches übersteigen.

Die Gl. Parotidea ist über ihren ca. 3-5cm langen Ausführungsgang, den Ductus parotideus (Stenongang) mit der Mundhöhle verbunden. Dieser mündet gegenüber des zweiten oberen Molaren in der Papilla parotidea in das vestibulum oris.

In die Gl. parotidea eingebettet liegt der N. facialis mit seinem Plexus intraparotideus. Von dort aus zieht er mit seinen motorischen Ästen radiär in die Gesichtsmuskulatur. Er unterteilt die Drüse in einen lateralen und medialen Anteil.

Die Gll. submandibularis et sublingualis münden mit ihren Ausführungsgängen, dem Ductus submandibularis (Wharton-Gang) und Ductus sublingualis, auf der Caruncula sublingualis, lateral des Zungenbändchens.⁹

1.2 Speicheldrüsenneoplasien im Allgemeinen

Speicheldrüsenneoplasien machen ca. 3-5% der Kopf-Hals-Tumore aus. Der Erkrankungsgipfel liegt im 5. Lebensjahrzent.^{57,18} Die Geschlechterverteilung variiert je nach geographischer Region, eine eindeutige Tendenz bezüglich der Geschlechterpräferenz kann nicht getroffen werden.^{18,45} Den Großteil bilden epitheliale Tumore, wobei sich die meisten in der Gl. parotis befinden (ca. 80%), darauf folgt die Gl. submandibularis, die kleinen Speicheldrüsen und zu allerletzt die Gl. sublingualis. Der prozentuale Anteil der malignen Tumore hingegen nimmt von der Gl. parotis über die Gll. submandibularis/sublingualis bis hin zu den kleinen Speicheldrüsen zu.³

Das Verhältnis von benignen zu malignen Neoplasien beträgt gemittelt ca. 2:1, wobei in der Gl. Parotis ca. 4 von 5 Neoplasien benigne sind. In den Unterkiefer- sowie den kleinen Speicheldrüsen hingegen ist das Verhältnis ca. 1:1.²⁶

Die häufigsten benignen Neoplasien sind das pleomorphe Adenom (ca. 50%) und der Warthin-Tumor (ca. 25%, auch Zystadenolymphom genannt).¹⁵

Bei den malignen Speicheldrüsentumoren sind das Mukoepithelkarzinom sowie das Adenoid-Zystische Karzinom (ACC) und das Azinuszellkarzinom die häufigsten Varianten.¹⁸ Sie zeichnen sich durch infiltratives Wachstum und teils frühe Metastasierung aus. Das Mukoepithelkarzinom tritt am häufigsten in der Glandula parotis auf, wohingegen das Adenoid-Zystische-Karzinom vermehrt in der Glandula submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen vorkommt.⁵ Low-grade Karzinome haben eine bessere Prognose quod vitam als high-grade Neoplasien, welche ein erhöhtes Risiko für lokoregionäre sowie Fernmetastasierung aufweisen.

Bei den Speicheldrüsentumoren handelt es sich teilweise um sehr seltene Malignome mit unterschiedlichen histologischen Differenzierungen, deren Klassifikation in den letzten 50 Jahren häufige Änderungen erfahren hat und in ihrer Diversität wohl ungleich jedem anderen Organ ist.⁴⁷ „ Ihre morphologische Variabilität mit bis zu 30 verschiedenen Entitäten stellt den Pathologen stets vor eine besondere diagnostische Herausforderung (...)“⁴⁵

Einen Überblick über maligne Speicheldrüsentumoren gibt nachfolgend Tabelle 2:

Tab. 2: *Klassifikation maligner Speicheldrüsentumore (Auswahl, WHO 2017)*

Tumorentität	M-Nummer
Mukoepidermoidkarzinom	8430/3
Adenoid-Zystisches Karzinom	8200/3
Azinuszellkarzinom	8550/3
Polymorphes low-Grade Adenokarzinom	8525/3
Clear-Cell Carcinoma	8310/3
Basalzell-Adenokarzinom	8147/3
Adenokarzinom NOS	8140/3
Speichelgangs-Karzinom	8500/3
Myoepitheliales Karzinom	8982/3
Epithelial-Myoepitheliales Karzinom	8562/3
Karzinom ex pleomorphes Adenom	8941/3
Sekretorisches Karzinom	8502/3
Lymphoepitheliales Karzinom	8082/3
Plattenepithelkarzinom	8070/3
Onkozytisches Karzinom	8290/3

Anm.: Eigene Darstellung, Inhalte ausgewählt aus: WHO Classification of Head and Neck Tumours (2017)¹²

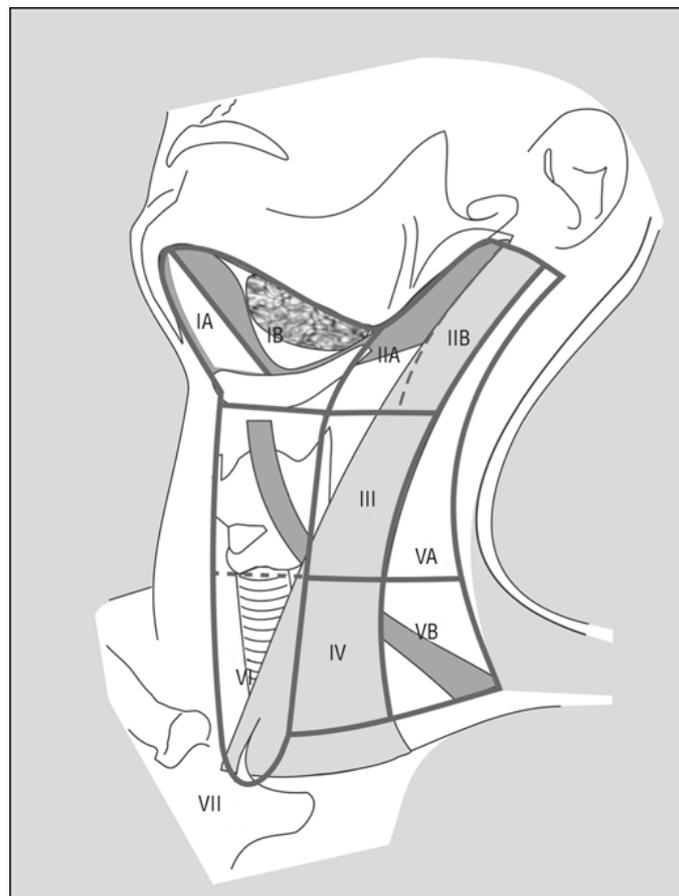
Am Anfang der Diagnostik von Speicheldrüsentumoren steht die ausführliche Anamneseerhebung und körperliche Untersuchung. Hierbei lässt sich beispielsweise eine Schwellung der betroffenen Drüse tasten. Die Palpation lässt zusätzlich eine Aussage zur Konsistenz, Größe und Verschieblichkeit der Geschwulst zu. Sie liefert zudem Hinweise auf eine Lymphknotenbeteiligung. Die Sonographie stellt die primäre bildgebende Diagnostik dar. Weiterführende Aussagen zur Tiefenausdehnung und Infiltration sowie Lymphknotenbeteiligung können die Computertomographie und/oder die Magnetresonanztomographie liefern. Ferner dient eine Sonographie von Hals und Abdomen, eine Computertomographie (CT) des Halses und eine Röntgenuntersuchung oder eine Computertomographie des Thorax der weiteren Ausbreitungsdiagnostik.⁵⁷

In der Therapie maligner Speicheldrüsentumoren kommt meist die chirurgische Resektion des Primärtumors zum Einsatz. Dabei richtet sich die Radikalität der Resektion nach Malignitätsgrad und Ausdehnung des Tumors. „Eindeutige Angaben zum Sicherheitsabstand existieren nicht“. ¹⁴ Der Nervus Facialis sollte bei Resektion von Parotistumoren nach Möglichkeit immer erhalten werden. ⁷

„Grundsätzlich ist bei der Abwägung der Radikalität [...] zu bedenken, dass in vielen Fällen [...] das Überleben häufig nicht durch das lokale Tumorwachstum, sondern durch die Metastasierung bestimmt ist.“ ¹⁴

Bei Primärtumoren mit positivem Lymphknotenstatus, fortgeschrittenem Tumorstadium, oder Tumoren mit erhöhtem Risiko für okkulte Metastasen sollte die Ausräumung der Halslymphknoten (Neck-Dissection) angewandt werden. ⁵⁶ Das Vorgehen der Neck-Dissection orientiert sich anhand der Halslymphknotenlevel nach Robbins, welche in 6 Level eingeteilt werden. In der nachfolgenden Grafik 2 sind die Level nach Robbins dargestellt. ⁴²

Grafik 2: Lymphknotenlevel des Halses nach Robbins



Anmerkung: Grafik übernommen aus Psychogios G. Zervikale Lymphknotendisektion bei Schilddrüsenkarzinomen. 2013 ³⁸

Dabei ist der Nutzen einer elektiven Neck-Dissektion bei klinischem N0-Status ein umstrittenes Thema.¹⁴ In einem 2018 veröffentlichtem Artikel von Byrd et al. wird letztendlich von einer routinemäßigen Anwendung einer elektiven Neck-Dissection abgeraten, jedoch kann bei hochgradigem intraoperativem Verdacht auf Grund der anatomischen Nähe zu den Leveln Ib, II und III bei einer Parotidektomie eine Lymphknotenausräumung dieser Kompartimente mit in die Resektion einbegriffen werden.⁵

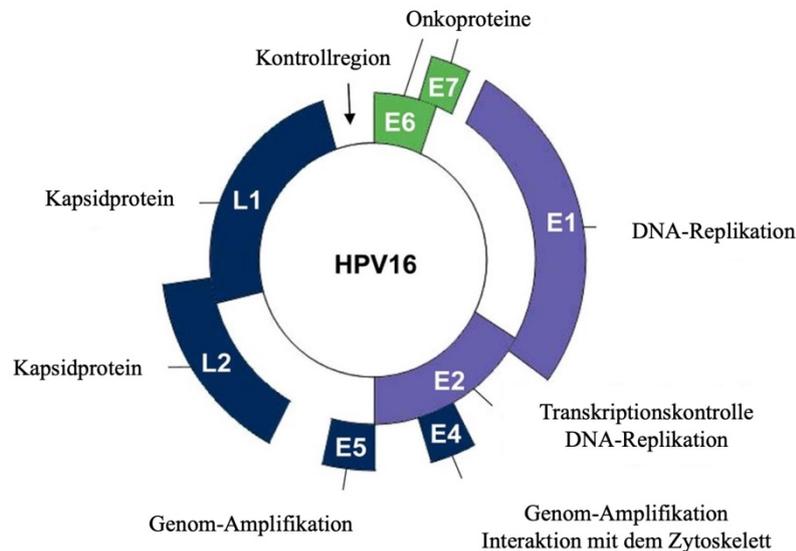
Bei high-grade Karzinomen, fortgeschrittenen low-grade Karzinomen, bei knappen Resektionsrändern oder Infiltration des Nervus facialis und des Knochens sowie bei Tumorrezidiven kann eine adjuvante Radiotherapie indiziert sein, jedoch hat die überwiegende Anzahl der Speicheldrüsenmalignome nur eine eingeschränkte Strahlensensibilität. Bei nichtoperablen Tumoren oder schlechtem Allgemeinzustand des Patienten kann eine kombinierte Radio-Chemotherapie im Rahmen eines palliativen Ansatzes verfolgt werden. Der Krankheitsverlauf ist jedoch auch nur eingeschränkt durch Chemotherapeutika zu beeinflussen. Die gezielte antikörperbasierte Therapie (Immuntherapie, targeted Therapy) ist derzeit Gegenstand der Forschung.^{56,14}

Die chirurgische Entfernung gutartiger Speicheldrüsenneoplasien hingegen ist ungleich leichter als die der malignen Tumore gleichen Ausmaßes und Lokalisation. „Totale, laterale und partielle laterale Parotidektomien sind etabliert, werden heute aber überwiegend nachrangig zur extrakapsulären Dissektion als dem Verfahren der 1. Wahl gesehen.“¹⁵

1.3 Humane Papillomviren (HPV) und Kanzerogenität

Die Gruppe der humanen Papillomviren, welche den Papillomaviridae zuzuordnen sind, umfasst zum jetzigen Zeitpunkt laut dem international HPV Reference Center des schwedischen Karolinska Institutet mehr als 200 humanpathogene Subtypen, welche in der Lage sind, Epithelien zu infizieren.¹⁰ Es handelt sich um unbehüllte Doppelstrang-DNA-Viren mit einem circa 8000 Basenpaaren umfassenden Genom. Das Genom kann in drei strukturelle Bereiche unterteilt werden: Die Struktur- und Regulatorproteine E1-E7 (auch „early-genes“ genannt), die Kapsidproteine L1 und L2 (auch „late-genes“ genannt) und die Kontrollregion (LCR). Der Aufbau des Virusgenoms sowie die wesentlichen Funktionen der jeweiligen Bereiche ist in Grafik 3 schematisch dargestellt.

Grafik 3: Aufbau und Funktion des Genoms humaner Papillomviren



Aufbau und Funktion des HPV-Genoms am Beispiel von HPV16: Übernommen und verändert aus D'Abramo, C & Archambault, J. (2011). Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. The open virology journal. 5. 80-95. 10.2174/1874357901105010080.⁸

Man spricht von unterschiedlichen HPV-Subtypen, wenn die L1-Nukleotidsequenz sich um mindestens 10% von jedem anderen HPV-Subtypen unterscheidet.⁴⁰ HPV-Subtypen werden in mukosale und dermale Typen unterteilt. Nach der Fähigkeit epitheliale Zellen maligne zu transformieren, werden high-risk von low-risk Typen unterschieden. Mukosale Typen, die in vielen präkanzerösen und kanzerösen Läsionen gefunden wurden, werden als high-risk Subtypen bezeichnet. Dazu zählen die HPV-Typen 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70 und 82. Zu den low-risk Typen werden 2a, 6, 7, 11, 13, 27, 34, 42, 43, 44, 55, 57 und 73 gerechnet. Humane Papillomviren infiltrieren undifferenzierte Basalzellen der Epithelien, nachdem diese beispielsweise ein Trauma oder eine kleinere Erosion erfahren haben. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Viren in einer geringen Anzahl vor. Ermöglicht wird die Infektion durch spezifische Rezeptoren. Vermutet wird am ehesten der Syndecan-1-Rezeptor, welcher in traumatisierten Epithelien überexprimiert vorliegt.⁵¹ Daraufhin kommt es zur DNA-Replikation und es werden mehr als 1000 Kopien pro Zelle hergestellt.

