

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
und der Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt Tumor-Immunologie
Charité Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von HPV bei adenoid-zystischen
Speicheldrüsenkarzinomen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Georgios Tzamalís

aus Thessaloniki

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Kaufmann
 2. Prof. Dr. med. T. Kombos
 3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Sedlmaier

Datum der Promotion: 07.09.2012

Meinen Eltern gewidmet

Στους γονείς μου

Abkürzungen

ACC	Adenoid-zystisches Karzinom
CGH	vergleichende Genom-Hybridisierung
CMV	Zytomegalie Virus
DNA	desoxy-ribo-nucleid acid
EBV	Epstein Barr Virus
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FHIT	fragile histidine triad protein
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HCAM	homing cell adhesion molecule
HHV	Humanes Herpes Virus
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRHPV	Hochrisiko Humanes Papilloma Virus
ICAM	intercellular adhesion molecule
LOH	Heterozygotieverlust-Analysen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NCAM	neural cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factors
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
Rb	Retinoblastom Protein
SEER	National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling
VEGF	vascural endothelial growth factors
WWOX	WW-domain containing oxidoreductase

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie von Speicheldrüsentumoren	1
1.2 Das adenoid-zystische Karzinom	2
1.3 Ätiologie und molekularbiologische Charakteristika	3
1.4 Humane Papillomviren (HPV)	8
1.5 Zielsetzung	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Patientenkollektiv	11
2.2 Elektronischer Datenbogen	14
2.3 Tumorgewebe	15
2.3.1 DNA-Extraktion	15
2.3.2 Genotypisierung	15
2.3.3 PCR für DNA-Fragmentierung	17
2.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von p16, p53, Ki-67 und EGFR	18
2.4 Statistische Auswertung	18

3. ERGEBNISSE	20
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs nach Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation	20
3.2 Tumorstadien gemäß der TNM-Klassifikation	25
3.3 HPV Prävalenz	28
3.4 p16 ^{INK4A} und sonstige Biomarker (p53, Ki-67, EGFR)	34
3.5 Rezidivfreies Überleben	46
3.6 Gesamtüberleben	56
3.7 Histopathologische Merkmale von Rezidiven und Metastasen	67
4. DISKUSSION	70
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
7. TABELLENVERZEICHNIS	96
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98

9. ERKLÄRUNG	100
10. LEBENSLAUF	101
11. PUBLIKATIONSLISTE	102
12. DANKSAGUNG	104

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie von Speicheldrüsentumoren

Epitheliale Speicheldrüsentumore sind relativ selten auftretende Malignome die etwa 4-6% aller Neoplasien im Kopf-Halsbereich nach Ausschluss von Haut- und Hirntumoren umfassen. Die Inzidenz der Neuerkrankungen in den USA wird laut SEER (engl. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results) auf 1 pro 100000 pro Jahr geschätzt ¹. Sie sind durch eine Vielfalt histomorphologischer Differenzierungsformen mit zum Teil erheblich unterschiedlicher klinischer, therapeutischer und prognostischer Relevanz charakterisiert. Sowohl gutartige als auch bösartige Tumore zeigen ihr häufigstes Auftreten zwischen dem 5. und 7. Lebensjahrzehnt. Tendenziell sind Frauen etwas häufiger betroffen. Bei Kindern dominieren maligne Tumore und hier insbesondere das Mukoepidermoidkarzinom.

Speicheldrüsentumore werden nach den Kriterien der Arbeitsgruppe für histologische Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation eingeteilt ². Gutartige und bösartige Speicheldrüsentumoren betreffen in ca. 75% der Fälle die Gl. Parotidea, in 10% der Fälle die Gl. Submandibularis, in weniger als 1% die Gl. Sublingualis und in 14% die kleinen intraoralen Speicheldrüsen ³. Der Anteil der malignen epithelialen Tumore in der Gl. Submandibularis umfasst etwa 45% der Neubildungen, in den kleinen Speicheldrüsen bis zu 70%, während er in der Ohrspeicheldrüse aufgrund des hohen Anteils an pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren nur 20% beträgt. In den kleinen Speicheldrüsen sind adenoid-zystische Karzinome, Mukoepidermoidkarzinome und niedrigmaligne polymorphe Adenokarzinome überdurchschnittlich repräsentiert ⁴⁻⁶. Buchner et al. untersuchten 2007 in der kalifornischen Bevölkerung retrospektiv 380 intraorale Tumore ausgehend von den kleinen Speicheldrüsen, mit dem Ziel die relative Häufigkeit und Verteilung dieser Tumore, zu bestimmen ⁶. 59% dieser Tumore waren gutartig und 41% waren bösartig. Die gutartigen Tumore teilten sich in pleomorphe Adenome (39%), Zystadenome (6,3%), kanalikuläre Adenome (6,1%), duktale Papillome (4,4%) Basalzelladenome (1,6%) und Myoepitheliome (1,3%) auf. Die bösartigen Tumore setzten sich aus Mukoepidermoidkarzinomen (21,8%), niedrigmalignen polymorphen Adenokarzinomen (7,1%), adenoid-zystischen Karzinomen (6,3%), Adenokarzinomen, (2,1%), Azinuszellkarzinomen (1,6%), Klarzellkarzinomen (1,0%) und Karzinomen ex pleomorphem

Adenom (0,5%) zusammen. Im Gegensatz zu der Studie von Buchner et al., die adenoid-zystische Karzinome als dritthäufigsten malignen Tumor der kleinen Speicheldrüsen gefunden haben, wurde in anderen Studien mit Patientengut aus Westeuropa dieser Tumor als häufigste bösartige Neoplasie beschrieben^{3, 7}. In der Studie von Buchner et al.⁶ war das Verhältnis des Auftretens adenoid-zystischer Karzinome männlich zu weiblich 1:2. Dies steht im Einklang mit anderen Studien^{8, 9, 10}. Der Gaumen stellte die häufigste Lokalisation (75%) gefolgt von der Oberlippe (8,3%) dar. Auch von anderen Autoren wurde eine ähnliche Verteilung beschrieben^{3, 8, 9, 10, 11, 12}. Bilaterale und multifokale Karzinome werden am häufigsten bei pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren beschrieben, sind insgesamt aber sehr selten¹³.

1.2 Das adenoid-zystische Karzinom

Das adenoid-zystische Karzinom stellt eine klinisch und pathologisch gut definierte Tumorentität dar. Es wurde erstmalig von Billroth im Jahre 1859 beschrieben¹⁴. Er hielt die Läsion für ein Zylindrom, einen Tumor bestehend aus hyalinem, zylinder-ähnlichem Material umgeben von Epithelzellen. Im Jahre 1952 führte Reid¹⁵ den Begriff „adenoid-zystisch“ ein, der bereits von Foote und Franzell für die Klassifikation von Tumoren der großen und kleinen Speicheldrüsen benutzt worden war¹⁶. Histologisch wird zwischen drei Subtypen unterschieden: kribriiformes, tubuläres und solides adenoid-zystisches Karzinom. Manche solide Tumore beinhalten trabekuläre Strukturen, so daß einige Autoren von einem eigenständigen, trabekulären Subtypen ausgehen dessen morphologische Charakteristika zwischen denen vom kribriiformen und soliden Typen liegen. In mehreren Studien wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem histologischen Typen und der klinischen Prognose untersucht. Dabei wies der solide Subtyp die schlechteste Prognose auf und war gekennzeichnet durch frühe Rezidivierung und Metastasierung sowie durch eine hohe Mortalität¹⁷⁻²³.

Die klinische Symptomatik vom adenoid-zystischen Karzinom ist durch ein indolentes aber progressives lokales Wachstum charakterisiert. Es zeichnet sich durch aggressive histologische und klinische Merkmale wie z.B. perineurale Invasion, ziemlich hohe Lokalwachstumskontrolle, 40%-Inzidenz von Fernmetastasen trotz der sehr seltenen regionalen Metastasierung sowie eine relativ lange Überlebenszeit (10-15 Jahre) trotz Vorhandensein von hämatogenen Metastasen²⁴ aus.

Die Behandlung des adenoid-zystischen Karzinoms besteht stadienabhängig und sofern es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt aus der radikalen chirurgischen Resektion gefolgt von postoperativer, adjuvanter Radiotherapie^{25, 26}. Chemotherapie oder eine anti-EGFR-Antikörpertherapie bei positivem Rezeptorstatus wurde in einzelnen Fällen angewandt, allerdings konnte bisher keine signifikante Besserung der lokalen Tumorkontrolle, der Metastasierungsrate oder des Gesamtüberlebens beobachtet werden^{25, 123}. Trotz Ausreizen der therapeutischen Optionen bleibt die Rezidivrate relativ hoch. Die 5- und 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate beträgt jeweils 50-65% und 45-52% wobei die 5- und 10-Jahre Gesamtüberlebensrate auf 70-72% bzw. 44-54% geschätzt wird^{25, 26}. Manche Studien beschreiben eine prognostische Signifikanz der Tumorlokalisation, so daß adenoid-zystischen Karzinomen der kleinen Speicheldrüsen eine schlechtere Prognose als Tumoren der großen Speicheldrüsen zugeschrieben wird^{27, 28, 29}. Adenoid-zystische Karzinome können von anderen anatomischen Strukturen als den Speicheldrüsen wie z.B. der Tränendrüse, dem äußeren Ohr, dem Tracheobronchialbaum, der Brust und der Vulva ausgehen³⁰⁻³⁶ und werden dann als den Speicheldrüsen nicht zugehörige adenoid-zystische Karzinome klassifiziert (non salivary ACC).

1.3 Ätiologie und molekularbiologische Charakteristika

Hinsichtlich der Ätiologie von Speicheldrüsentumoren gibt es zurzeit wenige gesicherte Daten. Ein etablierter Zusammenhang besteht zwischen einer früheren Bestrahlung im Kopf-Halsbereich und einer auf das 40fache gesteigerten Tumorinzidenz^{39, 40}. Dabei handelt es sich in 44% der Fälle um Mukoepidermoidkarzinome⁴¹. Aufgrund epidemiologischer Studien erscheint eine gesteigerte Tumorinzidenz nach erhöhter Exposition mit Nickel, Chrom, Asbest und Zementstaub möglich, aber nicht gesichert. Zunehmend werden genetische Aberrationen identifiziert, die zwar nicht spezifisch für eine bestimmte Tumorentität sind, jedoch gehäuft auftreten und eine mögliche pathogenetische Bedeutung besitzen. Die DNA von unterschiedlichen Viren (EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 und HHV-8) mit zum Teil onkogenem Potential konnte im Speicheldrüsenengewebe von Patienten nachgewiesen werden. Eine Assoziation zu malignen Tumoren konnte aber bisher nicht gezeigt werden⁴².

In den letzten Jahren konnten maßgebliche Fortschritte in der zytogenetischen Analyse der adenoid-zystischen Karzinome verzeichnet werden. Die Entwicklung der genetischen Methoden erstreckt sich über zytogenetische Untersuchungen wie das sogenannte Karyotypen G-banding, Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH), vergleichende Genom-Hybridisierung (CGH), Mikrosatelliten Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Heterozygotieverlust-Analysen (LOH) ^{43, 44}. Eine der ersten zytogenetischen G-banding Analysen der adenoid-zystischen Karzinome stammt aus der Arbeitsgruppe von Sandros et al ⁴⁵. Hierbei konnte eine Chromosom 6q- Deletion in über 50% der Fälle beobachtet werden. Die Brechpunkte waren innerhalb der Region 6q22-25 gestaffelt und verursachten eine minimale gemeinsame Deletion von mindestens 6q25-qter ⁴⁶. Der nächste Schritt in der Untersuchung chromosomaler Anomalien in adenoid-zystischen Karzinomen war die Entwicklung von FISH. Diese Technik erwies sich als sehr hilfreich sowohl für die Bestätigung ⁴⁷ als auch für die Präzisierung der durch G-banding erhaltenen Ergebnisse ⁴⁸. So konnten Jin et al. demonstrieren, daß es sich bei den vermeintlichen distalen 6q Deletionen eigentlich um balancierte Translokationen zwischen dem langen Arm von Chromosom 6 und dem kurzen Arm von Chromosom 9 handelte. Die Befunde der CGH konnten nicht nur die genannten Chromosom 6q-Anomalien bestätigen sondern weitere zytogenetische Abnormalitäten nachweisen. Neuere CGH-Befunde beinhalten DNA-Kopieverluste am Chromosom 12q12-q13 ⁴⁹ und 1p32-36 ⁵⁰ und Additionen am Chromosom 22q12-q13 ^{51, 52}, 8 ⁵⁰, 16p ⁵¹, 17q ⁵¹ und 18 ⁵⁰. Eine ausführlichere Charakterisierung des genetischen Profils des adenoid-zystischen Karzinoms konnte durch Frierson et al ⁵³ und Patel et al ⁵⁴ unter Verwendung der Oligonukleotid-Microarray-Analyse erzielt werden. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, daß adenoid-zystische Karzinome aus gut differenziertem Speicheldrüsenewebe stammen welches nach Entdifferenzierung Frühwachstums-assoziierte Gene exprimiert. Die Tumore zeigten ein hohes Expressionsniveau für die transkriptionellen Faktoren SOX4 und AP-2c und für Gene vom Wnt/Beta-catenin Signaltransduktionsweg ⁵⁵. Zusätzlich gibt es eine Überexpression von Genen die in der Morphogenese, Muskelwachstum, Neurogenese und Proliferation involviert sind ⁵⁴. Eine weitere Technik die häufig zur Validierung und Vervollständigung von CGH und Mikroarray benutzt wurde ist die Mikrosatelliten LOH-Analyse ^{56, 57, 58}. Unter der Verwendung von Mikrosatelliten-Marker-Mapping hat LOH wesentlich zur Identifikation von chromosomalen Regionen in adenoid-zystischen Karzinomen beigetragen in denen ein Verlust von Tumorsuppressor-Genen nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend, ist die Anzahl der genetischen Alterationen in adenoid-zystischen Karzinomen relativ gering

verglichen mit anderen Speicheldrüsentumoren. Dies lässt vermuten, daß andere onkogenetische Mechanismen die durch zytogenetische Methoden nicht detektiert werden können, wie z.B. Genmutationen, epigenetische Regulation oder eine virale Genese bei der Entstehung adenoid-zystischer Karzinome eine erhebliche Rolle spielen könnten.