Die reifen Viruspartikel werden bis zur obersten Epithelschicht (Str. superficiales) transportiert und dort liberiert, wodurch weitere Epithelien infiziert werden können und eine Übertragung des Virus ermöglicht wird.⁴⁰

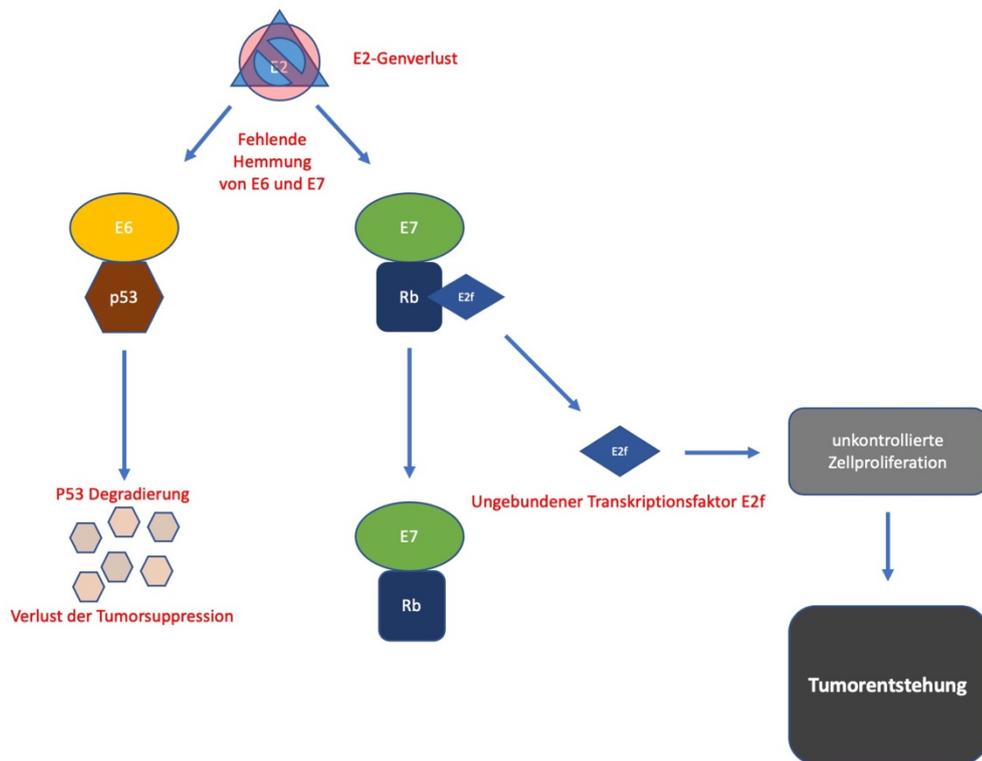
Nur ein kleiner Teil der high-risk HPV Infektionen führt zu präkanzerösen oder kanzerösen Veränderungen. Dafür verantwortlich ist eine vermehrte Expression der frühen viralen Onkogene E6 und E7, welche einen Wiedereintritt in den Zellzyklus sowie eine Dysregulation des Zellzyklus und fehlerhafte DNA-Reparatur-Mechanismen auslösen können. Die Tumorsuppressorgene Retinoblastom-Protein (Rb) und p53 können durch die viralen Onkogene E6 und E7 gebunden und inaktiviert werden. Retinoblastom-zugehörige Proteine sind zuständig für die Kontrolle des Zellzyklus, vor allem mit Hilfe der Regulation des Transkriptionsfaktors E2F.⁴⁰ Das Tumor-Suppressor-Protein p53 wird bei verschiedenen Formen von Zell-Stress aktiviert und akkumuliert im Nucleus. Dort reguliert es verschiedene Ziel-Gene. Durch p53-Aktivität werden unter anderem die Apoptose, ein Zell-Zyklus-Arrest oder DNA-Reparaturen herbeigeführt.¹⁹ Ist E7 an hypophosphoryliertes Rb gebunden, wird der Transkriptionsfaktor E2F vermehrt exprimiert, was zu einer gesteigerten Zellproliferation führt. Da das Tumorsuppressorprotein p53 proapoptotisch wirkt, ist eine Bindung von E6 an eben dieses mit einer gesteigerten Zellproliferation assoziiert. Jedoch ist das virale Onkogen E6 nicht eigenständig in der Lage, p53 in seiner Funktion einzuschränken. Dazu wird zusätzlich das Protein E6-AP benötigt, welches zuvor an E6 bindet. Beide Proteine zusammen binden anschließend in Form einer Ubiquitin-Protein-Ligase an p53 und schränken dessen Funktion ein.⁴⁰ Die viralen Onkogene E6 und E7 sind wiederum abhängig von dem Early-Gen E2, einem der zuvor genannten viralen Struktur- und Regulatorproteine des humanen Papillomvirus. E2 hemmt E6 und E7 physiologischerweise in Ihrer Funktion. Somit wird für eine maligne Transformation postuliert, dass ein Genverlust von E2 die Voraussetzung für die gesteigerte Funktion von E6 und E7 darstellt.³⁴

(...)“ E2 genes play an essential role in viral replication, and E2 is a transcriptional repressor of E6 and E7. Persistent HPV infection that leads to carcinoma is characterized by high expression of E6 and E7 and frequent loss of E2, leading to unregulated expression of E6 and E7, which promotes genomic instability, oncogenic transformation, and clonal expansion.“³⁴

Des Weiteren führt die Inaktivität des Retinoblastom-Proteins zu einer Akkumulation des Tumorsuppressorgens p16ink4a, welches, wenn überexprimiert, als diagnostischer Marker für high-risk HPV-Infektionen eingesetzt werden kann.⁴³ Die Gesamtheit der zuvor genannten Mechanismen begünstigt letztendlich die unkontrollierte Steigerung der Zellproliferation und das gehäufte Auftreten fehlerhafter DNA-Reparatur-Mechanismen, welche in der Summe die Entstehung von Zellatypien begünstigt und somit zu Karzinombildung führen kann. In der

nachfolgenden Grafik 4 ist der Einfluss der Early-Genes E6 und E7 auf die Tumorsuppressorgene p53 und Rb schematisch dargestellt.

Grafik 4: Einfluss der Early-Genes auf p53 und Rb, vereinfachte, eigene Darstellung nach Kennedy et al. (2014)²⁵



1.4 Rolle der HP-Viren in der Entstehung von Kopf- Halstumoren

HPV-Infektionen gehören zu den häufigsten humanen Infektionen an Haut und Schleimhäuten. Für Schleimhautinfektionen mit bestimmten Subtypen humaner Papillomviren ist eine kausale Bedeutung für eine onkogene Transformation gesichert. Insbesondere für das Cervix-Uterikarzinom ist dieser kausale Zusammenhang gut erforscht.²² Schon 1983 berichteten Syrjänen et al. auch über einen möglichen Zusammenhang humaner Papillomviren in der Onkogenese oropharyngealer Karzinome, basierend auf dem Nachweis der Viren in spezifischen Tumorproben.⁵³ Syrjänen et al. stellen fest, dass 20% der oralen und ca. 60-80% der oropharyngealen Tumore durch humane Papillomviren ausgelöst werden.⁴⁰ Diese Aussagen wurden durch die International Agency of Research of Cancer (IARC) gestützt, wonach in den USA ca. 70% der oropharyngealen Tumore HPV-assoziiert sind.²⁷ So gibt es ausreichend Beweise dafür, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer HPV-16 Infektion und der Entstehung von Mundschleimhautkarzinomen besteht und HPV-16 in 90% der HPV-assoziierten Fälle der auslösende Subtyp ist.²⁷

Gleichzeitig haben HPV-positive Kopf-Hals Tumore einen quod vitam besseren klinischen Verlauf als Alkohol- und Tabakrauch-assoziierte Kopf-Hals Tumore.⁴⁰ Tabakrauch kann dennoch einen potenzierenden Effekt bei HPV-positiven Tumoren haben.⁴⁰ Insgesamt lässt sich jedoch der Trend beobachten, dass die Anzahl noxenassoziierter Kopf-Hals-Tumore rückläufig und die Inzidenz HPV-assoziiierter Neoplasien zunehmend ist, wie Tumban et al. in ihrer 2019 veröffentlichten Studie darlegen.⁵⁵

Bezüglich eines höheren Langzeitüberlebens bei Patienten mit HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren postulieren Fakhry et al in ihrer 2008 veröffentlichten Studie:

„The data confirm the improved survival outcomes for patients with HPV-positive HNSCC observed in retrospective survival analyses and are consistent with an increased sensitivity of these cancers to chemotherapy and chemoradiation“.¹⁷

Eine andere Veröffentlichung von Rieckmann et al aus 2013 kam zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte Strahlensensibilität in Zelllinien nachweisbar ist und die HPV-positiven Linien eine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen nach Radiatio vorwiesen, was auf eine eingeschränkte DNA-Reparatur-Kapazität in HPV-positiven Tumoren hindeutet.⁴¹ Bei HPV-positiven Tumoren ist überwiegend der p53-Wildtyp vorhanden, bei noxenassozierten Kopf-Hals Tumoren ist p53 teilweise bereits mutiert. Des Weiteren stellen Syrjänen et al. heraus, dass die Anzahl der HPV Kopien in Kopf-Hals Tumoren geringer als bei Cervix-Uteri-Karzinomen ist, wobei die Tumoren mit der höchsten Anzahl, welche meist im Bereich der Gaumenmandeln sitzen, die günstigste Prognose besitzen. Die Detektionsrate humaner Papillomviren in Kopf-Hals Tumoren variiert stark, was daran liegen könnte, dass nicht alle HPV-Genome intrazellulär repliziert werden und die Replikation bei chronischen Infektionen nicht allzeit stattfindet.⁴⁰ Es ist folglich ein hoher Anspruch an den Nachweis-Zeitpunkt und die Nachweis-Methode zu stellen.

Humane Papillomviren könnten laut Rautava und Syrjänen eine Rolle in der Initiierung des Malignität-Prozesses spielen und für die endgültige Transformation zu einem malignen Tumor gar nicht mehr gebraucht werden (sogenanntes „hit and run“ Prinzip). Die Autoren beschreiben, dass HP-Viren zu einem späteren Zeitpunkt in Zellkulturen verloren gehen können.⁴⁰

Des Weiteren führt eine Infektion mit high-risk HPV nur in einem kleinen Teil endgültig zu einer malignen Entartung, wie zur Hausen et al. dies für das Zervix-Uteri-Karzinom beschreiben. So spielt die lokale und systemische Immunabwehr eine Rolle bei der Persistenz dieser Viren und somit in der akkumulierten Cancerogenität.⁵⁸

Um Rückschlüsse auf die großen und kleinen Speicheldrüsen der Mundhöhle ziehen zu können, ist es nicht nur von Bedeutung, die Rolle humaner Papillomviren bezüglich oropharyngealer Karzinome herauszustellen, sondern auch die Unterschiede bezüglich verschiedener Lokalisationen in Mundhöhle und Rachen zu betrachten.

In einem 2019 veröffentlichtem Artikel von Ebenezer Tumban wird genauer auf die anatomische Verteilung von HPV-positiven Tumoren im Mund-Rachen-Raum eingegangen. So beschreibt der Autor, dass 33,6% der Oropharynxkarzinome, 20,2% der Larynxkarzinome und 22,2% der oralen Karzinome HPV-assoziiert sind.⁵⁵

Dabei stellt der Autor heraus, dass es unklar ist, warum die prozentuale Verteilung humaner Papillomviren variiert, er stellt jedoch zur Debatte, dass dies auch an verschiedenen Nachweismethoden und der Probengewinnung liegen könnte.

Im Gegensatz der zuvor dargelegten Rolle der humanen Papillomviren in der Karzinogenese oropharyngealer Tumore ist über deren Bedeutung in der Entstehung von Speicheldrüsenneoplasien wenig bekannt. Nachfolgend soll ein Überblick über den derzeitigen Forschungsstand zu diesem Thema gegeben werden.

1.5 Rolle der HP-Viren in der Entstehung von Speicheldrüsentumoren

Der Zusammenhang zwischen humanen Papillomviren und der Entstehung von Speicheldrüsentumoren ist bisher nur unzureichend erforscht. Bisherige Artikel zu diesem Thema kommen zu heterogenen Ergebnissen.

Wie das eingangs erwähnte Zitat Seiferts aus dem Jahre 1996 deutlich macht, stellt die Untersuchung diesen Zusammenhangs jedoch eine interessante und durchaus vielversprechende Überlegung dar.