Aus anderen Tumortypen ist heutzutage bekannt, daß die Aktivierung von zellulären Überlebenssignaltransduktionskaskaden (engl. survival pathways) mit konsekutiver Suppression der apoptotischen Prozesse einen wichtigen Schritt in der Karzinogenese darstellt. Ähnliche Mechanismen werden auch bei der Onkogenese der adenoid-zystischen Karzinome postuliert. Hier scheinen diverse Entwicklungsproteine, Wachstumsfaktore und Signalmoleküle von Bedeutung zu sein. SOX4^{59, 60}, c-kit^{61, 62, 63} und MYB^{64, 65, 66} sind wichtige Entwicklungsproteine die in Zusammenhang mit der Entstehung von adenoid-zystischen Karzinomen gebracht wurden.

Eine andere Gruppe von Genen die möglicherweise bei der Onkogenese adenoid-zystischer Karzinome eine Rolle spielen, sind die Wachstumsfaktoren und die entsprechenden Rezeptoren. Dazu gehören EGF (epidermal growth factor) und EGF-Rezeptor, VEGFs (vascular endothelial growth factors) und VEGF-Rezeptoren sowie NGFs (nerve growth factors)^{67, 68, 69}.

In der Familie der EGFRs ist eine Überexpression von EGFR (ErbB1) in den adenoid-zystischen Karzinomen bekannt⁶⁹. Obwohl die Expression vom protoonkogenen HER2 (ErBb2) bei Speicheldrüsenkarzinomen ein prognostisch günstiger Marker zu sein scheint⁷⁰ wird die Bedeutung seiner Expression bei adenoid-zystischen Karzinomen kontrovers diskutiert^{70, 71, 72}. Bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen korreliert das Ausmaß der Expression von EGFR und transforming growth factor-alpha negativ mit der Überlebenserwartung⁷³. Interessanterweise gibt es bei Speicheldrüsenmalignomen, inkl. adenoid-zystischen Karzinomen eine Korrelation nur mit dem histologischen Grading aber nicht mit der Prognose der Erkrankung⁷⁴.

Mutationen an Signalmolekül-Komponenten vom Wnt/Beta-catenin Signaltransduktionsweg sind charakteristisch für multiple Neoplasien⁷⁵ und konnten neuerdings auch bei adenoid-zystischen Karzinomen nachgewiesen werden^{76, 77}.

Der funktionelle Verlust von Tumorsuppressor-Genen nimmt eine große Bedeutung in der Pathogenese vieler Malignome ein. P53, lokalisiert am Chromosom 17p13, ist das am häufigsten nachgewiesene, mutierte Gen in humanen Neoplasien. Im Falle von DNA-Schäden akkumuliert p53

häufig im Zellkern und verursacht einen G1-Arrest durch eine Induktion von p21-Protein, einem potenten Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen. Wenn keine DNA-Reparatur stattfindet, induziert p53 normalerweise Apoptose^{78, 79, 80}. Zellen mit p53-Mutationen lassen also die Replikation von geschädigter DNA zu und sind zusätzlich apoptoseunfähig. Dies begünstigt die Tumorentstehung und –progression. Die Literaturangaben zur p53-Expression bei adenoid-zystischen Karzinomen variieren zwischen 0% und 80%⁸¹⁻⁸⁷. Veränderungen des p53 korrelieren mit zunehmend fortgeschrittenen Erkrankungsstadien⁸⁸. In einer Studie wurde beschrieben, daß 57,1% der Rezidiv-adenoid-zystischen Karzinome p53-Alterationen aufwiesen, wogegen die Inzidenz bei den Primärtumoren nur bei 14,3% lag⁸¹. Diese Daten sprechen dafür, daß p53-Mutationen möglicherweise nicht so sehr in der Onkogenese sondern eher bei der Tumorprogression und –rezidivierung beteiligt sind. Ein weiteres, für die Onkogenese wichtiges Supressor-Gen ist p16^{INK4A} das im Chromosom 9p21 lokalisiert ist. Das durch p16^{INK4A} kodierte Protein hemmt die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 die wiederum für die Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins (Rb) notwendig sind. Hypophosphoryliertes Rb induziert G1-Arrest im Zellzyklus^{88, 89, 90}. p16^{INK4A} wird gleichzeitig negativ durch pRb rückreguliert. Ein funktioneller Verlust von p16 ist bei vielen Neoplasien bekannt, mitunter auch bei Kopf-Hals-Karzinomen^{91, 92, 93}. Die Inzidenz von p16^{INK4A} –Alterationen bei adenoid-zystischen Karzinomen liegt zwischen 14%-20%^{94, 95}. Ein funktioneller Verlust von p16^{INK4A} steht in Assoziation mit Krankheitsprogress und erhöhter Zellproliferation⁹⁴.

FHIT und WWOX sind weitere Tumorsuppressor-Gene, die die fragilen Segmente FRA3B und FRA16D an den Chromosomen 3p14.2 und 16q23.2 steuern. Diese Regionen reagieren besonders empfindlich auf chemische, virale und Umwelteinflüsse. Dincer et al⁹⁶ konnten immunhistochemisch zeigen, daß die Expression von FHIT und WWOX bei adenoid-zystischen Karzinomen signifikant reduziert ist. CyclinD1 ist ein weiteres Zellzyklus-Regulationsprotein welches den Proliferationszyklus fördert. Eine Überexpression von CyclinD1 in adenoid-zystischen Karzinomen wurde in Zusammenhang mit höherem histologischen Tumorgrading und höherer Proliferationsrate gebracht⁹⁴.

Veränderungen in einer Reihe von Adhäsionsmolekülen spielen offensichtlich eine Rolle in den späten Stadien der Tumorprogression, bei der zellulären Entdifferenzierung, der lokalen Invasion und einer metastatischen Streuung. Verlust der Adhäsion ermöglicht den neoplastischen Zellen, sich vom Primärtumor zu trennen, durch die extrazelluläre Matrix zu wandern und sich an anderer Stelle

abzusiedeln ⁹⁷. Zu den Gruppen der Adhäsionsmoleküle, die bereits bei adenoid-zystischen Karzinomen untersucht wurden gehören Cadherine, Integrine und die Familie der Immunglobulin-Rezeptoren. E-Cadherin, ein transmembranales Glykoprotein wird in Epithelzellen exprimiert und vermittelt eine kalziumabhängige interzelluläre Adhäsion. In adenoid-zystischen Karzinomen scheint E-Cadherin nur bei der späten Tumorprogression von Bedeutung zu sein. Franchi et al ⁹⁸ konnten zeigen, daß E-Cadherin-Expression umgekehrt proportional zur Fernmetastasierungsfrequenz ist. Eine geringere E-Cadherin-Expression ist deshalb mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Das B-6-Integrin ist eine Untereinheit eines Integrin-Heterodimers und wird in Epithelzellen während der Gewebereparatur oder Onkogenese exprimiert ⁹⁹. Westernoff et al ¹⁰⁰ fanden bei malignen Speicheldrüsentumoren inklusive adenoid-zystischen Karzinomen eine höhere B-6-Integrin Expressionsrate als bei den gutartigen Neubildungen. Dies lässt vermuten, daß B-6-Integrin im Zusammenhang mit der Invasivität der Malignome stehen könnte. Zu den Adhäsionsmolekülen der Familie der Immunglobulin-Rezeptoren gehören das neural cell adhesion molecule (NCAM), homing cell adhesion molecule (HCAM), platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) und intercellular adhesion molecule (ICAM-1). NCAM wird von peripheren Neuroaxonen exprimiert, seine Nachweisrate bei adenoid-zystischen Karzinomen schwankt laut Literatur zwischen 31%-100% ¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Trotzdem konnte keine Korrelation zum Ausmaß der perineuralen Invasion oder Rezidivierungstendenz beobachtet werden ^{101, 103}. HCAM, PECAM-1 und ICAM-1 sind ebenfalls untersucht worden, es konnte jedoch kein Einfluß auf die Invasivität oder Rezidivbildung nachgewiesen werden ^{101, 104}.

Die Rolle von mitochondrialen Mutationen in der Karzinogenese ist ein relativ neues und sich entwickelndes Forschungsgebiet. Mithani et al ¹⁰⁵ stellten mittels einer Genomsequenzanalyse fest, daß 17 von 22 untersuchten adenoid-zystischen Karzinomen mitochondriale Mutationen trugen. Die meisten davon waren im NADH-Komplex in einer Genomregion namens D-Loop lokalisiert.

Alle vorgenannten chromosomalen und genetischen Veränderungen führen zu zellulären Veränderungen die durch unterschiedliche Biomarker detektiert werden können. Von den wenigen Markern die einen prognostischen Wert für adenoid-zystische Karzinome besitzen seien an dieser Stelle Ki-67 ^{106, 107}, p63 ¹⁰⁸ und terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) ¹⁰⁶ genannt. Der am häufigsten verwendete, prognostisch bedeutsame Biomarker für adenoid-zystische Karzinome ist Ki-67 dessen Korrelation mit steigender Proliferationsrate bei mehreren Malignomen bekannt ist. Unter den Speicheldrüsentumoren ist Ki-67

bei adenoid-zystischen Karzinomen deutlich höher exprimiert als z.B. bei niedrig-malignen Adenokarzinomen^{109, 110}, so daß anhand der Färbung gut zwischen den beiden Entitäten unterschieden werden kann. Außerdem korreliert die Ki-67-Expressionsrate bei den adenoid-zystischen Karzinomen eindeutig mit der Überlebensprognose^{106, 107}. P63 ist ein etablierter Marker, der in den Basalzellen normaler Speicheldrüsen vorkommt. Eine hohe p63-Expression korreliert bei adenoid-zystischen Karzinomen ebenfalls mit einer reduzierten Lebenserwartung¹⁰⁸. Eine positive TUNEL-Färbung ist ein Indikator für Apoptose. Eine hohe Apoptoserate (hoher Anteil TUNEL-positiver Zellen) bei adenoid-zystischen Karzinomen geht mit einer erhöhten Metastasierungstendenz, extrakapsulärem Wachstum, hohem Tumorstadium und -grading einher, während sich die Lebenserwartung umgekehrt proportional verhält¹⁰⁶.

1.4 Humane Papillomviren (HPV)

HPV wurden auf Grund ihrer epidemiologischen Assoziation mit Zervixkarzinomen und ihren mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesenen transformierenden Mechanismen als Karzinogene für den Menschen klassifiziert. In 99,7% der Zervixkarzinome¹¹¹ und in einem hohen Anteil weiterer Tumorentitäten lassen sich Hochrisiko- (HR)- HPV-DNA Sequenzen nachweisen. Der ursächliche Zusammenhang von HR-HPV Infektion und Karzinogenese gilt für Zervixkarzinome und Tonsillenkarzinome als gesichert. Dabei haben verschiedene HPV-Typen ein unterschiedliches karzinogenes Potential. HPV16 und HPV18 zeigen die höchste Prävalenz in Zervixkarzinomen und Infektionen mit diesen beiden Typen vermitteln das höchste Risiko zur Transformation¹¹². Andere karzinogene HPV-Typen führen seltener zu Karzinomen. Dies bildet die Rationale eines HPV-Nachweises im Screening und einer HPV-Typisierung als möglichen prognostischen Faktor bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), den obligaten Vorstufen der Zervixkarzinome.

Bei HPV handelt es sich um unbehüllte Viren mit ringförmiger Doppelstrang-DNA, die zur Familie der Papillomaviridae gehören. Es sind mittlerweile über 100 Genotypen bekannt. Während sich die „low-risk“-Typen in benignen genitalen Läsionen sowie im Kopf-Halsbereich bei der Larynxpapillomatose nachweisen lassen, wurden HPV-Typen mit hohem Transformationspotential

in malignen intraepithelialen Neoplasien sowie invasiven Karzinomen der Zervix und des HNO-Bereiches gefunden. Die Infektion findet durch das Erreichen der teilungsfähigen Basalzellschicht statt. Diese ist möglicherweise im Bereich der Transformationszone zwischen Platten- und Zylinderepithel leichter zugänglich. Nach Infektion der Zellen wird HPV-DNA freigesetzt und der Replikationsapparat der Wirtszelle benutzt. Die Virus-DNA beinhaltet unterschiedliche Gen-Regionen welche je nach Zeitpunkt der Expression in frühe Gene (early genes, E) und späte Gene (late genes, L) unterteilt werden.

Die beiden wichtigsten, von HR-HPV-Typen stammenden viralen Onkogene sind das E6 und E7. Das E6-Protein inaktiviert p53 und inhibiert damit die Apoptose, während das E7-Protein durch Interaktion mit pRb den Zellzyklus aktiviert. Im Zusammenspiel immortalisieren sie die Zelle und durch die induzierte genetische Instabilität wird die Tumorprogression verstärkt. Diese beiden viralen Proteine stellen auch die wichtigsten Tumorantigene von Zervixkarzinomzellen dar.

Infektionen mit mukosalen HPV-Typen wurden in einer Vielzahl epidermaler Tumore nachgewiesen. Neben Infektionen im Anogenitalbereich (Zervix, Vagina, Vulva, Penis, Anus) wurden sie auch in oropharyngealen Tumoren (Tonsille, Zungengrund) und zu einem geringeren Prozentsatz (ca. 20%) im Larynx gefunden ¹¹³. Tonsillenkzinome sind mit einer Prävalenz von 50%-70% von den Tumoren im Hals-Nasen-Ohrenbereich am häufigsten HPV-assoziiert. In ca. 90% davon lässt sich HPV16 nachweisen, was deutlich häufiger als bei Zervixkarzinomen mit ca. 50% HPV-16-Positivität ist ¹¹⁴. Kutane HPV-Typen sind mit den Krankheitsbildern der Verrucae vulgares, Verrucae plantares, Verrucae planae juvenilis und der Epidermodysplasia verruciformis assoziiert.

HPV-positive unterscheiden sich von HPV-negativen Oropharynxkarzinomen bezüglich ihrer klinisch-pathologischen Charakteristika, der Expression verschiedener Zell-Zyklusproteine, sowie aufgrund genetischer Veränderungen. Bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen besteht eine hohe Korrelation zwischen p16-Expression und dem Vorhandensein von onkogener HPV-DNA ¹¹⁵. Es ist bekannt, dass transkriptionell aktive HPV16-E7-positive Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich in 90% der Fälle p16 koexprimieren. Eine Inhibition des Tumorsuppressorproteins pRb durch HPV16 E7 führt zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und zu einer Hochregulation von p16 durch den Verlust der negativen Expressionskontrolle durch pRb. P16 wird

deshalb als ein, der HR-HPV-Typisierung äquivalenter Marker, der für die routinemäßige histopathologische Diagnostik geeignet ist, angesehen ¹¹⁵. HR-HPV und p16-Positivität bei diesen Tumoren sind mit einer besseren Prognose verbunden ^{116, 117}, was eine Abgrenzung zu den ätiologisch unterschiedlichen, noxeninduzierten Oropharynxkarzinomen klinisch bedeutsam macht. Die Prognose verändert sich auch in Abhängigkeit von der EGFR-Expression. So konnte bei nachgewiesener p16-Expression und gleichzeitigem Nachweis onkogener HPV-DNA eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für ein 5-Jahres-Überleben als bei für diese Marker negativen Karzinomen nachgewiesen werden (84% versus 49%). Diese Überlebensrate wurde noch in den Fällen übertroffen, in denen o. g. Marker mit hoher EGFR-Expression kombiniert auftraten (5-Jahres-Überlebensrate von 93%). Nur EGFR-positive Tumore (p16-/HPV-) zeigten einen Trend zu einer niedrigeren 5-Jahres-Überlebensrate ¹¹⁶.