So kamen Hühns et al. 2015 zu dem Schluss, dass humane Papillomviren im Gegensatz zu Epstein-Barr-Viren (EBV) und humanen Herpesviren Typ 8 mit Speicheldrüsentumoren assoziiert sind.²⁴

In der Studie wurden insgesamt 200 Fälle maligner (n=97) und benigner (n=107) Speicheldrüsentumore unter anderem auf das Vorhandensein humaner Papillomviren untersucht. Es fanden sich 25 Fälle mit starker Expression von p16, von denen 19 positiv auf HPV-16 getestet wurden, darunter 7 benigne und 12 maligne Tumoren. Unter den malignen Tumoren war das Adenoid-Zystische Karzinom mit 4 Fällen am häufigsten vertreten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Teng et al. 2014⁵⁴:

„The results indicated that HPV infection may promote the development of parotid gland

tumors.“⁵⁴

In dieser 2014 veröffentlichten Studie kommen die Autoren zu folgenden Ergebnissen:

Es wurden n=59 Parotistumore und n=20 Fälle gesunder Mundschleimhaut auf das Vorhandensein von 37 verschiedenen HP-Viren überprüft. In 57,6 % der Parotistumore gelang ein HPV Nachweis, die Kontrollgruppe der gesunden Schleimhautproben war durchgängig negativ für HPV. Des Weiteren wurde zwischen positiv getesteten malignen (42.9 %) sowie benignen (59.6 %) Parotistumoren unterschieden. Die überwiegende Anzahl der HP-Viren gehörte den High-Risk Typen an (80.7 %), wobei hier HPV 16, 18 und 52 am häufigsten vertreten waren.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien legen die Forschungen von Haeggbloom et al. aus 2018 nahe, dass es keinen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und Speicheldrüsentumoren gibt.²¹

In der 2018 veröffentlichten Studie wurden N=107 Fälle maligner Parotistumore sowie 10 korrespondierende Metastasen 12 verschiedener Speicheldrüsen-Tumor-Entitäten untersucht. HPV-DNA des Typs HPV-16 wurde lediglich in einem Fall eines Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass HPV keine tragende Rolle in der Entstehung von Speicheldrüsentumoren spielt.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Senft et al. im Jahre 2015:

„In contrast to oropharyngeal carcinomas, HPV is not generally associated with salivary gland tumours.“⁴⁹

Es wurden insgesamt 77 Fälle maligner (n=51) und benigner (n=26) Speicheldrüsentumoren untersucht. Es konnte in keiner der Tumorproben HPV-DNA nachgewiesen werden.

Qian et al. haben in ihrer 2016 veröffentlichten Studie das Vorkommen von humanen Papillomviren in einer großen Kohorte ausschließlich Adenoid-Zystischer Karzinome untersucht.³⁹

Es wurden 67 Fälle untersucht, von denen 28 (42 %) positiv auf HPV-DNA getestet wurden. Davon waren 17 Fälle positiv auf HPV-16, vier auf HPV-18, drei auf HPV-11, zwei co-positiv auf 33 und 59, ein Fall auf HPV 45 sowie ein Fall co-positiv auf HPV45 und 56.

Die hohe Anzahl an positiven Fällen in dieser Studie macht das Adenoid-Zystische Karzinom zu einem potenziell interessanten Subtyp im Hinblick auf eine mögliche HPV-assoziierte maligne Transformation. Hinzu kommt, dass ein Großteil der Adenoid-Zystischen Karzinome in den kleinen Speicheldrüsen entsteht. Dieses könnte durch ihre, in Bezug auf die Mundschleimhaut, exponierte anatomische Lage zurückzuführen sein. Einen Überblick einer Auswahl bisheriger Studien zur Untersuchung der Rolle einer HPV-Infektion und der Genese von Speicheldrüsenneoplasien zeigt nachfolgend Tabelle 3.

Tab. 3: Auswahl der Studien zum Thema HPV und Speicheldrüsenneoplasien

<i>Studie</i>	<i>Anzahl N</i>	<i>Nachweismethode</i>	<i>Ergebnisse</i>
Hühns et al. (2015)	N = 200	HPV 3.5 LCD Array Kit (Chipron, Berlin)	9,5% HPV positiv
Teng et al. (2014)	N = 59	HPV GenoArray test kit (Quiagen, Hilden)	58% HPV positiv
Qian et al. (2016)	N=67	HPV-DNA genotyping p16 immunostaining	42% HPV positiv
Haeggblom et al. (2018)	N = 107	Qiagen multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden) p16 Testung	0,9% HPV positiv
Senft et al. (2015)	N = 77	HPV 3.5 LCD Array Kit (Chipron, Berlin)	0% HPV positiv

So heterogen die Entitäten der Speicheldrüsenkarzinome sind, so ist es auch die Studienlage in Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit humanen Papillomviren und der Genese maligner Speicheldrüsenneoplasien.

1.6 Fragestellung

Die Assoziation der Onkogenese oropharyngealer Karzinome mit einer high-risk HPV-Infektion ist wissenschaftlich anerkannt. Dies könnte auch bei Speicheldrüsentumoren auf Grund ihrer anatomischen Beziehung und ihrer embryologischen Entwicklung analog zum Epithel der Mundhöhlenschleimhaut zu erwarten sein. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der Entstehung maligner Speicheldrüsentumoren?
2. Welche Speicheldrüsenmalignome sind (gehäuft) betroffen?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Lokalisation der Malignome und einer HPV-assoziierten Genese?

In dieser Studie sollen mit Hilfe geeigneter Nachweisverfahren Aussagen über die Prävalenz HPV-assoziiierter Speicheldrüsentumore verschiedener Lokalisationen und Entitäten im Raum Lübeck und Kiel gewonnen werden.

2. Material und Methoden

Um den Fragestellungen der Dissertation nachzugehen, wurde eine Literaturrecherche auf pubmed³² und google scholar²⁰ mit den Stichworten „HPV salivary gland“ und „human papillomavirus salivary gland“ durchgeführt. Es fanden sich wenige Arbeiten zu diesem Thema und die Aussagen stellten sich heterogen dar. Somit wurde das Interesse bestätigt, den Fragen mit Hilfe eines größeren Kollektivs auf den Grund zu gehen. Nach positivem Ethikvotum durch die Ethikkommissionen der Universität zu Lübeck sowie Kiel konnte die Studie begonnen werden.

2.1 Patientenkollektiv und Tumorproben

Die Zusammenstellung des Studienkollektivs erfolgte zunächst aus den Tumorregistern der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. Dr. Sieg) und der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Direktorin: Prof. Dr. Wollenberg) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck. Die Tumorregister umfassten insgesamt 182 Fälle aus der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowie 235 Fälle aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde von malignen sowie benignen Speicheldrüsentumoren der Jahre 2008-2018. Es wurde nach Auswertung der Literaturrecherche entschieden, nur Fälle maligner Speicheldrüsentumore einzuschließen und die Recherche um die Jahre 2000-2007 sowie 2019 zu ergänzen. Dies erfolgte an klinikinternen Rechnern des Instituts für Pathologie über eine gezielte Suche nach den verschiedenen Speicheldrüsenmalignomen der WHO-Klassifikation (s.o.). Anschließend wurden die Tabellen auf Doppelnennungen überprüft und entsprechende Fälle zusammengeführt. Insgesamt ergaben sich daraus 111 eingeschlossene Fälle maligner Speicheldrüsentumore, welche später durch weitere Fälle aus dem UKSH Campus Kiel ergänzt wurden (Übersicht s. Kap. 3.1).

2.2 Probengewinnung und -umfang

Für die eingeschlossenen Fälle wurden Paraffinschnitte (Hämatoxylin-Eosin-gefärbt) in den Archiven des Instituts für Pathologie der Universität Lübeck herausgesucht. Die Anzahl der Schnitte pro Fall lag zwischen 1 und 15. Anschließend wurden die Schnitte gemeinsam mit Dr. Tharun (Oberarzt im Institut für Pathologie, UKSH Lübeck) unter einem Lichtmikroskop strukturiert revidiert, indem der Tumorbereich markiert wurde und die Tumordiagnose bestätigt oder gegebenenfalls reklassifiziert wurde. Als objektives Kriterium zur Identifikation des bestgeeigneten Schnittes diente der höchstmögliche Tumorzellgehalt. Der entsprechend ausgewählte Schnitt wurde sodann in einer Datenbank vermerkt. Ungeeignete Fälle wurden aus der Studie ausgeschlossen, sodass insgesamt 111 Fälle aus Lübeck in die Studie eingeschlossen wurden.

Anhand des ausgewählten Schnittes konnte die Archiv-Recherche weitergeführt werden, sodass der zu jedem Tumor-Schnitt gehörige Tumorblock aus den Archiven des Instituts für Pathologie herausgesucht wurde. Bei den Tumorblöcken handelt es sich um sogenannte FFPE-Blöcke (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). FFPE ist eine Form der Lagerung und Erhaltung von Gewebeproben. Die Gewebeprobe wird mit Formaldehyd fixiert, um das Gewebe und die Proteinstrukturen zu bewahren. Anschließend wird das Gewebe von einem Paraffin-Wax-Block umschlossen. Dies erleichtert es Schnitte in benötigter Schnittstärke herzustellen, um diese für weitere Forschungszwecke zu verwenden.

Anschließend wurden die Blöcke erneut an der geeigneten Tumorstelle in einer Stärke von fünf Mikrometern mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten.

Zu diesem Zeitpunkt wurden weitere, in analoger Durchführung aufgearbeitete, Schnitte in 5 Mikrometer Schichtdicke mit Tumorgewebe von 62 weiteren Fällen maligner Speicheldrüsenneoplasien aus den Jahren 2002 bis 2012 vom Institut für Pathologie des UKSH Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Röcken) zugesandt. Somit konnten wir zum nächsten Schritt, der DNA-Extraktion, übergehen.

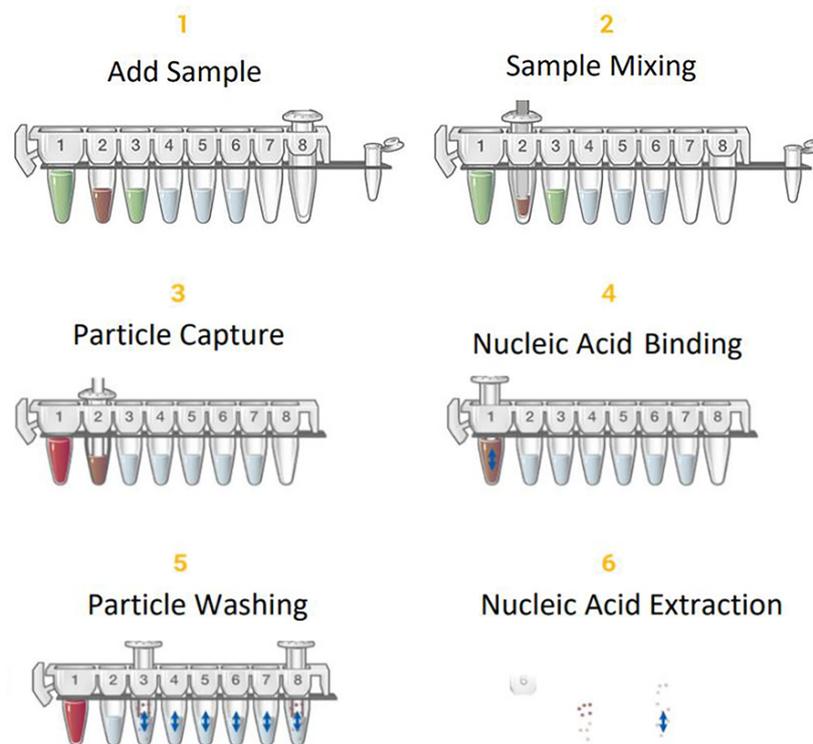
2.3 Extraktion, Aufreinigung, PCR und Nachweis von HPV-DNA

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des Maxwell RSC DNA FFPE Kit (Fa. Promega) nach Herstellervorgaben.³¹ Die einzelnen Arbeitsschritte werden nachfolgend detailliert beschrieben:

1. Zunächst wurde das Tumorgewebe mit einem sterilen Skalpell (Nr. 10) von dem Schnitt heruntergekratzt und in ein 1,5ml Probenröhrchen gegeben.
2. Anschließend wurden 300 Mikroliter Mineralöl hinzugegeben und für 10 Sekunden mit einem Vortex-Gerät gemischt.
3. Die Proben wurden für 2 Minuten auf 80 Grad Celsius erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur heruntergekühlt.
4. Währenddessen wurde der sogenannte Mastermix wie folgt vorbereitet: 224 Mikroliter Lyse-Puffer, 25 Mikroliter Proteinase-K Lösung und 1 Mikroliter blauer Farbstoff.
5. Somit wurden je 250 Mikroliter Mastermix pro Probenröhrchen hinzugefügt und für 5 Sekunden gevortexed.
6. Die Probenröhrchen wurden dann für 2 Minuten bei 10.000 U/Min. zentrifugiert um die Schichten zu trennen.
7. Die Probenröhrchen wurden in einem Wärmeblock bei 56 Grad Celsius für 30 Minuten erwärmt.
8. Danach wurden die Probenröhrchen in einem Wärmeblock bei 80 Grad Celsius für 4 Stunden erwärmt.
9. Anschließend folgte eine 5-minütige Abkühlung bis auf Raumtemperatur.
10. Es wurden 10µl RNase A Lösung zur wässrigen (blauen) Phase pro Probenröhrchen hinzugegeben. Die Vermischung erfolgte mit einer Pipette.
11. Die Proben wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen (15-30 Grad), währenddessen wurde die Patrone vorbereitet.
12. Anschließend wurde mit Hilfe einer Mikrozentrifuge 5 Minuten zentrifugiert.
13. Danach wurde umgehend die wässrige (blaue) Phase (beinhaltet die DNA) in Schacht #1 der Maxwell[®] FFPE Patrone gegeben.