1.5 Zielsetzung

Derzeit stehen keine Forschungsergebnisse über eine eventuelle Assoziation zwischen HPV und adenoid-zystischen Karzinomen zur Verfügung. Lediglich in einer Gruppe von 47 Malignomen der kleinen Speicheldrüsen konnte neuerdings eine positive p16-Färbung in 38 Fällen nachgewiesen werden ¹¹⁸. In einer weiteren Arbeit aus der Gruppe Vageli et al ¹¹⁹ wurden in einem Kollektiv von 9 Neubildungen der Glandula Parotidea 7 HPV-positive Präparate gefunden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Prävalenz von onkogenen HPV in adenoid-zystischen Karzinomen und die Typisierung bzw. Kategorisierung der nachweisbaren Virus-Genotypen. Die Positivität und Expressionsrate weiterer Biomarker wie p16, p53, Ki-67 und EGFR soll bestimmt werden sowie eine mögliche Korrelation zwischen HR-HPV-Nachweis und dem Expressionsverhalten der vorgenannten Biomarker. Zu überprüfen sind ebenso eventuelle Zusammenhänge in der Expression unterschiedlicher Marker in Abhängigkeit voneinander. Analysiert wird weiterhin die Verteilung all dieser Parameter in unterschiedlichen Geschlechter- und Altersgruppen, Tumorstadien und -lokalisationen. Weitere Aspekte sind der Einfluss von HPV-Positivität sowie einer p16-, p53-, Ki-67 und EGFR-Expression auf die Prognose der Erkrankung. Ferner ist von besonderem Interesse die Untersuchung der Prävalenzunterschiede von HPV und den

Expressionsmustern der untersuchten Biomarker zwischen Primärtumoren und ihren Rezidiven bzw. Metastasen.

Perspektivisch soll die vorliegende Arbeit die Grundlage für eine Entwicklung von neuen Therapieansätzen, wie z.B. Vakzinierungsstrategien und die Übertragung von für andere Tumorentitäten etablierten Therapiemodalitäten, wie z. B. anti-EGFR wirksame Substanzen auf die Behandlungsstrategie der adenoid-zystischen Karzinome legen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie umfasste 67 Patientinnen und Patienten die im Zeitraum von 1982 bis 2007 in den Abteilungen für HNO-Heilkunde und Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Klinikums Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, aufgrund eines adenoid-zystischen Karzinoms der Kopfspeicheldrüsen in Behandlung waren. Die Datenanalyse erfolgte retrospektiv nach Erhalt des entsprechenden Votums der zuständigen Ethikkommission. Die Ermittlung dieser Patientengruppe erfolgte durch die Erfassung aller histologischen Präparate die in diesem Zeitraum im Institut für Pathologie des Klinikums mit oben genannter Diagnose begutachtet wurden.

Die anamnestischen und demographischen Daten wurden aus den ambulanten und stationären Patientenakten der behandelnden Kliniken erhoben. Diese Akten wurden nach Anforderung vom Datenarchiv der Charité zur Verfügung gestellt. Ein Teil der Patientenakten konnte in digitalisiertem Format über das elektronische Patientenarchiv (PEGASOS) der Charité eingesehen werden. Zusätzlich konnten die Daten der letzten 10 Jahre über die elektronische Patientenakten-Software des Klinikums (SAP) eingesehen und überprüft werden.

Angaben zum Tumorstadium, -lokalisierung, -diagnosedatum, Behandlungsmodalitäten, Auftreten von Rezidiven und Metastasen wurden den in den Akten vorhandenen Arztbriefen, Operationsprotokollen, radiologischen Befundberichten sowie der ambulanten Verlaufsdokumentation im Rahmen der Tumornachsorge entnommen. Die Angaben zum TNM-Stadium wurden anhand der 5. Auflage der Tumorklassifikation der UICC überprüft bzw. vervollständigt¹³⁴.

Hatten sich Patienten im Verlauf länger nicht mehr in der Tumorsprechstunde vorgestellt bzw. fehlten Angaben zum aktuellen klinischen Status, wurden die behandelnden Fachärzte sowie die Patienten selbst telefonisch kontaktiert und der Krankheitsverlauf ggf. mit erneuter ambulanter Einbestellung und Untersuchung, ermittelt. Bei verstorbenen Patienten wurden, sofern keine weitere Information vorlag, der behandelnde Hausarzt oder Facharzt sowie die Angehörigen telefonisch kontaktiert und der Zeitpunkt bzw. Ursache des Todes erfragt.

Weitere Angaben zum Todeszeitpunkt wurden nach entsprechender Anfrage bei dem Deutschen Nationalen Krebsregister übermittelt. Diese Daten wurden mit dem internen Datenarchiv vom Charité Comprehensive Cancer Center Berlin verglichen.

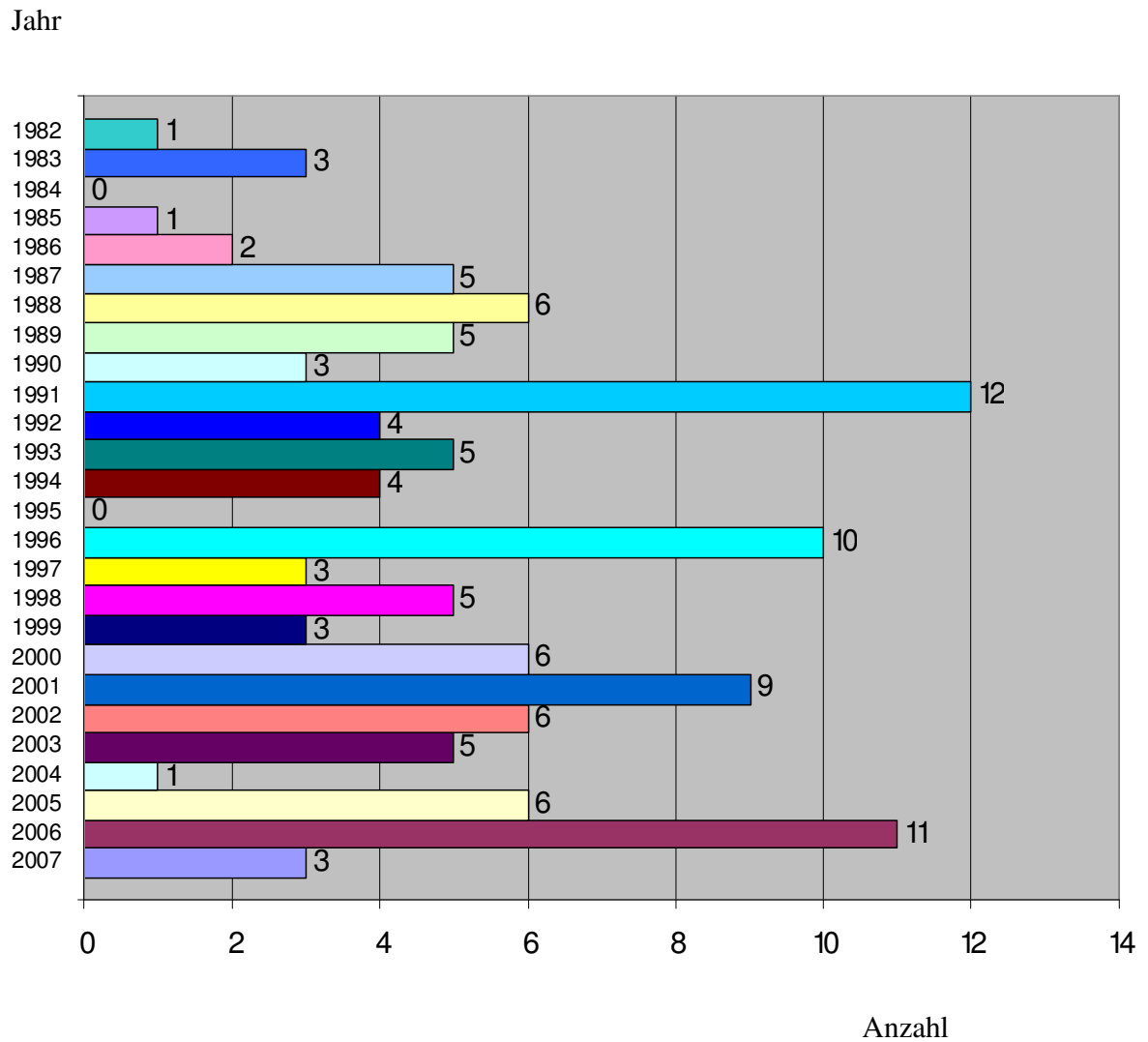


Abb. 1: Rekrutiertes Patientenkollektiv. Zeitpunkt der Erstdiagnose und Anzahl der initial verfügbaren Tumorproben pro Jahr.

2.2 Elektronischer Datenbogen

Für alle 67 Patienten wurden die Daten mittels eines elektronischen Bogens erfasst und in Form einer Tabelle zusammengestellt. Der Datenbogen umfasste folgende Angaben:

- Name, Vorname
- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Behandelnde Abteilung
- Alter bei Erstdiagnose
- Altersgruppe (1: bis 30, 2: 31-45, 3: 46-60, 4: 61-75, 5: ab 76)
- Tumorlokalisierung (Gl. Parotidea, Gl. Submandibularis, Gl. Sublingualis, kleine Speicheldrüsen)
- T-Stadium
- N-Stadium
- M-Stadium
- R-Status
- Tumorcharakter (Primärtumor, Rezidiv, Metastase)
- HPV-Status und Typ
- p16-Expression
- p53-Expression
- Ki-67-Expression
- EGFR-Expression
- Aktueller Überlebensstatus
- Sterbedatum
- Rezidivdatum
- 2. Rezidivdatum
- Stattgehabte Operationen
- Stattgehabte Radiatio
- Stattgehabte Chemotherapie
- Rezidivfreies Überleben
- Gesamtüberleben

Angaben zu weiteren, von anderen Kopf-Hals-Tumoren bekannten Noxen wie Alkohol- und Tabakkonsum wurden nicht erhoben da eine ätiologische Bedeutung dieser Faktoren für die Entstehung von Speicheldrüsenmalignomen bereits als ausgeschlossen gilt^{39,40}.

2.3 Tumorgewebe

2.3.1 DNA-Extraktion

Aus dem Institut für Pathologie des Klinikums Benjamin Franklin wurden die archivierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten histologischen Präparate der zu untersuchenden adenoid-zystischen Karzinome bezogen. Aus jedem Paraffinblock wurden sechs 5 µm und drei 20 µm dicke Schnitte angefertigt. Zunächst wurden der erste und der letzte Schnitt mittels HE-Färbung auf die Nachweisbarkeit von Tumorgewebe kontrolliert. Die Deparaffinisierung wurde durch Zusatz von 1,5 ml Xylene, Zentrifugation und anschließendem Waschen mit 1 ml purem Ethanol durchgeführt. Als Kontrollgruppe zum Ausschluß einer HPV-Kontamination wurden zwischen den Präparaten der adenoid-zystischen Karzinome multiple HPV-freie Maus-Gewebeproben untersucht. Diese waren stets negativ für HPV und β-Globin. Jede PCR-Analyse beinhaltete außerdem Gewebeproben von HNO-Tumoren mit einer bereits nachgewiesenen HR-HPV-Infektion als positive Kontrolle sowie DNA-freie Proben als Kontaminationskontrolle.

Die Genom-DNA wurde mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), wie vom Hersteller angegeben, extrahiert und in eine 50 µl TE Pufferlösung gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop (NanoDrop products Wilmington, DE, USA) gemessen.

2.3.2 HPV-Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte durch eine generische PCR-Amplifikation der L1-Region des viralen Genoms aller HPV-Typen. Die Genotypenidentifikation wurde mithilfe eines sogenannten „beadbasierten Multiplex-HPV-Genotypisierungs-Assay“ nach dem Luminex-Verfahren, das im Labor für gynäkologische Tumorummunologie (GTI) der Charité Campus Benjamin Franklin etabliert ist und dessen Ergebnisse zur klinischen HPV-Diagnostik validiert sind und auf die unterschiedlichen HPV-Typen hin untersucht, durchgeführt. Mithilfe dieses Ansatzes ist es derzeit

möglich zwischen 27 unterschiedlichen anogenitalen Hoch- und Niedrigrisiko HPV-Typen zu differenzieren. Die Methode erlaubt die Identifikation multipler Infektionen im Hochdurchsatzverfahren.

Hierbei wurden 10 µl von aus paraffineingebetteten ACC-Präparaten extrahierter DNA mittels PCR unter Verwendung der Primer sets BSGP5+/bio BSGP6+ wie von Schmitt et al beschrieben amplifiziert ¹²¹. Parallel dazu wurde eine β-Globin spezifische PCR als Kontrolle durchgeführt. Anschließend wurden 10 µl des jeweiligen biotinylierten PCR-Produktes auf eine 96-Schacht-Platte übertragen und mit Luminex Polystyren-Kügelchen hybridisiert (x-map, BioRad, Munich, Germany). Die Kügelchen sind jeweils mit einer für einen HPV-Genotypen spezifischen Oligonukleotid-Sonde markiert und haben spezifische Fluoreszenzeigenschaften. Für die Analyse wird ein Gemisch aus HPV-Typen-spezifischen Kügelchen verwendet, die 20 Hochrisiko und 7 Niedrigrisiko-HPV-Typen nachweisen können. Nach Färbung mit Streptavidin-PE (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany) wurden die Proben mittels eines Luminex-Ablesers (Fa. BioRad) analysiert. Die Ergebnisse wurden interpretiert als die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von mindestens 50 Kügelchen pro Set. Für jede Probe wurde die Ablesung zweimalig im Rahmen unabhängiger Messungen vorgenommen. Folgende HPV-Subtypen können durch dieses Verfahren unterschieden und genotypisiert werden: HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 26, 53, 66 und LR-HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44 und 70. Eine Probe wurde als positiv bewertet wenn der MFI-Wert mindestens das Dreifache des Hintergrund-MFI-Wertes betrug. Als grenzwertig positiv galt die zweifache Konzentration. Diese Messung erfasst ein Spektrum von 10 bis 1000 HPV-Kopien, in Abhängigkeit vom HPV-Genotypen.