Im Anschluss wurde die DNA automatisch mit Hilfe des Maxwell RSC DNA FFPE-Kits aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA kann anschließend direkt für weitere Assays verwendet werden, wie zum Beispiel eine Polymerase-Ketten-Reaktion. Die Reaktionsgefäße sind mit paramagnetischen Partikeln befüllt, an welche DNA gebunden werden kann. Es werden mehrere Reinigungsschritte durchlaufen, um die DNA zu lösen und diese in Reinform zu erhalten. In der nachfolgenden Grafik 5 ist das Prinzip der DNA-Aufreinigung des Maxwell RSC DNA FFPE-Kits dargestellt:

Grafik 5: Prinzip der DNA-Aufreinigung:



Quelle: <https://www.promega.de/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>, Fa. Promega, Walldorf, Deutschland³⁷

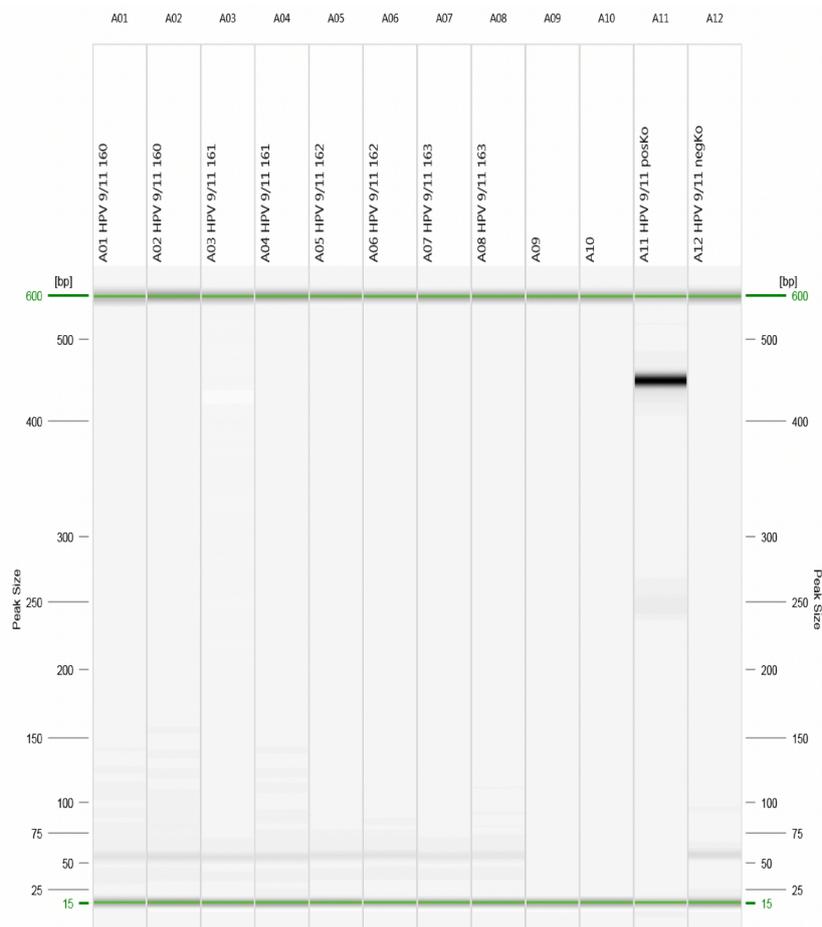
Eine Erfolgskontrolle der DNA-Extraktion erfolgte anschließend am Nanodrop-Spektralphotometer (Fa. ThermoFisher, Waltham, USA) bei 260 nm (A260). DNA-Moleküle besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260nm. Zudem wurde das Absorptionsverhältnis von 260nm zu 280nm errechnet (A260/A280 ratio). Werte größer gleich 1,8 zeigten das Vorliegen reiner DNA-Proben an.

Nach erfolgreicher Extraktionskontrolle wurde die DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach institutsinternem Verfahren durchgeführt. Die Primer, welche für die Vervielfältigung der DNA nötig sind, wurden bei der Firma Chipron erworben. Diese bestehen aus zwei Sets - dem MIX HPV 09/11 sowie dem MIX HPV 125. Der PCR-Reaktionsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 1 Tube puRe Taq RTG PCR Beads (PCR-Mastermix), 1µl Primer (HPV 09/11) oder 2µl Primer (HPV 125), 0,2-4µl Template-DNA (200ng bzw. Höchstvolumen), ad 25µl HPLC-H₂O. Für die Durchführung der PCR wurde anschließend folgendes Temperaturprofil genutzt: (1) 2 Minuten bei 96 ° Celsius, (2) 1 Minute bei 94° C (Denaturierung), (3) 1,5 Minuten bei 45° C (Annealing), (4) 3 Minuten bei 72° (Elongation), (5) 3 Minuten bei 72° (finale Elongation). Um eine suffiziente Menge an

amplifizierter DNA zu generieren, wurden die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation 42-mal wiederholt. Schließlich entstehen nach erfolgreicher Amplifikation DNA-Fragmente von ca. 430bp Länge (MIX HPV 09/11) und ca. 125bp Länge (MIX HPV 125).

Zur Minimierung methodischer Fehler wurden Positiv- und Negativproben mitgeführt. Die Beladung des Chipron-Arrays erfolgte nur, wenn die Positiv- und Negativkontrollen erfolgreich waren. Die Negativkontrolle erfolgte mittels eines kompletten Reaktionssatzes, jedoch ohne Template-DNA, die Positivkontrolle erfolgte mittels einer HPV-33 Probe des Herstellers Chipron (pHPV-33, cloned standart, 10^{10} copies lyophilized, 30-8434-01, Fa. Chipron Berlin). Diese wurde mittels einer Kapillarelektrophorese am Qiaxcel Advanced (Fa. Qiagen, Venlo) überprüft. In folgender Grafik 6 ist ein Auszug der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese mit Hilfe der QIAxcel ScreenGel 1.4.0 Software in Form von Banden dargestellt. Gut zu erkennen ist die erfolgreiche Positivkontrolle in Form einer Bande von ca. 450bp in Spalte A11 sowie die erfolgreiche Negativkontrolle in Spalte A12, welche eine Bande bei ca. 50bp zeigt. Diese Banden sind ebenso bei den übrigen Proben in den Spalten A01 bis A10 zu erkennen und stellen unverbrauchte Primer-Dimere dar.

Grafik 6: Auszug der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese am Qiaxcel Advanced (Fa. Qiagen, Venlo)



Die extrahierten und amplifizierten DNA-Proben wurden anschließend mit Hilfe des HPV Direct LCD-Array Kits 3.5 der Firma Chipron auf das Vorhandensein 32 verschiedener HPV Typen nach Herstellerangaben analysiert. Der Hybridisierungs-Test kann folgende Subtypen nachweisen:

06, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 90 und 91. Der Hersteller gibt eine hohe Sensitivität und Spezifität für seinen HPV-Test an. Dies wird laut der Firma Chipron dadurch erreicht, dass der Nachweis auf zwei verschiedenen Primer-Sets basiert, eines auf Grundlage des MY11/MY09 Systems und ein anderes mit kürzeren Amplicons von ca. 180 Basenpaaren Länge.⁶ Auf die Sensitivität und Spezifität soll an späterer Stelle nochmals eingegangen werden.

Der Test basiert auf biotinierten PCR-DNA-Produkten, die an HPV-Subtypen-spezifische DNA-Fänger-moleküle, welche auf dem LCD-Chip befestigt sind, binden (sog. Capture probes). Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene PCR-Produkte werden durch mehrere Waschungen entfernt. Visualisiert werden die gebundenen Amplicons mit Hilfe von Enzym-Substrat-Reaktionen. Dies geschieht mit Hilfe einer Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und Substratpräzipitation. Auf jedem der Chips ist Platz für 8 verschiedene Proben, wobei sich für 4 Proben in doppelter Ausführung entschieden wurde, da in den vorherigen Schritten pro Tumorprobe 2 PCR-Produkte hergestellt wurden. Das Ergebnis ist mit dem bloßen Auge sichtbar, kann jedoch zur genaueren Diagnostik mit einem Slide-Scanner (PF7250u, Fa. Chipron, Berlin) und einer Software (Slide-Reader, Fa. Chipron, Berlin) ausgewertet werden.

In nachfolgender Grafik 7 ist das Testprinzip vereinfacht dargestellt.

Grafik 7: Testprinzip des HPV 3.5 LCD Arrays, Fa. Chipron, Berlin, Germany.



Quelle: Bedienungsanleitung LCD-Array KIT HPV 3.5 (RUO) Version HPV 3.5 V 3.0-2021-ENG (Seite 2), Fa. Chipron, Berlin, Deutschland¹⁶

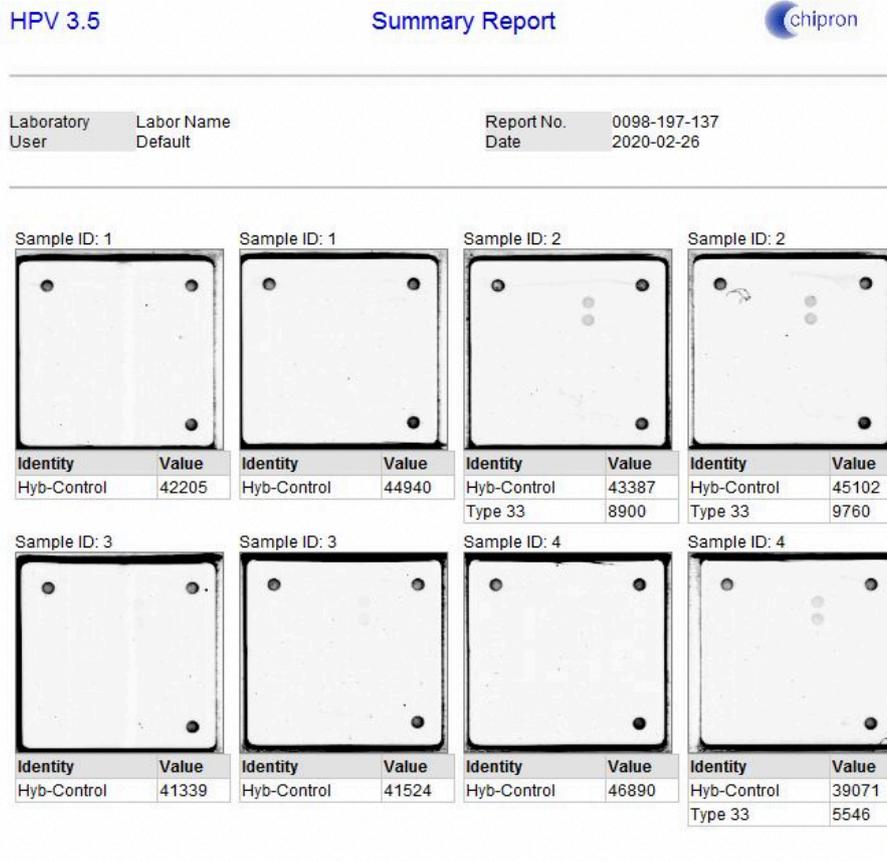
Nachfolgend wird das Kurzprotokoll des Herstellers (Fa. Chipron, Berlin, Germany) dargestellt:

1. Wasserbad auf 35 °C vorheizen
2. Pro Reaktion 22 µl Hybridization Buffer A, 2 µl Modulator und je 5 µl beider PCR-Amplifikate einer Probe mischen und 28 µl dieser Lösung in ein Arrayfeld pipettieren.
3. Den Chip in der Feuchtekkammer für 30 Minuten bei 35°C im Wasserbad inkubieren.
4. 3 Waschbehälter mit ~ 150 ml 1-fach Waschpuffer-Arbeitslösung befüllen. (1-fach Waschpuffer frisch aus 200-fach Konzentrat herstellen)
5. Den Chip für 10 Sekunden in Waschbehälter 1 und 2 spülen und für 1 Minute in Waschbehälter 3 inkubieren.
6. Chip trocknen durch 15 Sekunden Zentrifugation in der CHIP-Spin-Zentrifuge.
7. Markierungsmix aus 27 µl Dilution Buffer, 3 µl Modulator und 0.2 µl Label herstellen. (Angaben für 1 Probe)
8. 28 µl des Markierungsmixes in die Arrayfelder pipettieren und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Waschlösungen in allen drei Behältern austauschen und Waschprozedur aus Schritt 5 wiederholen.
10. Chip trocknen wie in Schritt 6.
11. Zu jedem Arrayfeld 28 µl Färbelösung (Stain) pipettieren und für 5 Minuten färben.
12. Färbung stoppen durch Untertauchen des Chips in der dritten Waschlösung aus Schritt 9 für 10 Sekunden.
13. Chip trocknen wie in Schritt 6 – der Chip ist nun bereit für die Datenauswertung.

Quelle: Bedienungsanleitung LCD-Array KIT HPV 3.5 (RUO) Version HPV 3.5 V 3.0-2021-ENG (Seite 10), Fa. Chipron, Berlin, Deutschland¹⁶

Anhand der gefärbten Chips konnte mit Hilfe der Auswertungssoftware (Slide-Reader, Fa. Chipron, Berlin) nun genau nachvollzogen werden, ob eine Hybridisierung stattgefunden hat und in welcher Konzentration ein bestimmter HPV-Subtyp bei der jeweiligen Tumorprobe nachgewiesen werden konnte. Nachfolgend wird in Grafik 8 und 9 beispielhaft eine Darstellung der Ergebnisse der SlideReader V12 Software präsentiert:

Grafik 8: Darstellung der eingelesenen HPV-Chips



Quelle: Slide-Reader-V12-Software, Fa. Chipron, Berlin

Erklärung:

In Grafik 7 ist die Übersicht eines Scans 4 Verschiedener Chipron-HPV-Chips in jeweils doppelter Ausführung zu sehen. Für jeden HPV-Subtyp sind 2 Felder vorgesehen. In drei Ecken befinden sich die Positivproben. Zu sehen ist jeweils eine intensive Färbung der Positivproben auf allen Chips sowie bei Sample 2 und 4 eine schwache Färbung bei HPV Subtyp 33 (high-risk).

Die Ergebnisse können nach folgendem, in Grafik 10 dargestelltem Muster abgelesen werden:

Grafik 10: Array-Pattern des Chipron HPV 3.5 LCD Arrays

C								C
06	11	16	18	31	33	35	39	
06	11	16	18	31	33	35	39	
42	44	45	51	52	53	54	56	
42	44	45	51	52	53	54	56	
58	59	61	62	66	67	68	70	
58	59	61	62	66	67	68	70	
72	73	81	82	83	84	90	91	
72	73	81	82	83	84	90	91	C

Anmerkung: eigene Darstellung des Array-Pattern des Chipron HPV 3.5 LCD Arrays (Fa. Chipron, Berlin)

Dabei sind die 32 HPV-Subtypen nach high-risk (rot), low-risk (grün) und intermediate risk (gelb) untergeordnet. In den 3 Ecken ist jeweils die Hybridisierungs-Kontrolle dargestellt (C).

2.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Studie wurde eine statistische Beratung am Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck in Anspruch genommen. Bei zu einhundert Prozent negativem Ergebnis reduziert sich die statistische Auswertung auf eine deskriptive Statistik der eingeschlossenen Fälle.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 173 Fälle maligner Speicheldrüsentumore, welche zwischen 2000 und 2019 diagnostiziert und behandelt wurden, in die Studie eingeschlossen. Folgendes Diagramm 1 zeigt die absolute Häufigkeitsverteilung der einzelnen Entitäten maligner Speicheldrüsentumore in der vorliegenden Studie.

3.1. Deskriptive Statistik der eingeschlossenen Fälle

Diagramm 1: Häufigkeitsverteilung der malignen Speicheldrüsentumore

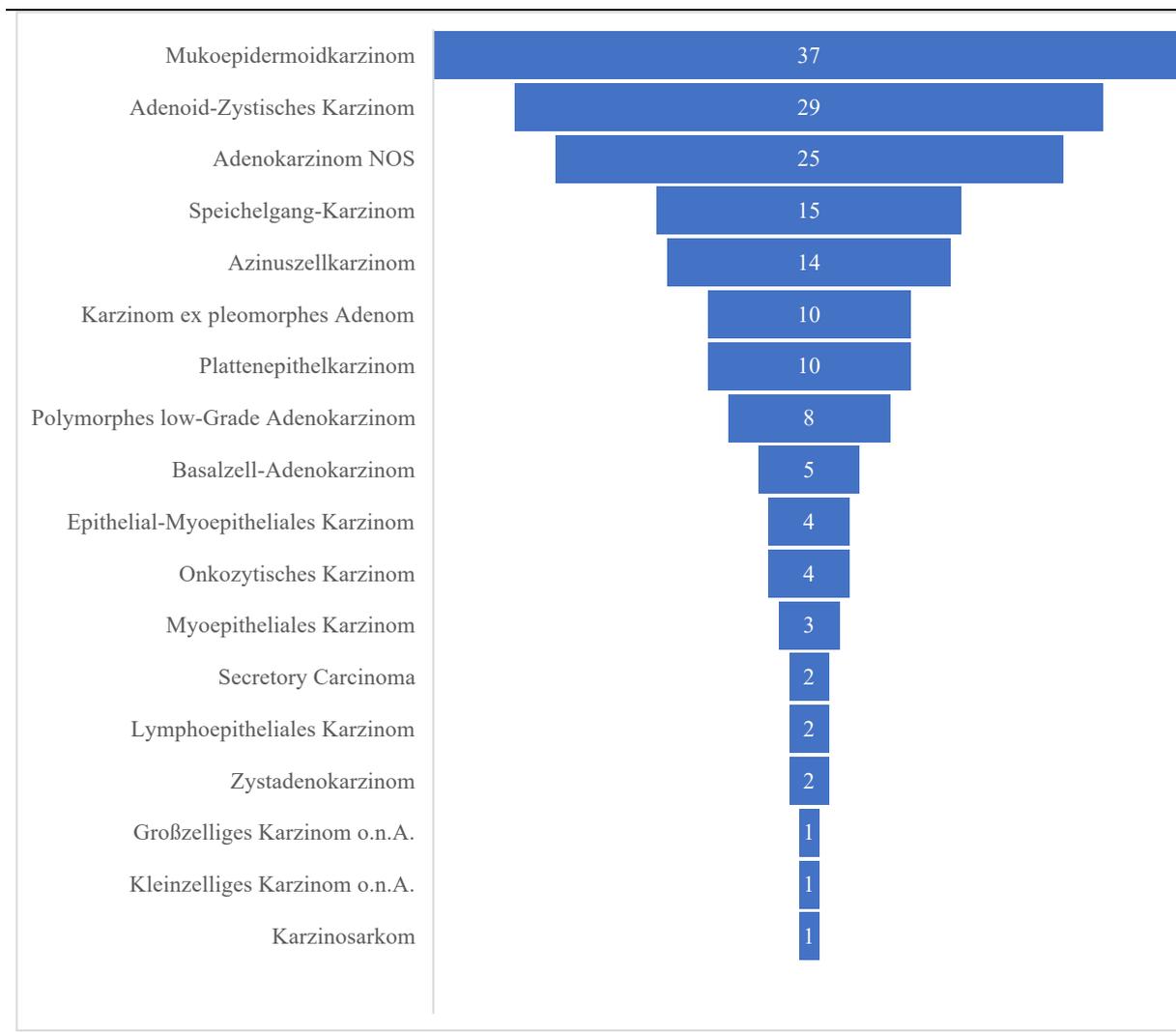


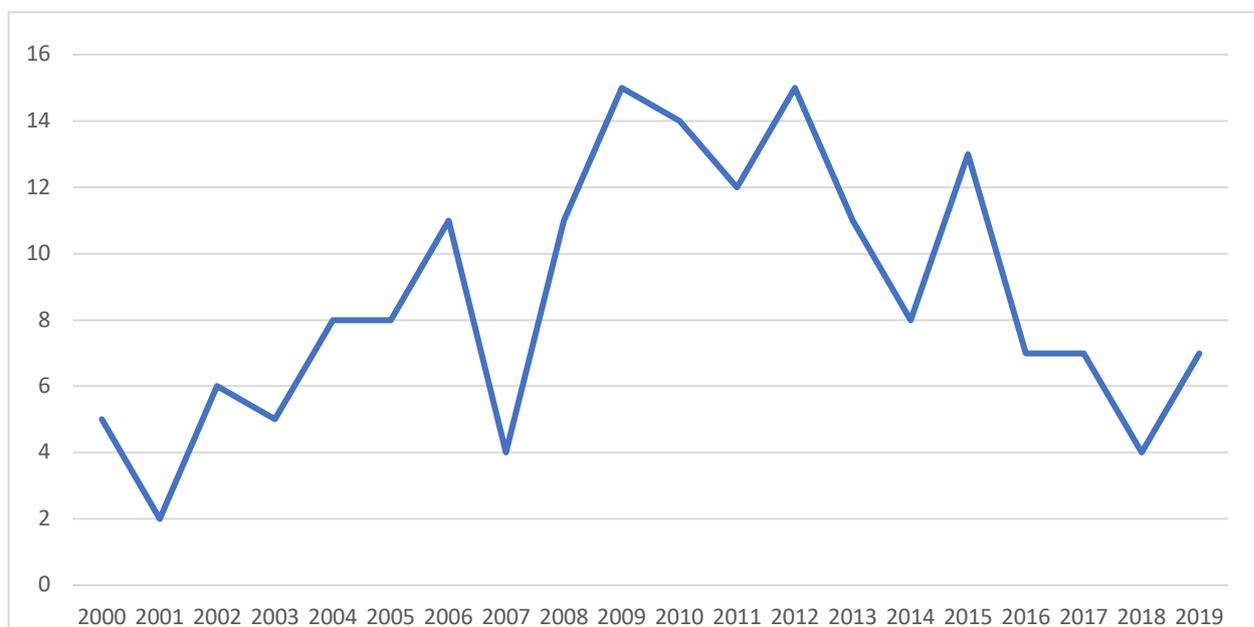
Diagramm 1: Häufigkeitsverteilung der malignen Speicheldrüsentumore der Kliniken für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (UKSH Lübeck) und Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (UKSH Lübeck und Kiel) zwischen 2000 und 2019.

Demnach zeigt sich auch in der vorliegenden Kohorte, dass das Mukoepidermoidkarzinom mit 21% und das Adenoid-Zystische Karzinom mit 17% der Fälle am häufigsten vertreten sind. In der Studie von Hühns et al. aus 2015 waren das Mukoepidermoidkarzinom mit 18,3% sowie das Adenoid-Zystische Karzinom mit 17,2% ebenfalls am häufigsten vertreten.²⁴

Dabei lag der Mittelwert der in die Studie eingeschlossenen Fälle pro Jahr bei 8,65, wobei die Jahre 2009 und 2012 mit jeweils 15 Fällen überproportional stark vertreten waren.

Folgendes Diagramm 2 zeigt eine Übersicht der in die Studie eingeschlossenen Fälle maligner Speicheldrüsentumore pro Jahr von 2000 bis 2019:

Diagramm 2: Anzahl eingeschlossener Fälle maligner Speicheldrüsentumoren pro Jahr



Die Tumorlokalisation konnte in 169 der 173 Fälle zweifelsfrei zugeordnet werden. Die meisten der Tumoren fanden sich dabei in der Glandula Parotis (n= 111), gefolgt von den kleinen Speicheldrüsen (n= 47) und der Gl. submandibularis (n= 11). In 4 Fällen war die Lokalisation auf Grund fehlender Daten nicht zuzuordnen. Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Lokalisationen der malignen Speicheldrüsenneoplasien in der vorliegenden Studie.

Tab.4: Verteilung der Lokalisationen der Speicheldrüsentumore (N= 173)

Lokalisation	Gl. Parotis	Gl.submandibularis	Gl. sublingualis	Kl. Speicheldrüsen	unbekannt
Anzahl (n)	111	11	0	47	4
Anteil (%)	64%	6,5%	0%	27%	2,5%

Die Geschlechterverteilung der Stichprobe ergab einen Anteil weiblicher Patientinnen von 52% und einen Anteil männlicher Patienten von 48%. Das Patientenalter variierte dabei zwischen 15 Jahren und 97 Jahren, das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung betrug 58 Jahre mit einer Standardabweichung von 17,86 Jahren. Der Median beträgt 59 Jahre.

Tab. 5: Altersverteilung der Kohorte:

Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Spannweite	Standardabweichung	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Interquartilsabstand
58J	59J	15J	97J	82J	17,86J	44J	72J	28J

Das Durchschnittsalter der vorliegenden Studie ist vergleichbar mit dem Altersdurchschnitt der Studie von Haeggblom et al. (59 Jahre)²¹ sowie Huehns et al. (59,9 Jahre)²⁴. Die Geschlechterverteilung ähnelt auch der Studie von Huehns et al., wobei diese bei insgesamt 200 Fällen einen Anteil weiblicher Patientinnen von 46,5% sowie männlicher Patienten von 53,5% verzeichneten.

Das hier vorliegende Studienkollektiv ist nicht nur mit den Kollektiven oben genannter Studien vergleichbar. So wurde in einer von Sentani et al. 2019 veröffentlichten Studie insgesamt 5015 Fälle von Speicheldrüsenneoplasien über einen Zeitraum von 39 Jahren retrospektiv betrachtet. Auch hier waren das Mukoepidermoidkarzinom sowie das Adenoid-Zystische-Karzinom bei den malignen Karzinomen am häufigsten vertreten. Das Durchschnittsalter betrug 54,3 Jahre. Männer waren nur knapp häufiger von malignen Speicheldrüsentumoren betroffen als Frauen (509 vs. 508).⁵⁰ Somit kann bezüglich des Kollektivs der hier vorgelegten Studie von einer guten externen Validität ausgegangen werden.

3.2 HPV-Nachweis in malignen Speicheldrüsenneoplasien

Das Ergebnis der Untersuchungen der extrahierten DNA mit Hilfe des Chipron HPV Direct LCD-Arrays war bis auf einen Fall negativ.

Bei dem positiven Fall (positiv auf HPV16) handelte es sich nach erneuter Revision um ein basaloides HPV-Plattenepithelkarzinom, welches den oropharyngealen Karzinomen zugeordnet werden musste und somit entfiel.

Zu Beginn der Auswertung gab es auffällig viele Fälle ($n = 20$), in denen es zu einem positiven Nachweis des high-risk Subtyps 33 kam. So zeigte sich beim Auslesen der Chips häufig das in Grafik 8 und 9 dargestellte Bild. Durch kritisches Hinterfragen des Ergebnisses entstand die Annahme, dass die Proben verunreinigt worden sein könnten, da die mitgeführte Positivkontrolle ebenfalls auf Nachweis von HPV 33 beruhte (s. Kap. 2.3). Daraufhin wurden alle Arbeitsschritte zur Testung der betroffenen Proben von Beginn an wiederholt. Anschließend wurde in keinem der 173 ausgewerteten Fälle ein positiver HPV-DNA-Nachweis erbracht. Nachfolgende Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse:

Tab. 6: Auswertung der Chipron HPV 3.5 Chips:

<i>HPV-Subtyp</i>	<i>M-Nummer</i>	<i>Anzahl n</i>	<i>Relative Anzahl in %</i>	<i>HPV-Positiv</i>
Mukoepidermoidkarzinom	8430/3	37	21,38%	0
Adenoid-Zystisches Karzinom	8200/3	29	16,76%	0
Adenokarzinom NOS	8140/3	25	14,45%	0
Speichelgang-Karzinom	8500/3	15	8,67%	0
Azinuszellkarzinom	8550/3	14	8,09%	0
Karzinom ex pleomorphes Adenom	8941/3	10	5,78%	0
Plattenepithelkarzinom	8070/3	10	5,78%	0
Polymorphes low-Grade Adenokarzinom	8525/3	8	4,62%	0
Basalzell-Adenokarzinom	8147/3	5	2,89%	0
Epithelial-Myoepitheliales Karzinom	8562/3	4	2,31%	0
Onkozytisches Karzinom	8290/3	4	2,31%	0
Myoepitheliales Karzinom	8982/3	3	1,73%	0
Secretory Carcinoma	8502/3	2	1,15%	0
Lymphoepitheliales Karzinom	8082/3	2	1,15%	0
Zystadenokarzinom	8440/3	2	1,15%	0
Großzelliges Karzinom o.n.A.	8013/3	1	0,57%	0

Kleinzelliges Karzinom o.n.A.	8041/3	1	0,57%	0
Karzinoid	8980/3	1	0,57%	0
Gesamt (N)	-	173	100%	0

Da in keinem (0 von 173) der Fälle ein HPV-Nachweis erfolgte, konnten weder Unterschiede zwischen einzelnen Entitäten der Speicheldrüsenmalignome noch zwischen den verschiedenen Lokalisationen der jeweiligen Malignome bezüglich ihrer HPV-Assoziation nachgewiesen werden.