Die DNA-Extraktion und die HPV-Genotypisierung erfolgte im Labor für gynäkologische Tumorummunologie der Charité Campus Benjamin Franklin.

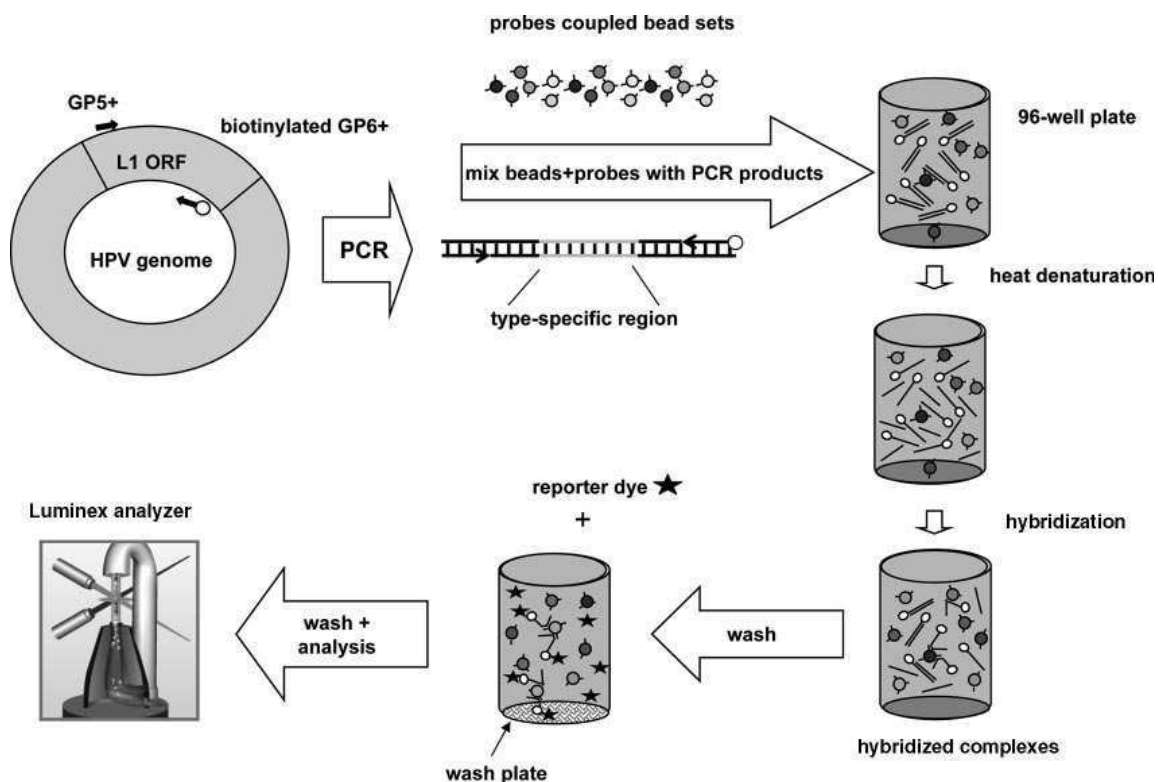


Abb. 2 Schematische Übersicht der HPV-Genotypisierung von BSGP5+/6+ PCR-Produkten mittels bead based multiplex HPV genotyping (Die Abbildung wurde einem Tutorial der Firma Luminex Corp. entnommen) ¹³³.

2.3.3 PCR für DNA-Fragmentierung

Manche formalinfixierte, paraffineingebettete Präparate stammen aus dem Jahr 1982. Die bis 1995 durchgeführte Anwendung von nicht gepuffertem Formalin könnte bei diesen Präparaten zu einer DNA-Fragmentierung und konsekutiv falsch negativen HPV-PCR geführt haben. Aus diesem Grund, wurde bei jeder Probe mit einem negativen β -Globin Ergebnis eine PCR zur Bestimmung des Fragmentierungsausmaßes durchgeführt. Die Anwesenheit von 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp Banden wurde auf einem 2%-Agarose-Gel evaluiert. Da das PCR-Amplifikat der BSGP5+/bio-BSGP6+ Primer eine Größe von 150 bp hat, wurden alle Proben mit Fragmentengrößen unter 200 bp ausgeschlossen. Aufgrund der kleinen Amplifikat-Größe ist diese PCR-Strategie besonders effektiv für die HPV-Detektion auch in degradierten DNA-Proben.

2.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von p16, p53, Ki-67 und EGFR

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Präparate wurden 5 µm dicke Schnitte von Formalin-fixiertem und paraffineingebettetem Gewebe aus der gleichen Schnittserie wie für die DNA-Extraktion verwendet. Diese wurden mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC) behandelt (Vectastain-Elite-ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) und mit einem der folgenden monoklonalen Antikörpern markiert: Maus-anti-p16 Antikörper (CINtec, MTM, Heidelberg, Germany), Maus anti-human EGFR Antikörper (Dako, Glostrup, Denmark), anti-human Ki-67 Antikörper oder monoklonaler anti-human p53-Antikörper (DO-7). Nach einem Waschschrift wurden die Schnitte mit einem sekundär biotinylierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper für 20 Minuten in Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die gebundenen Antikörper mit dem APAAP-Red-Kit (DAKO) inkubiert und sichtbar gemacht. Nachfolgend erfolgte eine Färbung mit Hemalaun. In Vorversuchen wurden die optimalen Antikörper-Konzentrationen mittels Titration bestimmt und für jede Färbung wurden mit Isotypen-spezifischen Antikörpern Kontrollen durchgeführt.

Alle Färbungen wurden durch drei unabhängige, erfahrene und für die klinischen Daten verblindete Untersucher begutachtet und als positiv bewertet wenn nukleäre und zytoplasmatische Färbung im Vergleich zu positiven Kontroll-Proben positiv ausfiel.

Die jeweilige Antikörper-Reaktivität wurde nach folgendem semiquantitativen Bewertungssystem eingeteilt: a) - = positive Zellen < 5%, b) + = positive Zellen ≤50%, c) ++ = 50% bis 90% positive Zellen, d) +++ = >90% positive Zellen.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten zum Teil im Institut für Pathologie sowie durch eine medizinisch technische Assistentin der HNO-Klinik der Charité Campus Benjamin Franklin.

2.4 Statistische Auswertung

Die retrospektiv erhobenen Patientendaten sowie die Ergebnisse histologischer, virologischer und immunhistochemischer Analysen wurden im oben genannten elektronischen Datenbogen erfasst und in ein Datenbanksystem auf der Basis von SPSS (Standardversion, 19.0) übertragen. Die Datenauswertung erfolgte deskriptiv. Als Verfahren der deskriptiven Statistik wurden der Mittelwert, absolute und relative Häufigkeitsverteilung, der Median und die Standardabweichung

verwendet. Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier- und Cox-Regressions-Statistik und die Signifikanz mittels des Long-Rang-Tests errechnet. Zur Korrelationsberechnung wurde der Korrelationkoeffizient R nach Pearson benutzt.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Testverfahren eine absolute Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) festgelegt. Als relative Signifikanz wurde ein Wert von $p < 0,1$ betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs nach Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie umfasste 67 Patientinnen und Patienten die im Zeitraum von 1982 bis 2007 in den Abteilungen für HNO-Heilkunde und Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Klinikums Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, aufgrund eines adenoid-zystischen Karzinoms der Kopfspeicheldrüsen in Behandlung waren. Das Kollektiv beinhaltete 44 Frauen (65,67%) und 23 Männer (34,33%) (Abb. 3). Das Alter bei Erstdiagnose lag zwischen 16 und 90 Jahren, im Mittel 64,2 bei Frauen und 55,9 bei Männern (Tab. 1, Abb. 4)

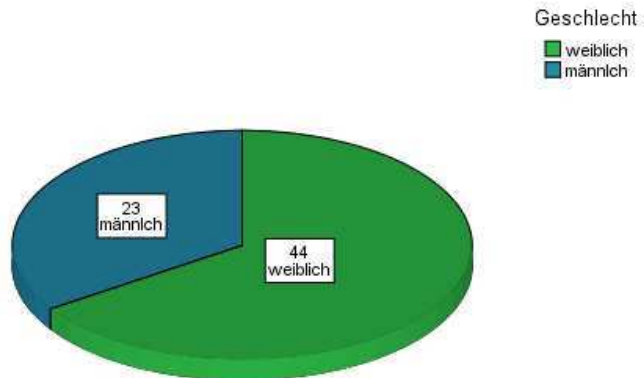


Abb. 3: Geschlechterverteilung Patientenkollektiv.

Tab 1: Patientenalter bei Erstdiagnose.

Geschlecht	Mittelwert	Anzahl	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Weiblich	64,1818	44	14,52868	64,5	25	90
Männlich	55,9130	23	14,09356	58,0	16	78
Insgesamt	61,3433	67	14,81149	61,0	16	90

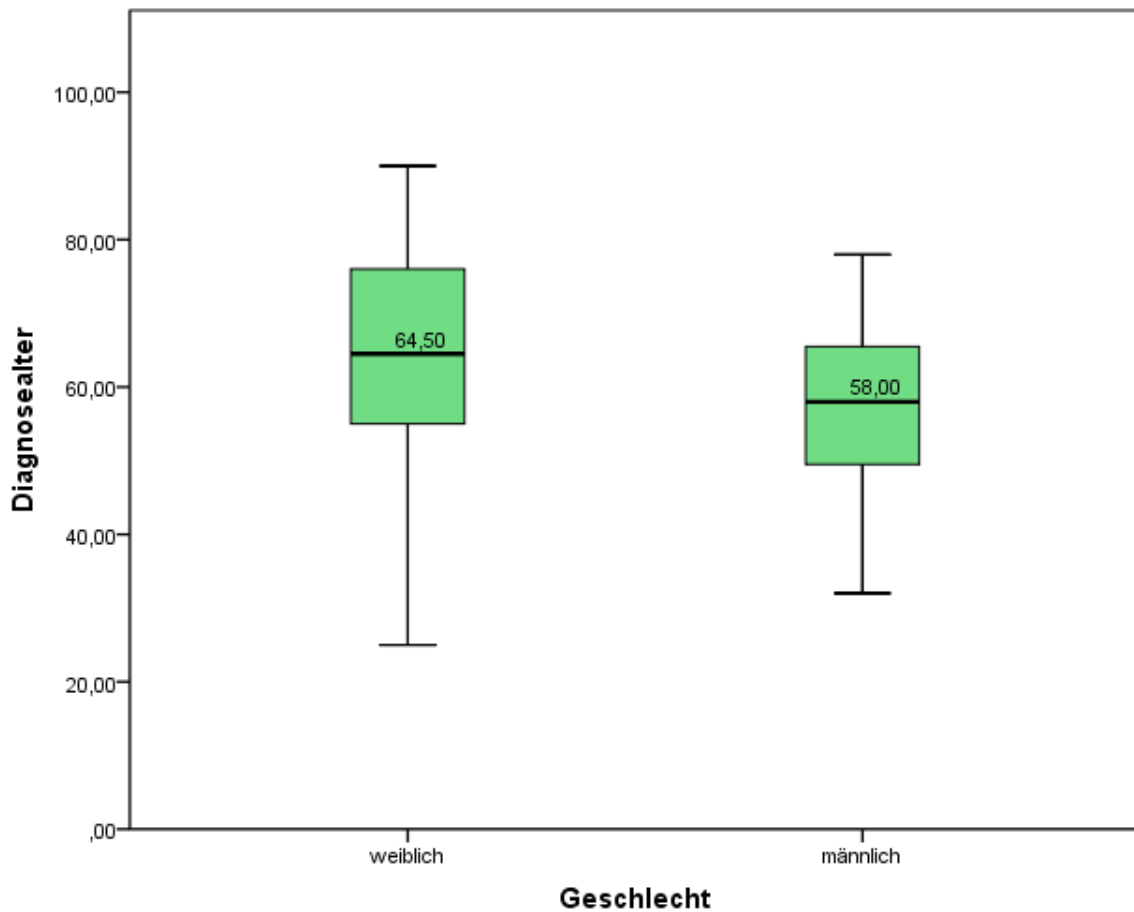


Abb. 4: Altersverteilung und Medianwerte.

Um eine weitere statistische Analyse zu ermöglichen, wurden die Patienten gemäß ihres Alters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in fünf Altersgruppen unterteilt (Gruppe 1: bis 30 Jahre, Gruppe 2: 31 bis 45 Jahre, Gruppe 3: 46 bis 60 Jahre, Gruppe 4: 61 bis 75 Jahre, Gruppe 5: ab 76 Jahren) (Tab 2).

Tab. 2: Altersgruppenverteilung

	Häufigkeit	Prozent
1 (bis 30)	3	4,5
2 (31 - 45)	6	9,0
3 (46 - 60)	23	34,3
4 (61 - 75)	23	34,3
5 (ab 75)	12	17,9
Gesamt	67	100,0

Die Geschlechterverteilung in den unterschiedlichen Altersgruppen ergab signifikante Unterschiede ($p=0,024$). Mit steigendem Alter wurde der Anteil der weiblichen Patienten immer größer (Abb. 5).

Geschlecht / Altersgruppe
Statistik: Anteil

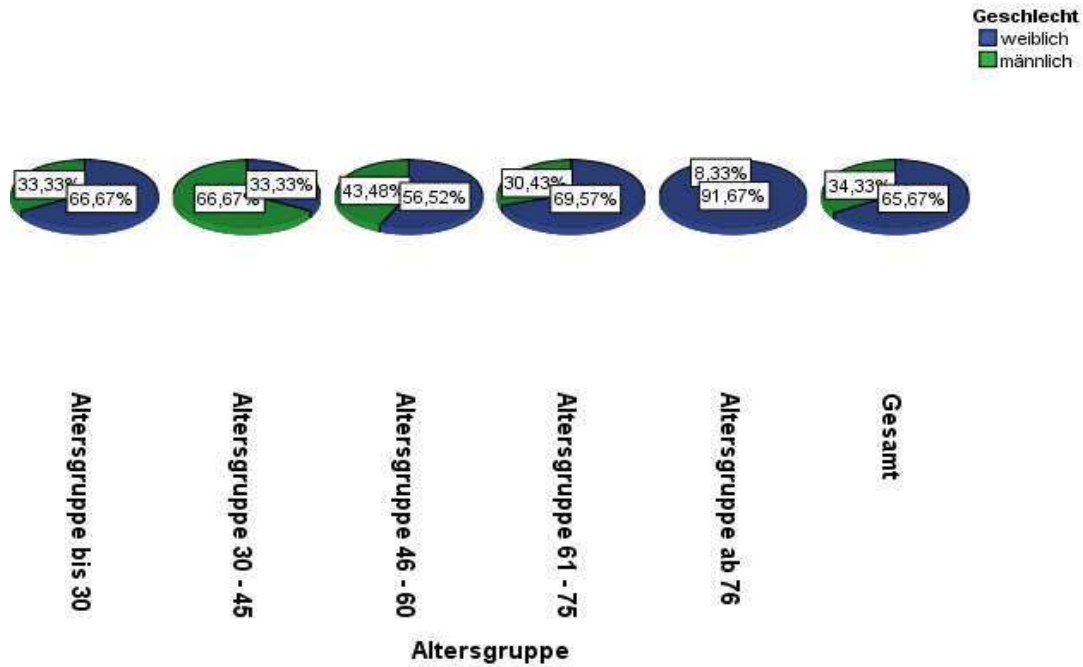


Abb. 5: Geschlechterverteilung in den unterschiedlichen Altersgruppen.

Die Patienten wurden anhand der Lokalisation der Tumor-Erstmanifestation in Subgruppen unterteilt. So gingen 40 (59,75%) der Tumore von den kleinen Speicheldrüsen, 17 (25,4%) von der Glandula Parotidea und 10 (14,9%) von der Glandula Submandibularis aus (Tab.3).

Tab. 3: Tumorlokalisation

	Häufigkeit	Prozent
Gl. Parotidea	17	25,4
Kleine Speicheldrüsen	40	59,7
Gl. Submandibularis	10	14,9
Gesamt	67	100,0

Die Verteilung der Tumorlokalisationen in den unterschiedlichen Geschlechter- und Altersgruppen ist den Abbildungen 6-7 zu entnehmen. Die Verteilung der unterschiedlichen Tumorlokalisationen war weitgehend unabhängig vom Geschlecht. Bei Frauen wurden etwas häufiger aus der Glandula Parotidea ausgehende Tumore beobachtet während bei Männern der Anteil der Tumore der Glandula Submandibularis etwas größer war (Abb. 6). In den unterschiedlichen Altersgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tumorverteilung in den unterschiedlichen Lokalisationen (Abb. 7).

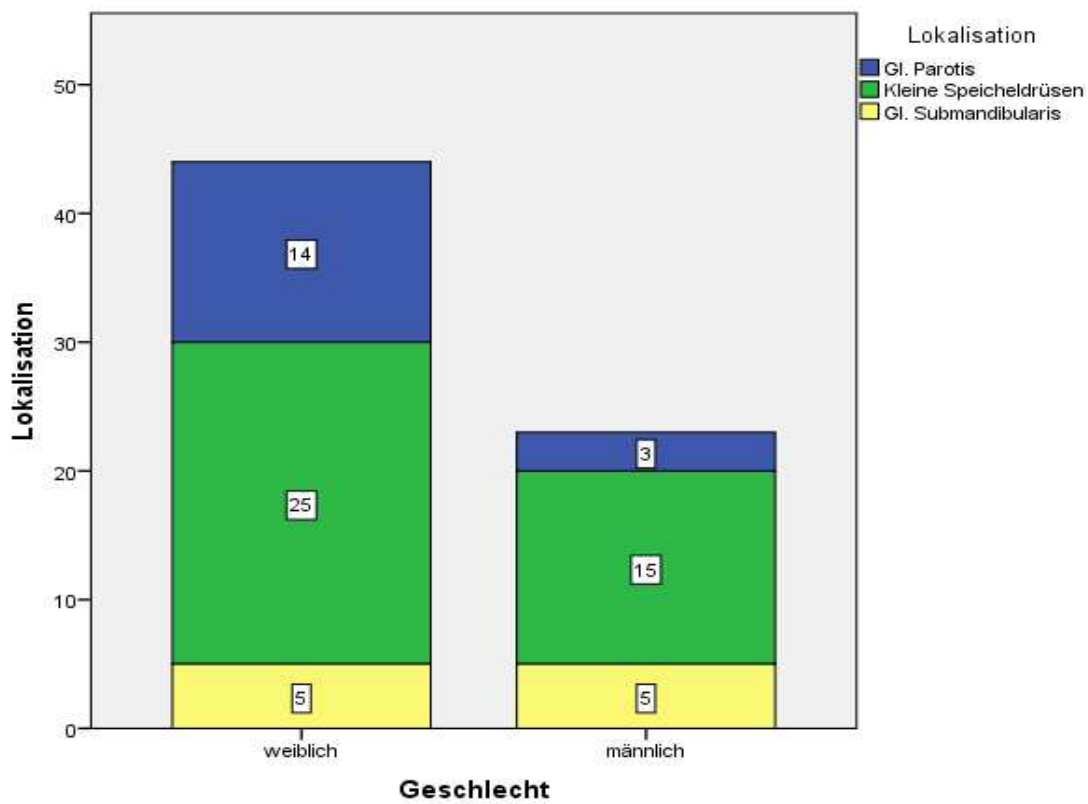


Abb. 6: Geschlechterverteilung in Relation zu den Tumorlokalisationen.

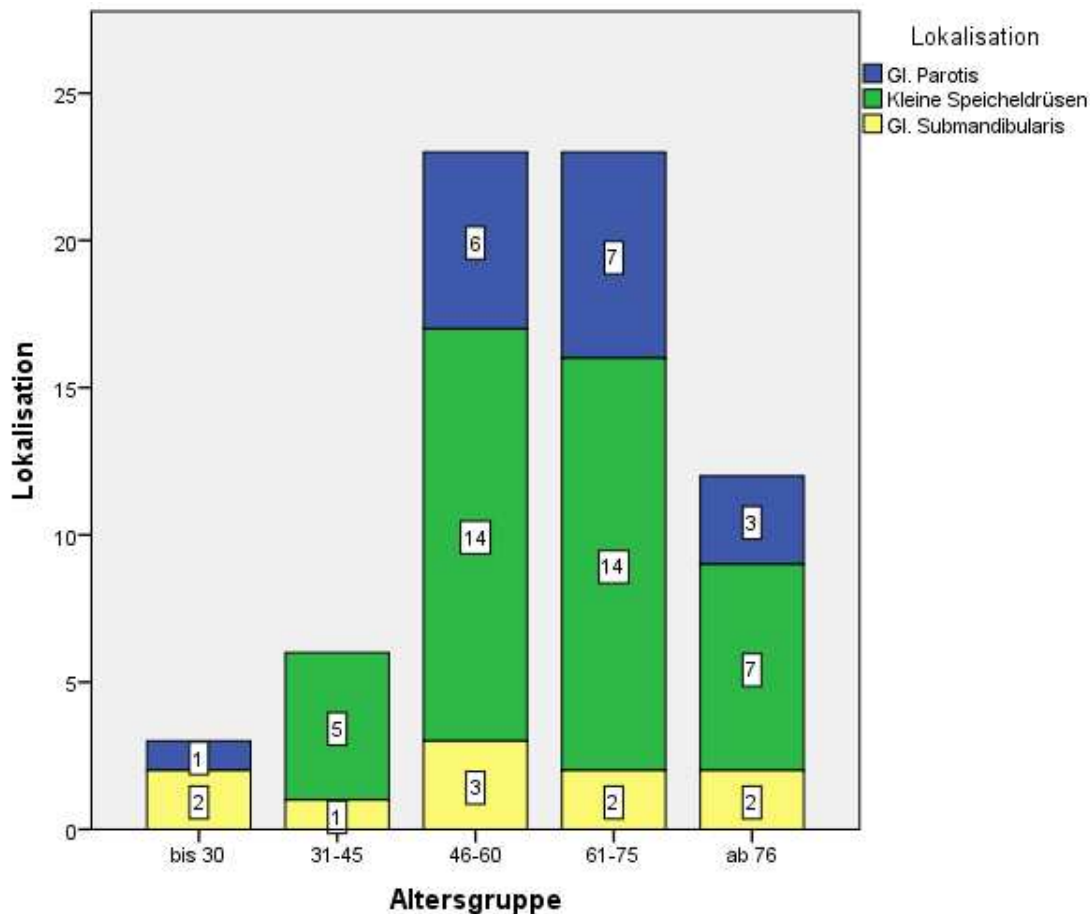


Abb. 7: Tumorlokalisationen in Relation zur Altersgruppenverteilung.

3.2 Tumorstadien gemäß der TNM- Klassifikation

Zum Zeitpunkt der Diagnose befanden sich 8 Tumore im T-Stadium T1, jeweils 13 Tumore in den Stadien T2 und T3 und 31 Tumore hatten bereits das Stadium T4 erreicht. Bei zwei Patienten konnte das T-Stadium retrospektiv nicht mehr ermittelt werden (Tab. 4). Bezüglich des zervikalen Lymphknotenstatus zeigten 57 Patienten einen N0-Status, 3 Patienten einen N1-Status und 5 Patienten einen N2-Status. In zwei Fällen war das N-Stadium unklar (Tab. 5). Eine bereits bei Diagnosestellung aufgetretene Fernmetastasierung kam bei 6 Patienten vor (M1), wohingegen bei

59 Patienten ein M0-Status vorlag. In zwei Fällen konnte das M-Stadium nicht ermittelt werden (Tab. 6).

Tab. 4: T-Stadium

	Häufigkeit	Prozent
T1	8	11,9
T2	13	19,4
T3	13	19,4
T4	31	46,3
Tx	2	3,0
Gesamt	67	100,0

Tab. 5: N-Stadium

	Häufigkeit	Prozent
N0	57	85,1
N1	3	4,5
N2	5	7,5
Nx	2	3,0
Gesamt	67	100,0

Tab. 6: M-Stadium

	Häufigkeit	Prozent
M0	59	88,1
M1	6	9,0
Mx	2	3,0
Gesamt	67	100,0

Die Häufigkeitsverteilung der T-, N- und M-Stadien bezogen auf die unterschiedlichen Tumorlokalisationen lassen sich den Tabellen 7-9 entnehmen.

Tab. 7: T-Stadium in Relation zur Tumorlokalisation *.

	Anzahl n (%)			Gesamt
	Gl. Parotidea	Kleine Speicheldrüsen	Gl. Submandibularis	
T1	2 (11,8)	5 (12,5)	1 (10)	8 (11,9)
T2	3 (17,6)	6 (15)	4 (40)	13 (19,4)
T3	3 (17,6)	8 (20)	2 (20)	13 (19,4)
T4	8 (47,1)	20 (50)	3 (30)	31 (46,3)
Tx	1 (5,9)	1 (2,5)	0	2 (3)
Gesamt	17	40	10	67

* keine Signifikanz zwischen T-Stadium und Lokalisationsverteilung.

Tab. 8: N-Stadium in Relation zur Tumorlokalisation *.

	Anzahl n (%)			Gesamt
	Gl. Parotidea	Kleine Speicheldrüsen	Gl. Submandibularis	
N0	14 (82,4)	35 (87,5)	8 (80)	57 (85)
N1	0	3 (7,5)	0	3 (4,5)
N2	2 (11,8)	1 (2,5)	2 (20)	5 (7,5)
Nx	1 (5,9)	1 (2,5)	0	2 (3)
Gesamt	17	40	10	67

* keine Signifikanz zwischen N-Stadium und Lokalisationsverteilung.

Die Häufigkeitsverteilung sowohl der T- als auch der N-Stadien verhielt sich ähnlich bei allen Tumorlokalisationen. In Bezug auf das M-Stadium fand sich ein relativ höherer Anteil fernmetastasierter Tumore in den kleinen Speicheldrüsen. In ihnen waren fünf der insgesamt sechs zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasierten Tumore lokalisiert (Tab. 9).

Tab. 9: M-Stadium in Relation zur Tumorlokalisation.

	Anzahl n (%)			Gesamt
	Gl. Parotidea	Kleine Speicheldrüsen	Gl. Submandibularis	
M0	16 (94,1)	34 (85)	9 (90)	59 (88)
M1	0	5 (12,5)	1 (10)	6 (9)
Mx	1 (5,9)	1 (2,5)	0	2 (3)
Gesamt	17	40	10	67

3.3 HPV Prävalenz

Bei der HPV-Bestimmung und -typisierung konnten bei 25 (37,3%) von 67 Patienten HR-HPV-Virustypen nachgewiesen werden. In 16 Fällen wurde HPV16, in 4 Fällen HPV18, in zwei Fällen HPV45, in einem Fall HPV45 und HPV56 und in zwei Fällen HPV33 und HPV59 detektiert. Bei drei Patienten wurde eine Infektion mit dem Niedrigrisiko-Genotypus 11 beobachtet. Bei 39 Patienten wurde kein HPV-Genom nachgewiesen (Tab.10, Abb. 8).

Tab. 10: HPV-Typen-Prävalenz.

		Häufigkeit	Prozent
HPV-Typ	HPV-negativ	39	58,2
	11	3	4,5
	16	16	23,9
	18	4	6,0
	45	2	3,0
	45,56 *	1	1,5
	33,59 *	2	3,0
	Gesamt	67	100,0

* Nachweis einer multiplen Infektion

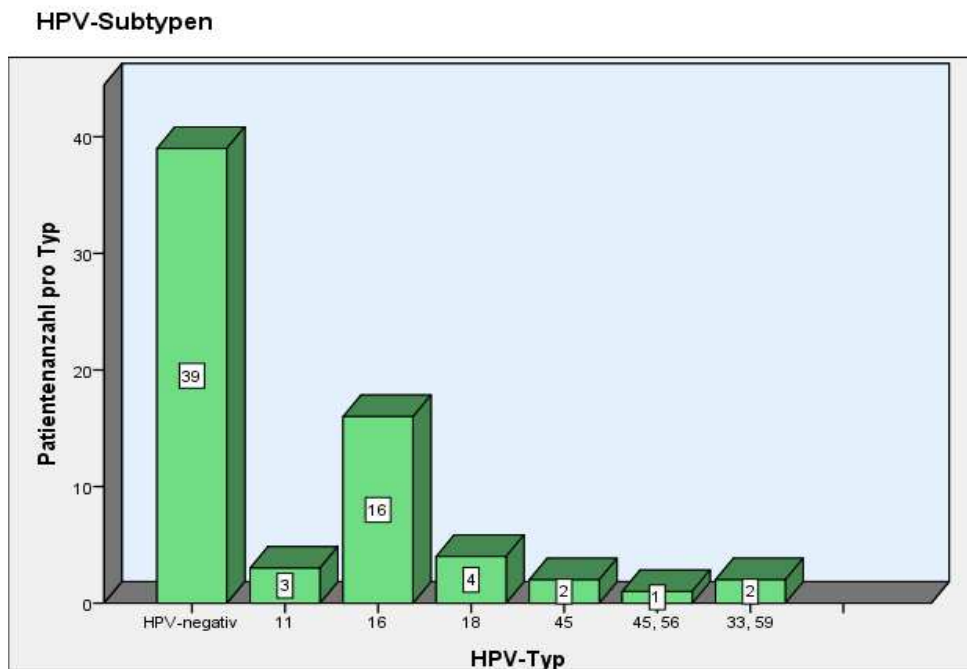


Abb. 8: HPV-Genotypenverteilung.