Die Validierung des Ergebnisses beruht auf der Sensitivität und Spezifität des Chipron HPV 3.5 LCD-Arrays. Der Hersteller verspricht eine hohe Sensitivität und Spezifität. Die Firma Chipron macht Angaben zur analytischen Sensitivität in detektierbaren Targetkopien pro Mikroliter, konkrete Daten zur diagnostischen Sensitivität liegen nicht vor. Die Kontrolle der analytischen Sensitivität erfolgte mit Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA über eine Konzentration von 1×10^6 bis 1 Kopie(n) pro μl . In nachfolgender Tabelle 7 werden die erreichten Nachweisgrenzen für einzelne HPV-Subtypen dargestellt:

Tab. 7: Nachweisgrenzen einzelner HPV-Subtypen

Kopien / Reaktion*	Nachweisgrenze erreicht (HPV-Subtypen)
50	06, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 , 53, 56, 59, 66 , 68b, 82
500	44, 54, 67, 70, 73, 81, 83, 84, 90, 91
5000	42, 61, 62, 72

Ann.: Eigene Darstellung aus: Bedienungsanleitung LCD-Array KIT HPV 3.5 (RUO) Version HPV 3.5 V 3.0-2021-ENG (Seite 13), Fa. Chipron, Berlin¹⁶

*Gezeigt sind die geringsten Konzentrationen, bei denen alle Wiederholungen ein positives Ergebnis ergaben. Die fettgedruckten Subtypen gehören den high-risk HPV-Typen an.

Die Nachweisgrenzen des Herstellers konnten zudem in der 2014 veröffentlichten *HPV LabNet International Proficiency Study* für folgende HPV-Subtypen bestätigt werden: 06, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66 und 68b.¹¹

In der Studie von Eklund et al aus 2014 wurde die Kompetenz verschiedener HPV-Tests in Bezug auf die Detektion der Subtypen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68a und 68b überprüft. Um als „kompetent“ zu gelten, musste der HPV-Test ≥ 50 IU von HPV16 und HPV 18 sowie 500 Genom-Äquivalente der anderen 14 Subtypen detektieren, auch

wenn andere HPV-Subtypen anwesend waren. Die Tests durften zudem nicht mehr als ein falsch-positives Ergebnis vorweisen. Der HPV Array von Chipron erreichte dabei eine Kompetenz von 100%.¹¹

Des Weiteren wurde der verwendete Chipron 3.5 HPV-Test in einer von Bräutigam et al. 2019 veröffentlichten Studie mit dem ebenfalls häufig verwendeten EUROArray der Firma Euroimmun auf Konkordanz überprüft. Die Studie verglich die Ergebnisse beider Tests bezüglich des HPV-Status zytologischer Cervix-Uteri-Proben von 163 Patientinnen. Dabei stellten die Autoren fest, dass beide HPV-Tests eine gute bis exzellente Übereinstimmung in der Detektion verschiedener HPV-Subtypen besitzen und somit passend für die Routine-Diagnostik sind.⁴

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Tumorproben von insgesamt N=173 malignen Speicheldrüsentumoren 18 verschiedener Entitäten auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht. Diese Malignome wurden zwischen 2000 und 2019 diagnostiziert. Es wurde mit Hilfe der zuvor beschriebenen Untersuchungsmethoden auf 32 verschiedene Subtypen gescreent.

Damit liegt nach aktuellem Stand die bisher größte Kohorte maligner Speicheldrüsenkarzinome vor, welche auf das Vorhandensein von humanen Papillomviren untersucht wurde. In Anbetracht der Heterogenität zuvor genannter Studien wurde der Ansatz verfolgt, mittels einer größeren Kohorte eine validere Aussage hinsichtlich einer HPV-assoziierten Karzinogenese in Speicheldrüsentumoren zu tätigen.

Den größten Anteil bilden dabei die Entitäten des Mukoepidermoidkarzinoms (n=37), des Adenoid-Zystischen Karzinoms (n=29) sowie des Adenokarzinoms NOS (n=25). Auch seltenere Malignome wie das Plattenepithelkarzinom (n=10) sind vertreten.

In keinem der Fälle konnte ein HPV-Nachweis erfolgen, was unter anderem die Aussagen von Haeggbloom et al. sowie Senft et al. stützt. Von den oben erwähnten Studien ist die von Haeggbloom et al.²¹ diejenige, welche sich diesem Thema am umfassendsten gewidmet hat. So wurden in dieser 2018 veröffentlichten Studie bereits eine Anzahl von 107 malignen Speicheldrüsentumoren untersucht. Jedoch wurden trotz der vergleichsweise großen Menge an malignen Speicheldrüsentumoren nur wenige Fälle der einzelnen Subgruppen analysiert und es wurden nur Tumore der Glandula Parotis untersucht, andere große Speicheldrüsen sowie die zahlreichen kleinen Speicheldrüsen waren hier nicht repräsentiert.

Die hier vorgelegte Studie bekräftigt nun mit einer deutlich höheren (N=173) Anzahl an malignen Speicheldrüsentumoren noch einmal die Aussage, dass Speicheldrüsentumore und humane Papillomviren am ehesten in keinem kausalen Zusammenhang stehen.

So postulieren Haeggbloom et al. in ihrer Studie zusammenfassend:

„In conclusion, HPV DNA analysis in a large number of malignant parotid salivary gland tumors, including 12 different subtypes, did not show any strong indications that tested HPV types have a causal role in the studied salivary gland tumor types.“²¹

In der vorliegenden Studie wurden 18 verschiedene Subtypen untersucht, wohingegen Haeggbloom et al. 12 verschiedene Entitäten untersuchten. Diese waren im Gegensatz zur Studie von Haeggbloom et al. nicht ausschließlich in der Glandula Parotis lokalisiert, sondern umfassten zahlreiche weitere Lokalisation im Mund-Rachenraum. Somit kann in der vorgelegten Studie

auch für weitere Lokalisationen die Tendenz beobachtet werden, dass eine HPV-assoziierte Genese unwahrscheinlich erscheint, insbesondere für maligne Tumoren der kleinen Speicheldrüsen (n=47).

Die Tumorentität, welche bei Haegglom et al. positiv auf HPV getestet wurde, war ein Plattenepithelkarzinom der Glandula parotidea. Insgesamt gab es in der Studie eine Anzahl von 7 primären Plattenepithelkarzinomen der Gl. parotis, wobei es sich um eine vergleichsweise seltene Entität handelt.²¹

Somit konnte keine statistisch relevante Aussage aus diesem Subtypen-Ergebnis gezogen werden, was wiederum ein generelles Problem bei der Analyse der Speicheldrüsenmalignome widerspiegelt. Durch die geringe Prävalenz und die große Heterogenität können einzelnen Subtypen nur in geringer Anzahl repräsentiert werden. Daraus schlussfolgerten die Autoren:

„With a larger cohort of squamous cell salivary gland carcinomas, perhaps more conclusive results could be drawn to whether HPV is a causative agent in the development of these tumors or not.“²¹

In der von uns vorgelegten Studie fanden sich 10 primäre Plattenepithelkarzinome der Speicheldrüsen. Diese waren einheitlich HPV negativ. Somit liegt auch für diese Entität ein eindeutiges Ergebnis vor, wenn auch die Fallzahl durch die Seltenheit dieses Subtyps vergleichsweise gering ausfällt. Dafür ist, wie schon von Haegglom et al. postuliert, eine noch größere Anzahl an Tumoren dieser Entität nötig. In der Studie von Haegglom et al. wurde methodisch in ähnlicher Weise vorgegangen wie in der vorliegenden Studie, wobei die DNA-Extraktion, die DNA-Amplifikation und der HPV-Nachweis von anderen Herstellern gewählt wurde. Zusätzlich haben die Autoren die HPV positiven Tumore noch auf p16^{INK4a} Überexpression getestet, wobei der positive Fall des Plattenepithelkarzinoms eine Überexpression zeigte. Die Rolle des Nachweises einer p16^{INK4a} Überexpression als verlässlicher Marker ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Die Interaktion von viralem E7-Protein mit Retinoblastom-Gen resultiert in einer Überexpression von p16. Es wird angenommen, dass der alleinige Nachweis einer Überexpression von p16 als Surrogatparameter einer HPV Infektion angesehen werden kann, jedoch die doppelte Positivität (HPV-DNA und Überexpression von p16) als Nachweismethode mit höherer Sensitivität und Spezifität gilt.³⁶

In einer Metanalyse aus 2017 von Prigge et al. wurden 24 Studien hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität verschiedener HPV-Nachweismethoden untersucht. Dabei wurde herausgestellt, dass der alleinige HPV-DNA Nachweis mittels PCR sowie der immunhistochemische Nachweis von p16 zwar hohe Sensitivitäten (98% sowie 94%) aufwiesen, jedoch nicht zufriedenstellend hinsichtlich ihrer Spezifität waren (84% und 83%). Der HPV-Nachweis mittels In-situ

Hybridisierung schnitt noch schlechter mit einer Sensitivität von 85% sowie einer Spezifität von 88% ab:

„Based on this data, the sole use of HPV DNA ISH to detect a transforming HPV infection in OPSCC cannot be recommended.“³⁶

Bei Kombination eines PCR-basierten HPV-Nachweises mit einem immunhistochemischen Nachweis einer p16 Überexpression konnte eine Sensitivität von 93% sowie eine Spezifität von 96% erreicht werden.

Somit werden falsch positive Ergebnisse reduziert und die Autoren sprachen sich für eine Kombination dieser beiden Methoden und der Vermeidung einer ISH-basierten Methode aus:

„ However, by combining the two tests, specificity can be significantly optimized without affecting the sensitivity.“³⁶

In der hier vorgestellten Studie wurde sich bewusst für den array-basierten HPV Nachweis entschieden. Der Surrogatparameter „p16-Überexpression“ wurde nicht zusätzlich bestimmt. Da das Ergebnis einheitlich negativ ist, sind zudem falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen. Ein einfach negatives Ergebnis (nur p16 oder nur DNA) kann als negativ gewertet werden.³⁶ Wäre eine signifikante Anzahl der Tumoren positiv für HPV-DNA, würde eine zusätzliche immunhistochemische Analyse auf p16-Überexpression sinnvoll erscheinen. Die Autoren der Metaanalyse schlagen ein umgekehrtes Vorgehen (zunächst p16-Testung, anschließender DNA-Nachweis) vor, dies jedoch vornehmlich aus Gründen der Zeitersparnis:

„From a theoretical point of view the order of testing [...] does not impact on the sensitivity or specificity [...]. Both tests have to be positive to define a result as „positive“ and if one or both tests are negative, the sample is considered to be „negative“, irrespective of the testing order. [...] The more laborious and time-consuming analysis of HPV DNA using PCR can thus be restricted to the p16 positive cases, minimizing processing time and workload.“³⁶

Wie zuvor beispielhaft erwähnt, reicht die Spannweite der Studienlage von gänzlich fehlenden Nachweisen im Falle der Studie von Senft et al.⁴⁹ bis hin zu Prävalenzen über 40% in der Studie von Teng et al.⁵⁴ Die Limitationen dieser Studien sind hauptsächlich in der Anzahl der Proben maligner Speicheldrüsentumore zu sehen.

Interessant ist zum Beispiel, dass in der Studie von Haeggbloom et al. unter den 107 malignen Tumoren insgesamt nur 13 Adenoid-Zystische Karzinome vorhanden waren. Diese Entität wurde wiederum bei Qian et al. 2016 in 42% der 67 Fälle positiv auf HPV getestet. Der fehlende Nachweis könnte also auch bei Haeggbloom et al. an der Verteilung der malignen Tumore gelegen haben, zudem waren die Tumore wie oben erwähnt ausschließlich in der Glandula Parotis

lokalisiert, andere Lokalisationen wurden nicht eingeschlossen. In der Studie von Senft et al. wurden anteilig 20 Adenoid-Zystische Karzinome untersucht.

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Arbeiten wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 173 Fälle ausschließlich maligner Speicheldrüsentumore unterschiedlicher Lokalisationen und Entitäten untersucht, wobei die Stichprobe alleine 29 Adenoid-Zystische Karzinome vorweisen kann. Somit umfasst die vorliegende Studie einerseits eine vergleichsweise große Kohorte, andererseits eine hohe Variabilität an Entitäten und Lokalisationen. Wie oben erwähnt kommen jedoch seltenere Subtypen maligner Speicheldrüsentumore, wie zum Beispiel das Plattenepithelkarzinom, in zu geringer Anzahl vor, um für diese Entitäten eine valide Aussage im Hinblick auf die fehlende Korrelation einer HPV-Infektion und einer Malignomgenese zu treffen. Für die häufigeren Entitäten, wie zum Beispiel das Mukoepidermoidkarzinom oder das Adenoid-Zystische Karzinom, kann jedoch eine zuverlässigere Aussage getroffen werden als in bisherigen Studien.

Betrachtet man die Studien, welche einen positiven Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und malignen Speicheldrüsentumoren hervorheben, so sticht die Studie von Hühns et al. aus 2015 mit der Anzahl an Speicheldrüsentumoren von N=200 heraus.²⁴ Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass HP-Viren eine Rolle in der Entstehung von Speicheldrüsentumoren spielen könnten: „We concluded that HHV-8 infection and EBV infection are not associated with salivary gland cancer, but HPV infection may play a role in these tumour entities.“²⁴

Es wurden insgesamt 19 Fälle positiv auf HPV getestet, wobei 12 davon malignen Speicheldrüsenneoplasien zuzuordnen waren. Insgesamt 93 der 200 Tumore waren den malignen Speicheldrüsenneoplasien zuzuordnen. Der Nachweis wurde, analog zu unserer Studie, an FFPE-Präparaten durchgeführt. Die meisten der positiv getesteten Fälle fanden sich in der Gruppe der Adenoid-Zystischen Karzinome (4 von 16, entsprechend 25%). Im Gegensatz dazu fanden sich in unserer Studie 29 Adenoid-Zystische Karzinome, wobei sich kein einziger positiver Fall zeigte. Die HPV Analyse wurde ebenso mit dem Chipron HPV 3.5 LCD-Array-Kit durchgeführt, jedoch fand bei der Studie von Hühns et al. zuvor eine Selektion derjenigen Fälle mit moderater oder starker p16-Überexpression statt. Somit wurden nur 25 der insgesamt 200 Speicheldrüsentumore überhaupt auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht. Rautava und Syrjänen beschreiben in ihrem 2012 erschienenen Artikel, dass bei Verwendung von p16 als HPV-Marker ca. 10% der Läsionen falsch positiv sind, da p16 auch bei Zellseneszens, also dem Arrest der Zellteilung, hochreguliert ist.⁴⁰

Des Weiteren ist die Anzahl positiv getesteter Tumore an der Gesamtanzahl sehr gering: 12 von 93 in malignen Tumoren und 7 von 107 in benignen Tumoren. Die Tendenz geht eher zu Gunsten der malignen Tumore mit einem Anteil von rund 13% im Gegensatz zu einem Anteil von 6,5% bei benignen Tumoren. Hieraus jedoch eine generelle Aussage zur Korrelation einer HPV-Infektion mit Speicheldrüsentumoren zu tätigen erscheint fraglich. Es lässt sich hieraus lediglich schließen, dass eine Korrelation von p16 Überexpression und high-risk HPV nachgewiesen werden kann.