7 der 23 Männer (30,43%) und 18 der 44 Frauen (40,91%) waren positiv für HR-HPV (Abb. 9)

High_risk_HP/ Geschlecht Kreuztabelle
Statistik: Anteil

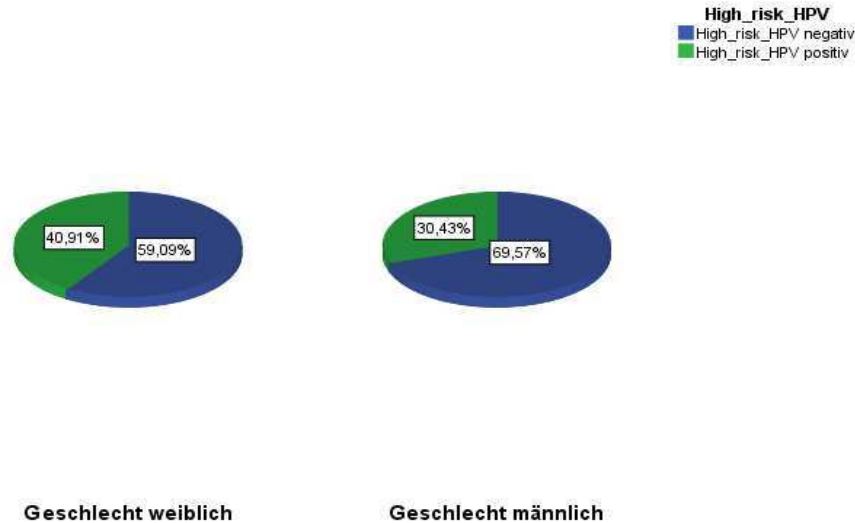


Abb. 9: Geschlechterverteilung der HR-HPV-positiven Tumore.

Bezüglich der HR-HPV-Nachweisrate bei verschiedenen Tumorlokalisationen ergaben sich signifikante Unterschiede. So waren 58,82% der Tumore der Gl. Parotidea, 32,5% der Tumore der kleinen Speicheldrüsen und nur 20% der Tumore der Gl. Submandibularis positiv für HR-HPV (Tab. 11, Abb. 10).

Tab. 11: HR-HPV-Positivität bezogen auf die Tumorlokalisation.

Anzahl

		Lokalisation n (%)			Gesamt
		Gl. Parotidea	Kleine Speicheldrüsen	Gl. Submandibularis	
HR-HPV	negativ	7 (41,2)	27 (67,5)	8 (80)	42 (62,7)
	positiv	10 (58,8)	13 (32,5)	2 (20)	25 (37,3)
Gesamt		17	40	10	67

**High-risk-HPV / Lokalisation Kreuztabelle
Statistik: Anteil**

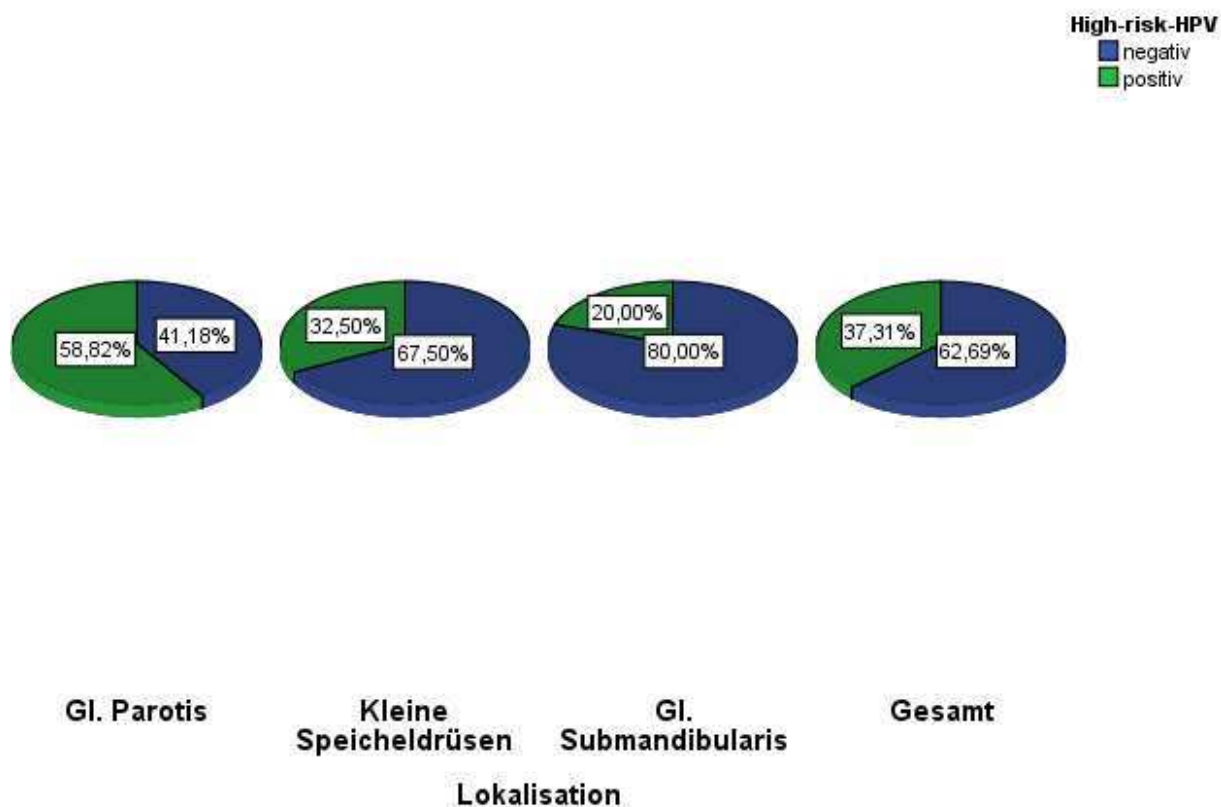


Abb. 10: HR-HPV-Positivität bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen. Tumore der Gl. Parotidea waren signifikant häufiger HPV-positiv ($p=0,03$).

Bezogen auf das Patientenalter bei Erstdiagnose wurde eine relative Steigerung des Anteils der HR-HPV-positiven Tumore mit zunehmendem Alter beobachtet. Erst bei den Patienten der Altersgruppe 5 (ab 76 Jahren) wurde dieser Anteil wieder kleiner (Tab. 12, Abb. 11). Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug jedoch $p=0,09$ und war damit nicht statistisch signifikant.

Tab. 12: HR-HPV-Nachweis in unterschiedlichen Altersgruppen.

		Altersgruppe n (%)					Gesamt
		bis 30	31-45	46-60	61-75	ab 76	
High-risk-HPV	negativ	3 (100)	5 (83,3)	17 (73,9)	8 (34,8)	9 (75)	42 (62,7)
	positiv	0	1 (16,7)	6 (26,1)	15 (65,2)	3 (25)	25 (37,3)
Gesamt		3	6	23	23	12	67

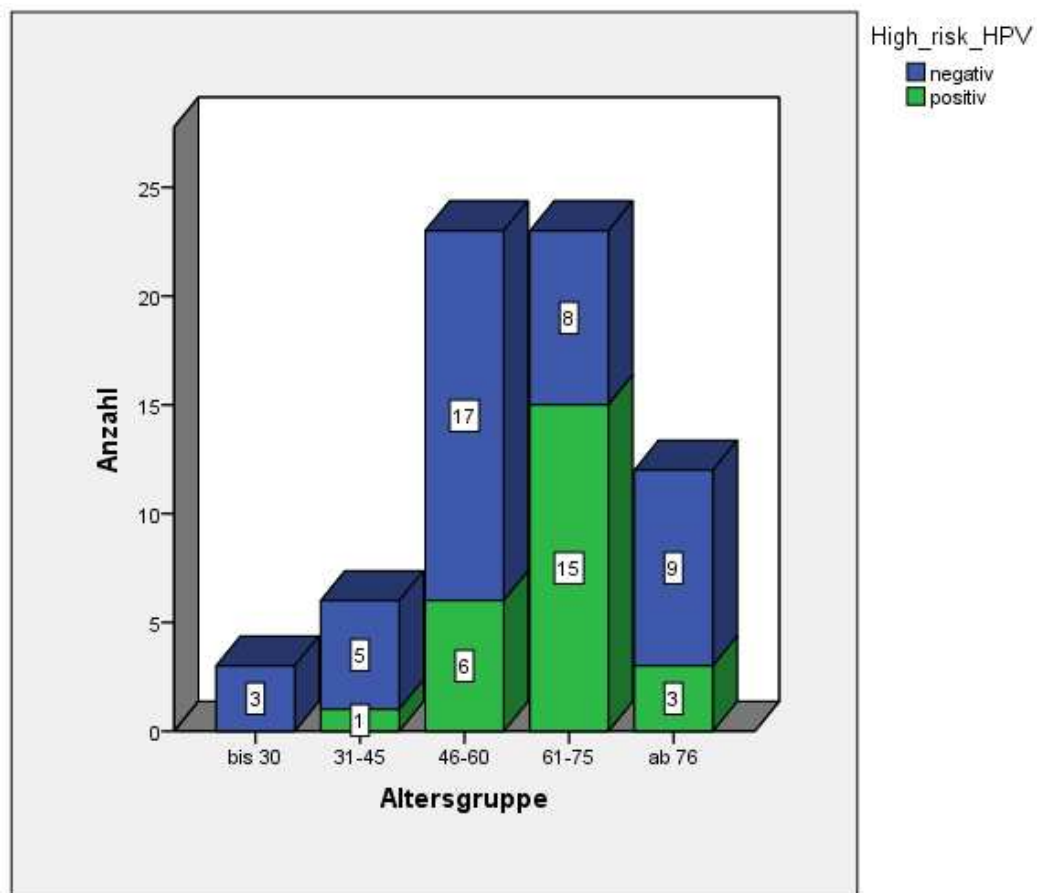


Abb. 11: HR-HPV-Nachweis in unterschiedlichen Altersgruppen.

Die Verteilung der HR-HPV-positiven Tumore in den verschiedenen T-, N-, und M-Stadien ist den Tabellen 13-15 zu entnehmen. Hierbei konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen HR-HPV-Nachweis und den verschiedenen Tumorstadien beobachtet werden.

Tab. 13: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das T-Stadium *.

	HR-HPV		Gesamt
	negativ	positiv	
T1	6	2	8
T2	8	5	13
T3	9	4	13
T4	18	13	31
Tx	1	1	2
Gesamt	42	25	67

* keine Korrelation zwischen T-Stadium und HR-HPV-Nachweis.

Tab. 14: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das N-Stadium *.

	HR-HPV		Gesamt
	negativ	positiv	
N0	35	22	57
N1	1	2	3
N2	5	0	5
Nx	1	1	2
Gesamt	42	25	67

* keine Korrelation zwischen N-Stadium und HR-HPV-Nachweis.

Tab. 15: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das M-Stadium *.

	HR-HPV		Gesamt
	negativ	positiv	
M0	37	22	59
M1	4	2	6
Mx	1	1	2
Gesamt	42	25	67

* keine Korrelation zwischen M-Stadium und HR-HPV-Nachweis.

3.4 p16^{INK4A} und sonstige Biomarker (p53, Ki-67, EGFR)

Die Expression zellulärer Marker mit einer Bedeutung als Surrogatparameter für HR-HPV Infektion (p16) sowie für verschiedene Biomarker (p53, Ki-67, EGFR) wurde untersucht und mit den Parametern HR-HPV und klinischen Parametern in Beziehung gesetzt.

Die Darstellung des p16-Status in Bezug auf die Nachweisbarkeit von HR-HPV ergab wie erwartet, eine signifikant höhere p16-Expression ($p=0,01$; $R=0,705$) bei den Tumoren die einen positiven HR-HPV-Status aufwiesen (Tab. 16, Abb. 12). Alle HR-HPV-positiven Tumore waren positiv für p16. Bei den 42 HR-HPV-negativen Tumoren zeigten 28 davon einen negativen p16-Status wobei bei 14 Präparaten p16 in unterschiedlichem Ausmaß positiv war, insgesamt jedoch prozentual schwächer als bei den HR-HPV-positiven Tumoren.

Der prozentuale Anteil der p16-Expression im Gewebe bei den einzelnen HPV-Genotypen ist der Tabelle 17 zu entnehmen. Alle drei Niedrigrisiko-HPV11 positiven Tumore waren p16 negativ.

Tab. 16: p16-Expression in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status.

	HR -HPV		Gesamt n (%)
	negativ n (%)	positiv n (%)	
p16 -	28 (66,7)	0	28 (41,8)
+	4 (9,5)	4 (16)	8 (11,9)
++	7 (16,7)	4 (16)	11 (16,4)
+++	3 (7,1)	17 (68)	20 (29,9)
Gesamt	42	25	67

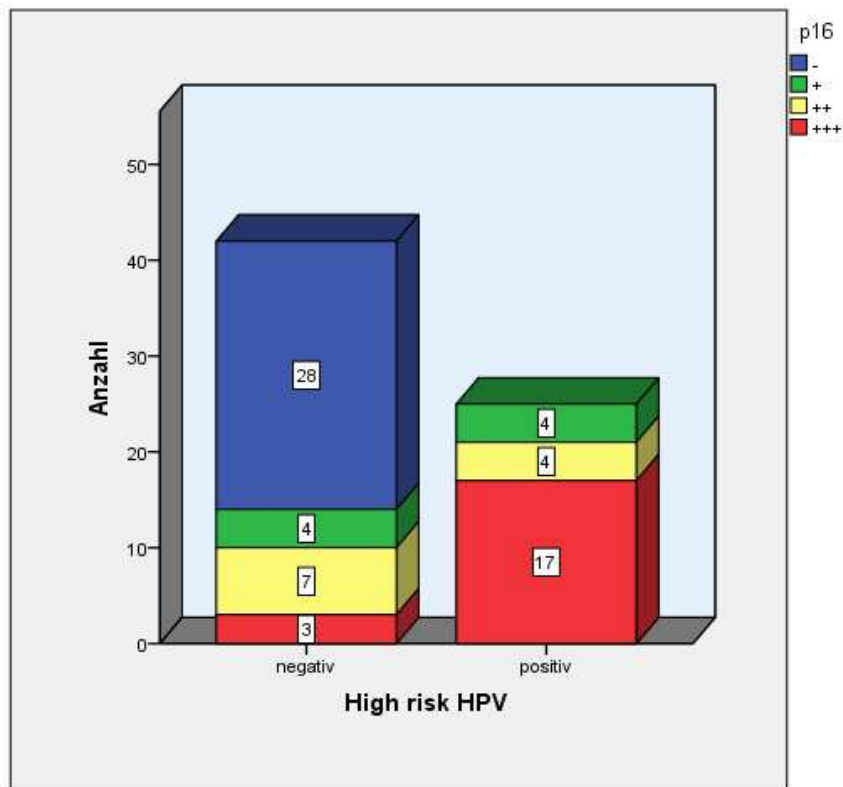


Abb. 12: p16-Expression in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status.

Tab. 17: p16-Expressionstufen in Abhängigkeit vom HPV-Genotyp.

	HPV-Genotypen							Gesamt
	HPV-negativ	11	16	18	45	45,56*	33,59*	
p16 -	25	3	0	0	0	0	0	28
+	4	0	0	2	2	0	0	8
++	7	0	2	2	0	0	0	11
+++	3	0	14	0	0	1	2	20
Gesamt	39	3	16	4	2	1	2	67

* Nachweis von multipler Infektion

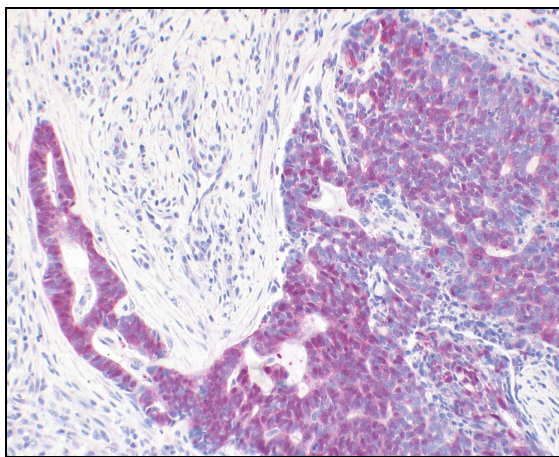


Abb. 13a

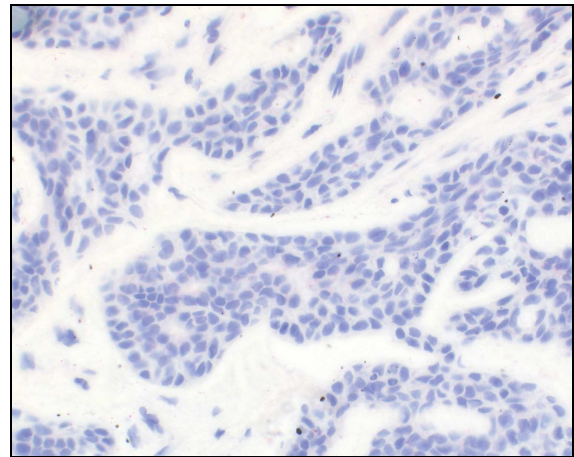


Abb. 13b

Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von p16-Expression. 13a: Repräsentative p16 Immunfärbung eines adenoid-zystischen Karzinoms; Abb. 13b: Adenoid-zystisches Karzinom ohne p16 -Expression. 200fache Vergrößerung.

Bei der Ermittlung des Expressionsmusters der weiteren getesteten Biomarker p53, Ki-67 und EGFR ergab sich in Bezug auf die HR-HPV-Positivität der Tumorpräparate keine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen Parametern (Tab. 18-20, Abb. 14-16). Lediglich bei der höchsten prozentualen Expressionsstufe von Ki-67 (+++/ >90%) fiel eine höhere Inzidenz von HR-HPV-negativen Tumoren auf (7:1).

Tab. 18: p53-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status.

	HR- HPV		Gesamt n (%)
	negativ n (%)	positiv n (%)	
p53 -	21 (50)	10 (40)	31 (46,2)
+	4 (9,5)	2 (8)	6 (9)
++	4 (9,5)	2 (8)	6 (9)
+++	12 (28,6)	10 (40)	22 (32,8)
unbekannt	1 (2,4)	1 (4)	2 (3)
Gesamt	42	25	67

Tab. 19: Ki-67-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status.

	HR- HPV		Gesamt n (%)
	negativ n (%)	positiv n (%)	
Ki-67 +	23 (57,5)	17 (68)	40 (61,5)
++	10 (25)	7 (28)	17 (26,2)
+++	7 (17,5)	1 (4)	8 (12,3)
Gesamt	40	25	65

Tab. 20: EGFR-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status.

	HR- HPV		Gesamt n (%)
	negativ n (%)	positiv n (%)	
EGFR -	16 (38,1)	10 (40)	26 (38,8)
+	8 (19)	5 (20)	13 (19,4)
++	5 (11,9)	2 (8)	7 (10,4)
+++	12 (28,6)	6 (24)	18 (26,9)
unbekannt	1 (2,4)	2 (8)	3 (4,5)
Gesamt	42	25	67

Ähnlich wie bei der Lokalisationsverteilung von HR-HPV fand sich bei den Tumoren der Glandula Parotidea eine relativ höhere p16-Expression, gefolgt von den Tumoren der kleinen Speicheldrüsen. Bei Tumoren der Gl. Submandibularis war p16 im Durchschnitt schwächer exprimiert (Tab. 21, Abb. 14).

Tab. 21: p16-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung.

	Lokalisation n (%)			Gesamt n (%)
	Gl. Parotidea	Kleine Speicheldrüsen	Gl. Submandibularis	
p16 -	6 (35,3)	16 (40)	6 (60)	28 (41,8)
+	2 (11,8)	4 (10)	2 (20)	8 (11,9)
++	4 (23,6)	6 (15)	1 (10)	11 (16,4)
+++	5 (29,4)	14 (35)	1 (10)	20 (29,9)
Gesamt	17	40	10	67

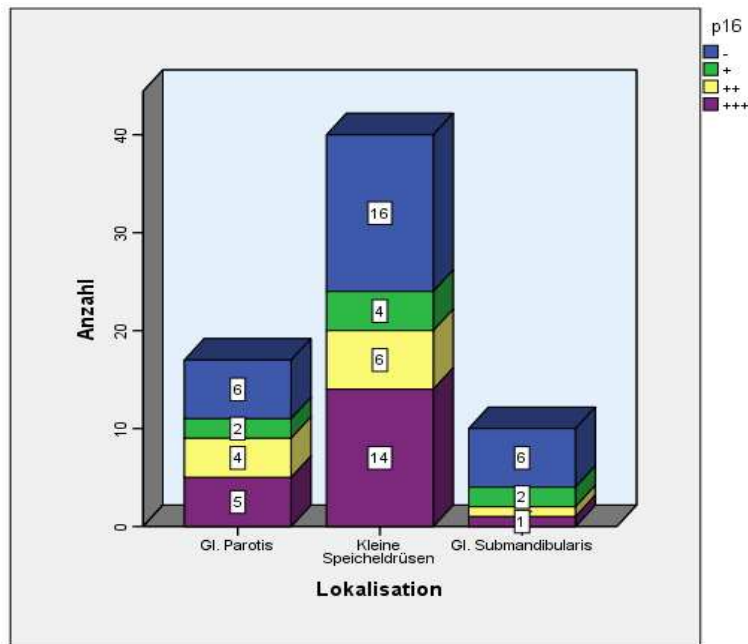


Abb. 14: p16-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation.

Gleich wie die Positivität für HR-HPV verhielt sich auch der p16-Expressionsstatus bei der Verteilung in den unterschiedlichen Erstdiagnose-Altersgruppen. P16-Expression stieg mit zunehmendem Diagnosealter, erreichte ihr Maximum in der Altersgruppe 4 (61-75 Jahre), um erst in der Altersgruppe 5 (ab 76 Jahren) wieder abzufallen (Tab. 22, Abb. 15).

Tab. 22: p16-Expression in Abhängigkeit vom Erstdiagnose-Alter.

	Altersgruppe n (%)					Gesamt n (%)
	bis 30	31-45	46-60	61-75	ab 76	
p16 negativ	2 (67)	0	14 (60,9)	4 (17,4)	8 (67)	28 (41,8)
p16 positiv	1 (33)	6 (100)	9 (39,1)	19 (82,6)	4 (33)	39 (58,2)
Gesamt	3	6	23	23	12	67

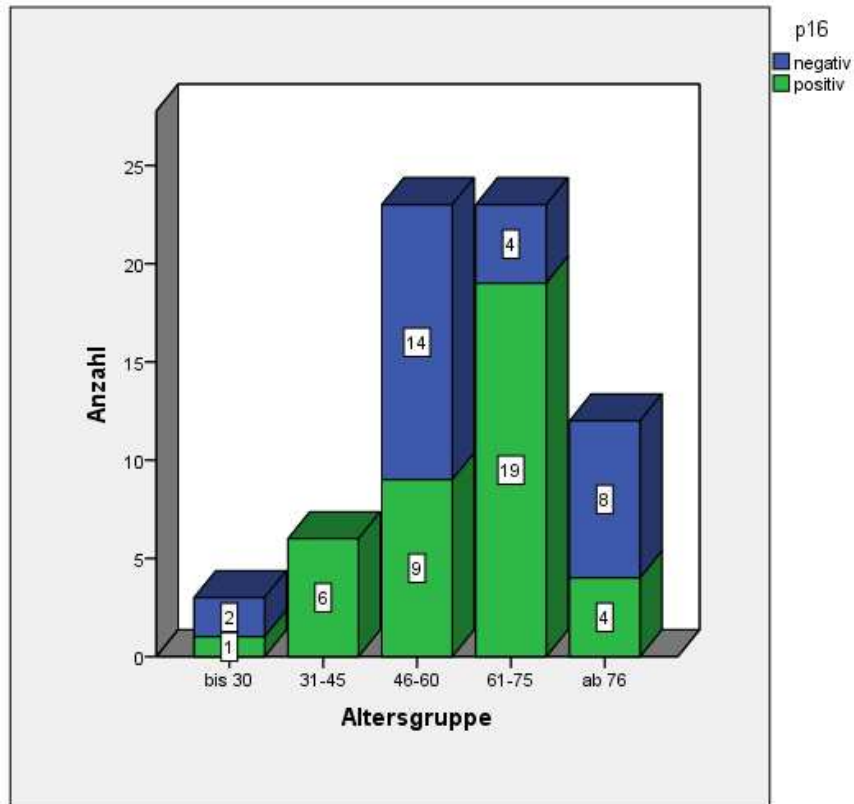


Abb. 15: p16-Expression in Abhängigkeit vom Erstdiagnose-Alter.

Die Analyse der p16-Expression bezogen auf die unterschiedlichen T-, N- und M-Stadien ergab keine statistischen Korrelationen. Dies ist aus der Verteilung der p16-Expressionsraten anhand der Tabellen 23-25 zu entnehmen.

Tab. 23: p16-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium *.

	T-Stadium					Gesamt
	T1	T2	T3	T4	Tx	
p16 negativ	3	6	7	12	0	28
p16 positiv	5	7	6	19	2	39
Gesamt	8	13	13	31	2	67

* keine Korrelation zwischen p16-Expression und T-Stadium.

Tab. 24: p16-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium *.

		N-Status				Gesamt
		N0	N1	N2	Nx	
p16	negativ	25	1	2	0	28
	positiv	32	2	3	2	39
Gesamt		57	3	5	2	67

* keine Korrelation zwischen p16-Expression und N-Stadium.

Tab. 25: p16-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium *.

		M-Stadium			Gesamt
		M0	M1	Mx	
p16	negativ	25	3	0	28
	positiv	34	3	2	39
Gesamt		59	6	2	67

* keine Korrelation zwischen p16-Expression und M-Stadium.

Bei der statistischen Analyse der p53- sowie Ki-67-Expression in Abhängigkeit von der p16-Expression konnten ebenfalls keine signifikanten Korrelationen beobachtet werden (Abb. 16-17).

p53 / p16 Kreuztabelle
 Statistik: Anzahl

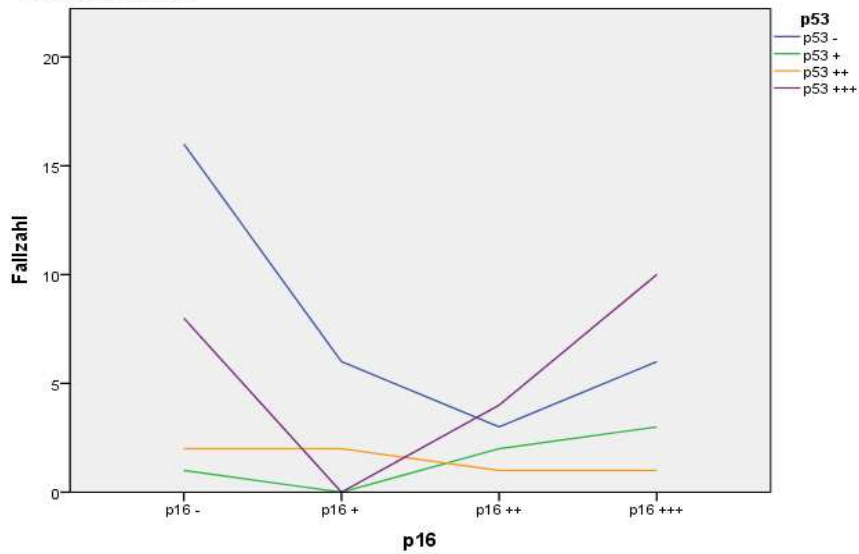


Abb. 16: p53-Expression in Abhängigkeit von der p16-Expression Der Korrelationskoeffizient betrug $R=0,239$.