Hieraus lässt sich jedoch nicht endgültig schließen, dass eine HPV-Assoziation generell für die Entstehung von Speicheldrüsentumoren gegeben ist.

Eine weitere Studie mit positiver Korrelation zwischen HPV-Infektion und Speicheldrüsentumoren stellt die Studie von Teng et al aus 2014 dar.⁵⁴ Hier kommen die Autoren zu dem Schluss, dass HPV-Infektionen die Entstehung von Speicheldrüsentumoren begünstigen könnten.

Die Aussagekraft dieser Studie ist kritisch zu hinterfragen, da insgesamt eine kleine Kohorte (N=59) untersucht wurde und nur sieben Fälle maligner Speicheldrüsenneoplasien untersucht wurden, von denen 3 (42,9%) positiv auf HPV getestet wurden.⁵⁴ Im Gegensatz zu der vorgelegten Studie wurde zum HPV Nachweis das HPV GenoArray test kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Positivprobe in der Studie von Teng et al. ist HPV-Subtyp 18-basiert, dieser high-risk Typ wurde auch in den meisten der Fälle nachgewiesen (24,6%). Eine Positivkontrolle mittels eines anderen Subtyps wäre sinnvoll, um falsch positive Ergebnisse durch Verunreinigungen auszuschließen.

Die Studie von Cheau-Feng Lin et al. postuliert eine potentielle Rolle von HPV-Infektionen in der Entstehung von Speicheldrüsentumoren. Betrachtet man jedoch die Studie genauer, so zeigt sich, dass neben einer Fallzahl von N=53 zwar in 35,8% (19 von 53) der Fälle HPV nachgewiesen werden konnte, jedoch der Hauptanteil dieser Fälle (18 Fälle) gutartige Tumore betraf (15 pleomorphe Adenome und 3 Zystadenolymphome). Die Autoren berichten auch von einer 33,3-prozentigen Positivität bei Mukoepidermoidkarzinomen, jedoch handelt es sich hierbei um einen solitären Fall von insgesamt nur 3 Mukoepidermoidkarzinomen. Eine Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie ist hier lediglich zu ziehen, wenn die vier malignen Fälle der Studie betrachtet würden, hierbei lässt die Anzahl der Proben (n=4) jedoch keinen suffizienten Vergleich zu. Zudem lässt ein einziger positiver Fall keinen Rückschluss auf einen Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Karzinogenese dieser Entität zu. Betrachtet man den HPV-Test, der in dieser Studie verwendet wurde, so wurde hier eine PCR-basierte Methode gewählt

(BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), um HPV 16 und 18 nachzuweisen. Zur Bestätigung des Tests wurde ein Nachweis von HPV16 oder HPV18 E6 Protein durchgeführt. Die Autoren proklamieren, die Nachweismethode wäre sensitiver als in bisherigen Studien.²⁸ Möglicherweise wäre dieser Bestätigungs-Test bei positivem HPV-Nachweis auch in der vorliegenden Studie sinnvoll, in Anbetracht des einheitlich negativen Ergebnisses ist dies jedoch zu vernachlässigen.

Es scheint naheliegend, dass bei einheitlich negativem Ergebnis eine alternative Testmethode in Betracht gezogen werden sollte, jedoch wurden die Gütekriterien des kommerziellen Chipron-HPV-Testkits, wie zuvor im Ergebnisteil erwähnt, kritisch hinterfragt und als zuverlässig befunden. Ebenso wurden methodische Fehler durch Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen minimiert. Das Ergebnis der vorgelegten Studie lässt auf Grund oben genannter Ergebnisse unweigerlich den Schluss ziehen, dass es keine Korrelation zwischen einer HPV-Infektion und der Genese maligner Speicheldrüsentumore gibt. Des Weiteren lässt sich weder eine bestimmte Entität, noch eine spezifische Tumorlokalisation hervorheben. Dennoch gibt es in dieser Studie auch Limitationen, die nachfolgend betrachtet werden sollen.

Eine Limitation ist in der eingeschränkten Vergleichbarkeit und in den teilweise unvollständigen Daten der Tumorregister zu sehen. Die Diagnostik der Speicheldrüsentumore ist durch vergleichsweise häufige Revision der internationalen Klassifikation zudem nicht immer einfach, insbesondere, wenn die Datenaquise über größere Zeiträume und an verschiedenen Standorten erfolgt. Die Register der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie und den Abteilungen für Hals- Nasen und Ohrenheilkunde der Standorte Kiel und Lübeck des UKSH sind nicht einheitlich aufgebaut. So ist beispielsweise die exakte Lokalisation sowie das Geschlecht und das Alter bei Diagnosestellung teilweise fehlend. Beispielhaft sollen diese Werte genannt werden, da diese die statistische Aufarbeitung des Patientenkollektivs erschweren. Es erfordert eine zeitintensive Recherche, diese Daten im Nachhinein zu erheben - teilweise sind Daten auch schlichtweg nicht mehr zu rekonstruieren. Hieraus ergibt sich für die Zukunft das Ziel einer einheitlichen und vollständigen Datenerfassung.

Weiterhin wird eine valide Aussage zur Kanzerogenität der humanen Papillomviren bezogen auf Speicheldrüsentumore nur möglich sein, wenn alle potenziell onkologisch relevanten HPV-Subtypen untersucht werden können. Mit dem vorliegenden Chipron HPV 3.5 Test wird auf 32 high-, low und intermediate-risk HPV-Typen untersucht, beschrieben sind jedoch weitaus mehr als 100 HPV-Subtypen⁴⁰, von denen ca. 120 vollständig sequenziert sind. So wäre es denkbar,

dass zukünftig neue Subtypen hinzukämen oder bekannte Subtypen reklassifiziert würden, die eine Bedeutung im Rahmen der Onkogenese von Speicheldrüsenmalignomen besitzen könnten.

Des Weiteren unterliegt die Kohorte einer großen Heterogenität in Hinblick auf den Tumorzellgehalt der Proben. So reicht die Spannweite des prozentualen Tumorzellgehaltes der jeweiligen Proben von ca. 15% bis über 60%. Je größer der prozentuale Tumorzellgehalt eines jeweiliger Schnittes ist, desto valider ist das Ergebnis in Bezug auf den Nachweis humaner Papillomviren zu bewerten. So nennt die Firma Chipron in ihrer Bedienungsanleitung des HPV 3.5 Arrays die zu geringe Konzentration des Ausgangsmaterials oder die Degradierung der DNA als explizite Fehlerquelle. Des Weiteren könne die PCR-Amplifikation durch ko-extrahierte Inhibitoren gestört werden (z.B. Blut).¹⁶

Zudem handelt es sich bei unserer Studie zwar um eine vergleichsweise große Kohorte, jedoch ist auf Grund der zuvor erwähnten Heterogenität der Entitäten eine Aussage zu einzelnen, selteneren Entitäten nur fraglich zu treffen.

Die Verteilung dieser Entitäten spiegelt die epidemiologisch-statistische Verteilung verschiedener Speicheldrüsentumore wider. Entitäten wie das primäre Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüsen sind selten und müssten in größerer Anzahl untersucht werden. Hier wäre der Ansatz ein metaanalytisches Vorgehen. Zudem werden in der vorliegenden Studie zwar verschiedene Lokalisationen maligner Speicheldrüsentumoren berücksichtigt, jedoch stellen die Parotis-Malignome den größten Anteil (64%). Die kleinen Speicheldrüsen sind mit 27% weniger häufig vertreten.

Wie bei jeder technischen Untersuchung unterliegen die Aufbereitung und Analyse der Proben auch potenziellen Fehlerquellen. So wird am Beispiel des oben genannten positiven Falls, welcher bei erneuter Revision nicht den Speicheldrüsentumoren zuzuordnen war, deutlich, dass Fehler des Untersuchenden sowie methodische Fehler möglich sind. Kontaminationen sind, wie zuvor erwähnt, auch eine mögliche Fehlerquelle. Diese können beispielsweise zu falsch-positiven Ergebnissen führen. So kann es beim Schneideprozess am Mikrotom zu Verunreinigungen kommen. Diesem Risiko wurde vorgebeugt, indem für jede Probe eine neue Messerposition benutzt wurde. Des Weiteren können Kontaminationen bei der Entparaffinierung oder beim Ansetzen der PCR durch Übertragung von Aerosolen entstehen. Da die Positivkontrolle ebenso pipettiert werden muss, können auch hier Kontaminationen entstehen. In der vorliegenden Studie kam es, wie im Ergebnisteil erwähnt, zunächst zu einer gehäuften HPV-33 Positivität. In

diesem Fall ist am ehesten eine Kontamination durch Übertragung von Aerosolen beim Ansetzen der PCR erfolgt. Wie im Ergebnisteil erwähnt, wurde die Testung daher wiederholt.

Durch das Zusammenführen der Speicheldrüsenmalignom-Fälle dreier Kliniken über einen Zeitraum von 20 Jahren konnte eine - im Vergleich zu anderen Studien – große Anzahl verschiedener Entitäten und Lokalisationen untersucht werden. Das Ergebnis der Studie ist eindeutig negativ. Die beschriebenen Limitationen zeigen auf, an welchen Stellen die Studie Schwächen aufweist und wo weitere Studiendesigns den Einfluss einer HPV-Infektion auf die Malignomentstehung seltenerer Entitäten valid abbilden könnten. So wäre es möglich, analog zur Aussage von Haegglom et al. vielversprechende Ansätze einzelner seltener Entitäten weiter zu verfolgen. Gelänge es, eine große Kohorte von primären Plattenepithelkarzinomen der Speicheldrüsen zu generieren, so könnte eine zuverlässigere Aussage über eine eventuelle Korrelation von humanen Papillomviren und diesem Subtyp getätigt werden. Wie diese Studie zeigt, reichen die Tumorregister dreier Kliniken noch nicht aus, um genügend Proben seltenerer Entitäten zu generieren. Des Weiteren wäre die Betrachtung einer größeren Kohorte von Fällen des Adenoid-Zystischen Karzinoms (ACC) von Interesse. So konnten Qian et al in ihrer 2016 veröffentlichten Studie diesen Subtyp genauer untersuchen und kamen zu einer HPV-Positivität in 42% der Fälle.³⁹ Das Adenoid-Zystische-Karzinom stellt ein vergleichsweise häufiges, jedoch prognostisch ungünstiges Speicheldrüsenmalignom dar und kommt gehäuft in den kleinen Speicheldrüsen der Mundschleimhaut vor.

Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich des Adenoid-Zystischen Karzinoms wird bei der Betrachtung einer anderen Entität aufgezeigt, welche nicht zu den Speicheldrüsentumoren gezählt wird, jedoch viele Gemeinsamkeiten aufweist. Bei der Tumorentität, welche 2017 in die WHO-Klassifikation der Kopf-Halstumore aufgenommen wurde, handelt es sich um das HPV-assoziierte Karzinom mit adenoid-zystischen Eigenschaften. In einer von Bishop et al. veröffentlichten Studie wurden 49 Fälle dieser neuartigen Entität näher beschrieben.² Der zu den sinunasalen Karzinomen gehörige Tumor zeigt in vielen Fällen Eigenschaften des Adenoid-Zystischen Karzinoms auf, wie z.B. cribriformes und/oder tubuläres Wachstum, welches der soliden Form des Adenoid-Zystischen Karzinoms zugerechnet wird.

Weiterhin beschreiben die Autoren, dass alle in der Studie untersuchten Tumore speicheldrüsenähnliche Architektur besitzen, jedoch ihre Ähnlichkeit mit einzelnen Speicheldrüsen-Karzinom-Entitäten stark variiert. So zeigten einige Tumoren ein cribriformes Wachstum, welches typisch für das Adenoid-Zystische Karzinom ist, andere Tumore hingegen erinnerten an epithelial-myoepitheliale Karzinome, Basalzell-Adenokarzinome oder Adenokarzinome NOS.

Was alle diese Tumore gemeinsam hatten war jedoch die Assoziation mit HP-Viren.

In ihrer Untersuchung fanden die Autoren in 33 von 49 Fällen (67%) humane Papillomviren des Subtyps 33.

Auch wenn diese Tumorentität primär nicht den Speicheldrüsentumoren zuzuordnen ist, stellt die Ähnlichkeit dieser Tumorart mit verschiedenen Speicheldrüsentumoren, allen voran das Adenoid-Zystische Karzinom, einen interessanten Aspekt in Hinblick auf die Rolle humaner Papillomviren bei der Tumorgenese dar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Thematik eines möglichen Zusammenhanges einer Infektion mit humanen Papillomviren und der Karzinogenese maligner Speicheldrüsentumoren. Diese Fragestellung ist bislang nur durch einzelne Studien mit heterogenen Ergebnissen untersucht worden.

Es wurden insgesamt N=173 Fälle maligner Speicheldrüsentumore dreier Kliniken aus den Jahren 2000-2019 zusammengetragen. Dies ist die, nach jetzigem Kenntnisstand, größte Kohorte maligner Speicheldrüsenneoplasien, welche auf die Korrelation einer HPV-Infektion mit der Entstehung maligner Speicheldrüsentumore untersucht wurde.

Die Tumorproben wurden in Zusammenarbeit mit den Instituten für Pathologie der Universitätskliniken Lübeck und Kiel entsprechend der aktuell gültigen internationalen Klassifikation der Speicheldrüsentumore erneut histologisch begutachtet und gegebenenfalls reklassifiziert.

Die DNA-Extraktion und Aufreinigung erfolgte an FFPE-Tumorblöcken mit Hilfe des Maxwell RSC DNA FFPE Kit (Fa. Promega, Walldorf) nach Herstellervorgaben. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des HPV Direct LCD-Array Kits 3.5 (Fa. Chipron, Berlin) auf das Vorhandensein 32 verschiedener HPV Typen nach Herstellervorgaben analysiert.

Das Testergebnis der 173 Fälle war ausnahmslos negativ. Das Resultat wurde mit den Ergebnissen der zu diesem Thema vorliegenden Studien im Hinblick auf Validität und Limitationen kritisch hinterfragt. Ferner wurde die Datenlage in Hinblick auf die Möglichkeit zukünftiger Studiendesigns zur Validierung der Rolle einer HPV-induzierten Kanzerogenese maligner Speicheldrüsentumore bewertet.

Das eindeutige Ergebnis der Studie bei vergleichsweise großer Kohorte unterstützt die Aussage, dass es am ehesten keinen Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und der Genese maligner Speicheldrüsentumore gibt.

Im Vergleich zu vorherigen Studien ist durch die Größe der Stichprobe, die Heterogenität der Entitäten sowie die Vielfalt an Tumorlokalisationen eine validere Aussage zu tätigen, als dies mit bisher vorliegenden Studien möglich war.

6. Literaturverzeichnis

1. Bisdas S, Claassen H, Guntinas-Lichius O, et al. Kopfspeicheldrüsen. In: Reiß M, ed. *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik Und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg; 2009:519-560. doi:10.1007/978-3-540-89441-4_7
2. Bishop JA, Andreassen S, Hang JF, et al. HPV-related Multiphenotypic Sinonasal Carcinoma: An Expanded Series of 49 Cases of the Tumor Formerly Known as HPV-related Carcinoma With Adenoid Cystic Carcinoma-like Features. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(12):1690-1701. doi:10.1097/PAS.0000000000000944
3. Bradley P, Guntinas-Lichius O. Salivary Gland Disorders and Diseases: Diagnosis and Management. In: *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. Vol 269. ; 2012:S.247. <https://doi.org/10.1007/s00405-012-1984-9>
4. Bräutigam K, Ehret C, Schillinger V, et al. Analysis of HPV genotype-specific concordance between EUROArray HPV and HPV 3.5 LCD-Array Kit in cervical samples of 163 patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2020;301(3):745-751. doi:10.1007/s00404-019-05427-y
5. Byrd S, Morris LGT. Neck dissection for salivary gland malignancies. *Oper Tech Otolaryngol--Head Neck Surg*. 2018;29(3):157-161. doi:10.1016/j.otot.2018.06.005
6. Chipron HPV 3.5 LCD Array Product Information. Accessed December 12, 2021. <https://chipron.com/wp-content/uploads/2016/10/HPV-3.5-Brochure.pdf>
7. Cracchiolo JR, Shaha AR. Parotidectomy for Parotid Cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2016;49(2):415-424. doi:10.1016/j.otc.2015.10.007
8. D'Abramo C, Archambault J. Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. *Open Virol J*. 2011;5:80-95. doi:10.2174/1874357901105010080
9. Drenckhahn D., Waschke J. In: *Taschenbuch Anatomie*. 1st ed. Elsevier, München; 2008:S.239.
10. Eklund. International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. Published March 30, 2021. Accessed March 30, 2021. https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/
11. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):449-459. doi:10.1128/JCM.02453-13
12. El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. International Agency for Research on Cancer; 2017.
13. Emmerson E, Knox SM. Salivary gland stem cells: A review of development, regeneration and cancer. *Genes N Y N 2000*. 2018;56(5):e23211-e23211. doi:10.1002/dvg.23211
14. Ettl T, Guntinas-Lichius O, Stromberger C, Rieke DT, Keilholz U. Therapie der bösartigen Speicheldrüsentumoren. *MKG-Chir*. 2021;14(4):315-327. doi:10.1007/s12285-021-00333-2
15. Eufinger H. Therapie der gutartigen Speicheldrüsentumoren. *MKG-Chir*. 2021;14(4):305-314. doi:10.1007/s12285-021-00326-1
16. Fa. Chipron, Berlin, Deutschland. Bedienungsanleitung LCD-Array KIT HPV 3.5 (RUO) Version HPV 3.5 V 3.0-2021-ENG ., Published online 2021.
17. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):261-269. doi:10.1093/jnci/djn011
18. Galdirs TM, Kappler M, Reich W, Eckert AW. Current aspects of salivary gland tumors - a systematic review of the literature. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2019;8:Doc12-Doc12. doi:10.3205/iprs000138
19. Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P. Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(1):2-11. doi:10.1038/cgt.2010.63

20. Google LLC. Google Scholar. Accessed November 20, 2021. <https://scholar.google.com>
21. Haegglblom L, Ursu RG, Mirzaie L, et al. No evidence for human papillomavirus having a causal role in salivary gland tumors. *Diagn Pathol*. 2018;13(1):44-44. doi:10.1186/s13000-018-0721-0
22. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Small Viruses Big Discov Interwoven Story Small DNA Tumor Viruses*. 2009;384(2):260-265. doi:10.1016/j.virol.2008.11.046
23. Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. *Monogr Oral Sci*. 2014;24:1-13. doi:10.1159/000358776
24. Hühns M, Simm G, Erbersdobler A, Zimpfer A. HPV Infection, but Not EBV or HHV-8 Infection, Is Associated with Salivary Gland Tumours. *BioMed Res Int*. 2015;2015:829349-829349. doi:10.1155/2015/829349
25. Kennedy, Edward. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells using a bacterial CRISPR/Cas. *J Virol August 6 2014 DOI 10.1128/JVI01879-14*.
26. Kessler AT, Bhatt AA. Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 2: Neoplasms and Tumor-like Lesions. *J Clin Imaging Sci*. 2018;8:48-48. doi:10.4103/jcis.JCIS_46_18
27. Kreimer AR, Chaturvedi AK, Alemany L, et al. Summary from an international cancer seminar focused on human papillomavirus (HPV)-positive oropharynx cancer, convened by scientists at IARC and NCI. *Oral Oncol*. 2020;108:104736-104736. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104736
28. Lin FCF, Chen PL, Tsao TY, Li CR, Jeng KC, Tsai SCS. Prevalence of human papillomavirus and Epstein–Barr virus in salivary gland diseases. *J Int Med Res*. 2014;42(5):1093-1101. doi:10.1177/0300060514543041
29. Llana C. The Role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis (abstract in English). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E449-55.
30. Lüllmann-Rauch R, Asan E. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. 5th ed. Thieme, Stuttgart; 2015:S.369. <https://doi.org/10.1055/b-003-124637>
31. Maxwell® RSC DNA FFPE Kit INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT AS1450. Accessed December 14, 2021. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-rsc-dna-ffpe-kit-protocol.pdf?rev=ca8e64bf095742f19eb9cd4682f22a86&la=en>
32. National Library of Medicine. Pubmed. Accessed December 12, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>
33. Pan SY, de Groh M, Morrison H. A Case-Control Study of Risk Factors for Salivary Gland Cancer in Canada. *J Cancer Epidemiol*. 2017;2017:4909214-4909214. doi:10.1155/2017/4909214
34. Pinatti LM, Walline HM, Carey TE. Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *J Dent Res*. 2018;97(6):691-700. doi:10.1177/0022034517744213
35. Porcheri C, Mitsiadis TA. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells*. 2019;8(9):976. doi:10.3390/cells8090976
36. Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2017;140(5):1186-1198. doi:10.1002/ijc.30516
37. Promega Corporation. DNA Purification. Accessed December 12, 2021. <https://www.promega.de/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification>
38. Psychogios G. Zervikale Lymphknotendissektion bei Schilddrüsenkarzinomen. Presented at: 15. Buß- und Bettag-Symposium; November 20, 2013; Erlangen, Germany.
39. Qian X, Kaufmann A, Chen C, et al. Prevalence and associated survival of high-risk

- HPV-related adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oncol.* 2016;49. doi:10.3892/ijo.2016.3563
40. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1(Suppl 1):S3-S15. doi:10.1007/s12105-012-0367-2
 41. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, et al. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol.* 2013;107(2):242-246. doi:10.1016/j.radonc.2013.03.013
 42. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, et al. Consensus Statement on the Classification and Terminology of Neck Dissection. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 2008;134(5):536-538. doi:10.1001/archotol.134.5.536
 43. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011;30(18):2087-2097. doi:10.1038/onc.2010.614
 44. Schulte E, Schuhmacher U, Schünke M. In: *Kopf und Neuroanatomie : 72 Tabellen.* 1st ed. Thieme, Stuttgart; 2006:S112.
 45. Schwarz-Furlan S. Histologie und Molekularpathologie von Speicheldrüsentumoren. *MKG-Chir.* 2021;14(4):287-295. doi:10.1007/s12285-021-00324-3
 46. Schwenzer N, Ehrenfeld M. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.* 4. Auflage Thieme, Stuttgart; 2011. S.25
 47. Seethala RR, Stenman G. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):55-67. doi:10.1007/s12105-017-0795-0
 48. Seifert G. In: *Oralpathologie I: Pathologie Der Speicheldrüsen.* Spezielle pathologische Anatomie. Springer Berlin Heidelberg; 2013:S62.
 49. Senft E, Lemound J, Stucki-Koch A, Gellrich NC, Kreipe H, Hussein K. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A 16, tumour protein 53 and epidermal growth factor receptor in salivary gland carcinomas is not associated with oncogenic virus infection. *Int J Oral Sci.* 2015;7(1):18-22. doi:10.1038/ijos.2014.28
 50. Sentani K, Ogawa I, Ozasa K, et al. Characteristics of 5015 Salivary Gland Neoplasms Registered in the Hiroshima Tumor Tissue Registry over a Period of 39 Years. *J Clin Med.* 2019;8(5):566. doi:10.3390/jcm8050566
 51. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 2003;77(24):13125-13135. doi:10.1128/jvi.77.24.13125-13135.2003
 52. Suzuki A, Iwata J. Molecular Regulatory Mechanism of Exocytosis in the Salivary Glands. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3208. doi:10.3390/ijms19103208
 53. Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of Human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg.* 1983;21(2):147-153. doi:10.1016/0007-117X(83)90060-4
 54. Teng WQ, Chen XP, Xue XC, et al. Distribution of 37 human papillomavirus types in parotid gland tumor tissues. *Oncol Lett.* 2014;7(3):834-838. doi:10.3892/ol.2013.1770
 55. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses.* 2019;11(10). doi:10.3390/v11100922
 56. Wang X, Luo Y, Li M, Yan H, Sun M, Fan T. Management of salivary gland carcinomas - a review. *Oncotarget.* 2017;8(3):3946-3956. doi:10.18632/oncotarget.13952
 57. Wiesinger I, Wendl C. Bildgebende Diagnostik von Speicheldrüsentumoren. *MKG-Chir.* 2021;14(4):296-304. doi:10.1007/s12285-021-00325-2
 58. zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. :342-350. doi:https://doi.org/10.1038/nrc798

7. Danksagung

Für die umfangreiche Unterstützung, enge Betreuung und Ideengebung möchte ich Prof. Peter Sieg, Direktor der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Campus Lübeck, danken. Des Weiteren danke ich dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Lübeck unter der Leitung von Prof. Sven Perner für die hervorragende Zusammenarbeit, welche die methodische Umsetzung dieses Projektes überhaupt erst möglich gemacht hat. Besonderer Dank gilt Dr. Lars Tharun, welcher mir von Beginn des Projektes an umfangreich zur Seite stand und mir den Zugang zur Pathologie deutlich erleichterte. Außerdem danke ich Dr. Helen Pasternack, Janine Stegmann-Freese sowie den Gebrüdern Schröder für ihre Unterstützung bei der methodischen Umsetzung. Danken möchte ich auch der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde des UKSH Lübeck unter damaliger Leitung von Prof. Barbara Wollenberg für die gute Zusammenarbeit, welche einen großen Beitrag zur Fallrekrutierung hervorgebracht hat. Besonderer Dank gilt Dr. Christian Idel für die Bereitstellung des Tumorregisters. Zudem möchte ich der Klinik für Hals- Nasen und Ohrenheilkunde des UKSH Kiel unter der Leitung von Prof. Petra Ambrosch sowie dem Institut für Pathologie der Uniklinik Kiel unter der Leitung von Prof. Christoph Röcken für die Zusendung weiterer Tumorentitäten danken. Besonderer Dank gilt Dr. Eva-Maria Koch sowie Sandra Krüger für den zuverlässigen Kontakt. Auch danken möchte ich Julia Richter für die Unterstützung bei der Organisation der Finanzierung und Materialbeschaffung.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie sowie meiner Frau Nele für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage.

8. Anhang

An die
Universität zu Lübeck
Zentrales Prüfungsamt
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

Ergänzende Erklärungen zur vorliegenden Dissertation:

Die Dissertation wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. Peter Sieg, Direktor der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Campus Lübeck, angefertigt.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers, und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen. Des Weiteren habe ich mich bislang keinem weiteren Promotionsverfahren unterzogen. Der Verwendung einer Antiplagiatssoftware stimme ich hiermit zu. Des Weiteren möchte ich hiermit der Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörern bei der mündlichen Prüfung widersprechen.

Ethikvotum vom 19.04.2018



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. Dr. Sieg
Direktor der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Nis-Oke Andresen, nisokeandresen@googlemail.com

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 18-030
Datum: 19. April 2018

Sitzung der Ethik-Kommission am 01. März 2018

Antragsteller: Herr Prof. Sieg

Titel: Humane Pappillomaviren und Speicheldrüsenneoplasien – Eine retrospektive Studie an Gewebeproben und die Korrelation der Ergebnisse mit den Krankheitsverläufen der Patienten

Sehr geehrter Herr Prof. Sieg,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 22. März 2018, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und die offenen Fragen beantworten.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.
Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.clinicaltrials.de).
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.
Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur kurzfristig geprüft. Dieses Votum / diese Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
 Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
 Hr. Prof. Habermann (Chirurgie, Biobank)
 Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
 Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
 Fr. Farnies (Amtsgericht Eutin)
 Hr. Prof. Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

Frau Martini (Caritas)
 Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
 Herr Prof. Obleser (Psychologie)
Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)
Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
 Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)