Ki-67 / p16 Kreuztabelle
 Statistik: Anzahl

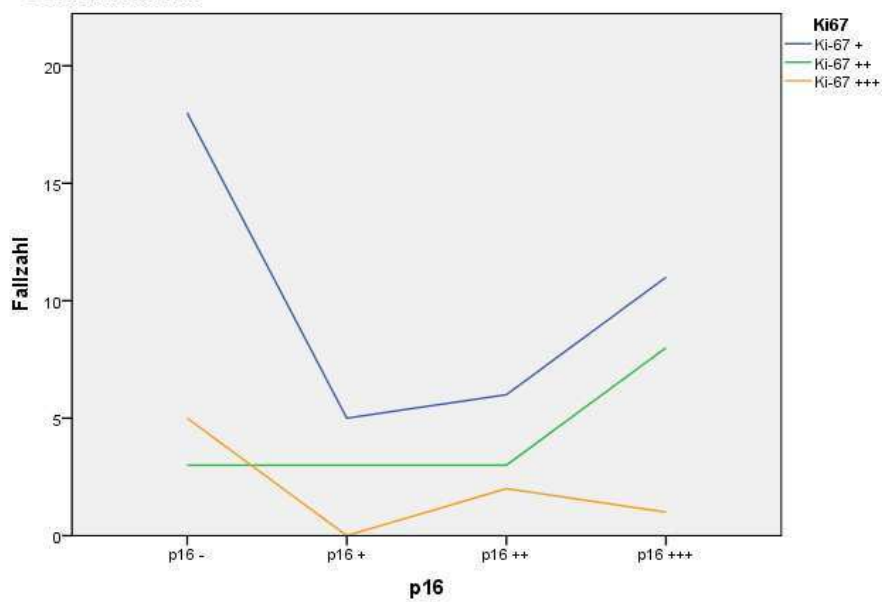


Abb. 17: Ki-67-Status in Abhängigkeit von der p16-Expression Der Korrelationskoeffizient betrug $R=0,022$.

Bei der Analyse des Expressionsverhaltens von Ki-67 bei lokalen und hämatogenen Fernmetastasen fiel eine steigende Ki-67-Expression bei steigendem N- und M-Stadium auf (Tab. 26-27, Abb. 18-19).

Tab. 26: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Erstdiagnose *.

	N-Stadium n (%)				Gesamt n (%)
	N0	N1	N2	Nx	
Ki-67 +	35 (63,6)	2 (67)	1 (20)	2 (100)	40 (61,5)
++	14 (25,5)	1 (33)	2 (40)	0	17 (26,2)
+++	6 (10,9)	0	2 (40)	0	8 (12,3)
Gesamt	55	3	5	2	65

* Die Signifikanz zwischen N-Stadium und Ki-67-Expression betrug $p=0,054$.

Ki-67 / N-Stadium Kreuztabelle
Statistik: Anteil

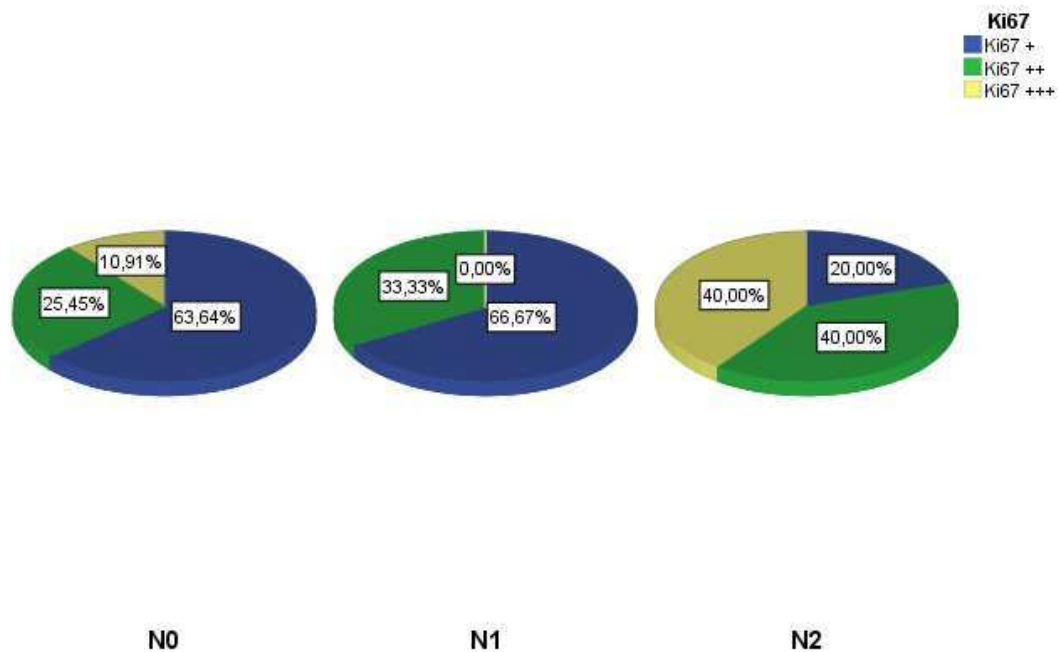


Abb. 18: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Erstdiagnose.

Tab. 27: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium bei Erstdiagnose *.

	M-Stadium n (%)			Gesamt n (%)
	M0	M1	Mx	
Ki-67 +	37 (64,9)	1 (17)	2 (100)	40 (61,5)
++	14 (24,6)	3 (50)	0	17 (26,2)
+++	6 (10,5)	2 (33)	0	8 (12,3)
Gesamt	57	6	2	65

* Die Signifikanz zwischen M-Stadium und Ki-67-Expression betrug $p=0,019$.

Ki-67 / M-Stadium Kreuztabelle
Statistik: Anteil

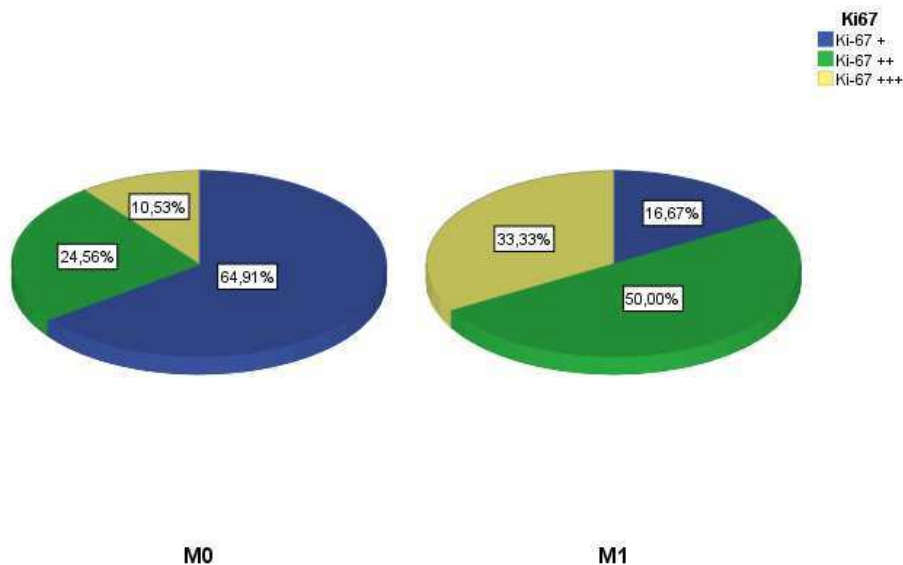


Abb. 19: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium bei Erstdiagnose.

Interessanterweise zeigte sich eine signifikante ($p=0,025$), umgekehrt proportionale Korrelation zwischen der prozentualen Ki-67- und EGFR-Gewebeexpression. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug $R= -0,277$ (Tab. 28, Abb. 20).

Tab. 28: EGFR-Status in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression *

	Ki-67 n (%)			Gesamt n (%)
	+	++	+++	
EGFR -	13 (32,5)	8 (47,1)	5 (62,5)	26 (40)
+	8 (20)	4 (23,5)	1 (12,5)	13 (20)
++	2 (5)	3 (17,6)	2 (25)	7 (10,8)
+++	14 (35)	2 (11,8)	0	16 (24,6)
unbekannt	3 (7,5)	0	0	3 (4,6)
Gesamt	40	17	8	65

* Die Signifikanz der umgekehrt proportionalen Korrelation zwischen Ki-67- und EGFR-Expression betrug $p=0,025$.

EGFR / Ki-67 Kreuztabelle
Statistik: Anteil

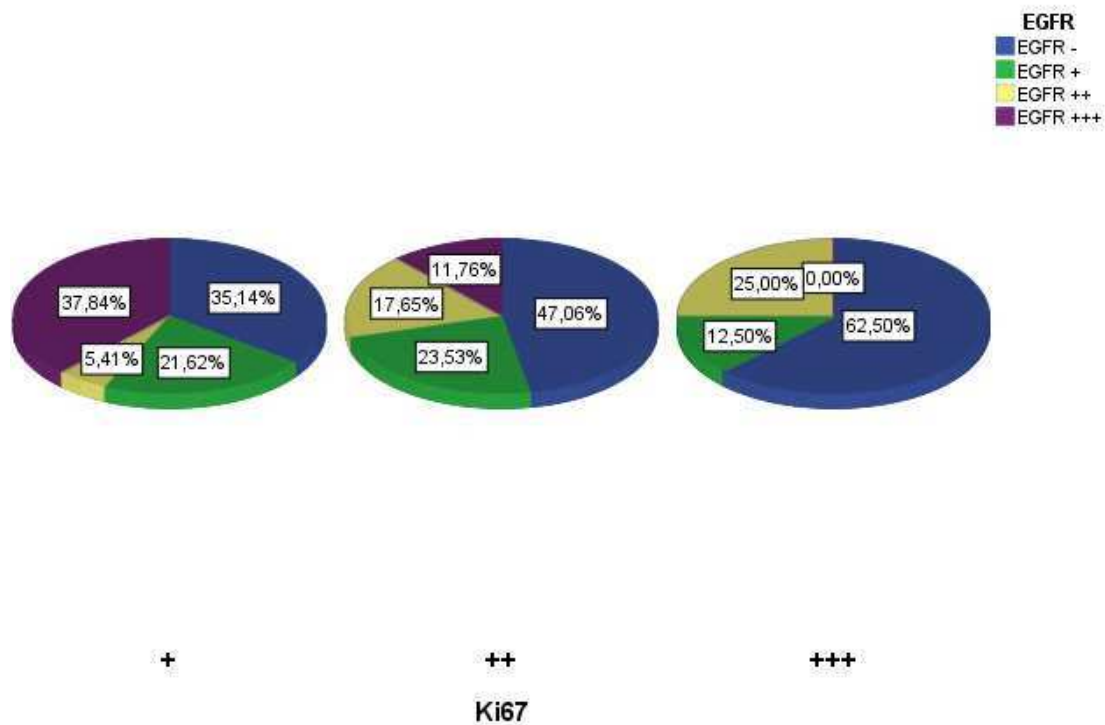


Abb. 20: EGFR-Status in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression.

3.5 Rezidivfreies Überleben

Als rezidivfreie Überlebensdauer wurde der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Auftritt von Lokalrezidiven festgelegt. Bei bereits verstorbenen, rezidivfreien Patienten wurde der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Tod berechnet. Bei lebenden, rezidivfreien Patienten wurde der zeitliche Abstand zwischen Erstdiagnose und Januar 2011 als rezidivfreie Nachbeobachtungszeit festgelegt. Der Nachbeobachtungszeitraum variierte zwischen 3 Monaten und 23,75 Jahren und lag im Medianen bei 7,8 Jahren. Eine eventuelle Korrelation zwischen rezidivfreiem Überleben und verschiedenen Faktoren wurden mittels Kaplan-Meier- und Cox-Regresionsanalysen untersucht. Zusätzlich wurden statistisch die rezidivfreien 3-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern berechnet. Die Signifikanzen wurden mittels des Log-Rang-Tests ermittelt.

Sowohl die Tumorlokalisierung (Abb. 21) als auch das T- (Abb. 22) und N-Stadium (Abb. 23) hatten keinen Einfluß auf die rezidivfreie Überlebensdauer.

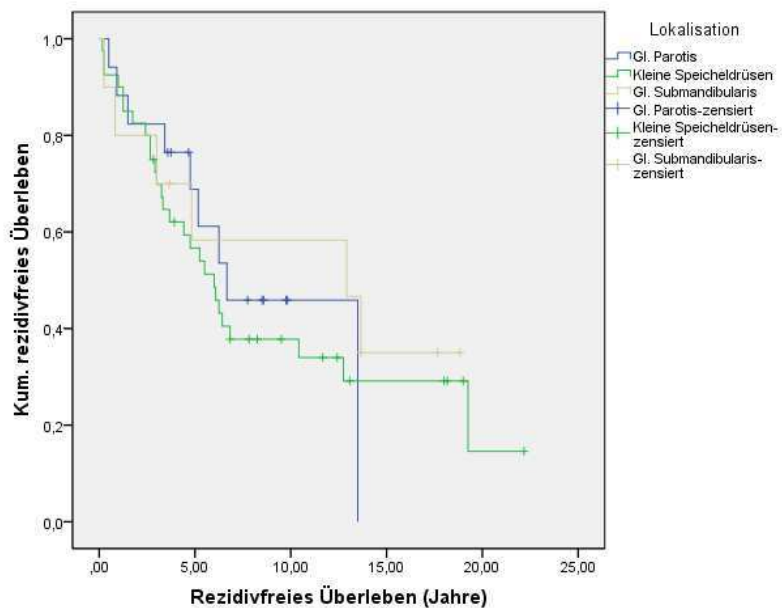


Abb. 21: Rezidivfreies Überleben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen. Keine statistische Korrelation ($p=0,858$).

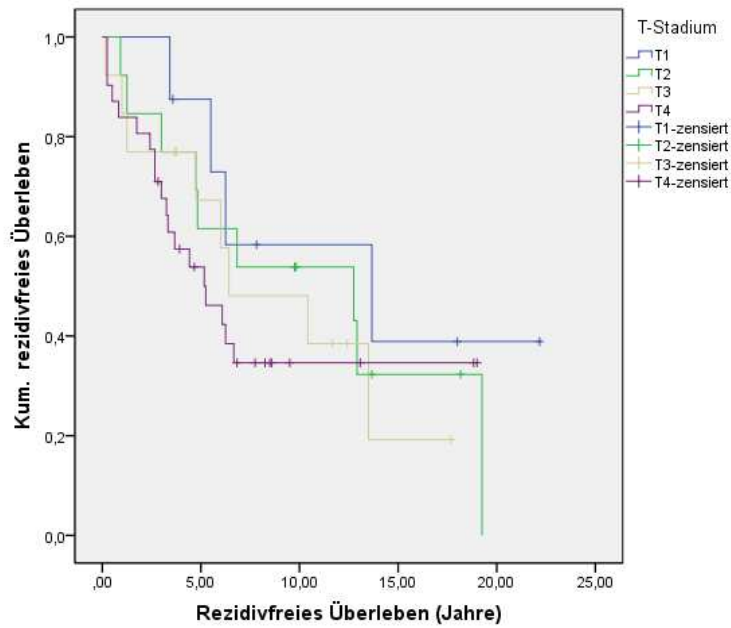


Abb. 22: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom T-Stadium. Keine statistische Korrelation ($p=0,122$).

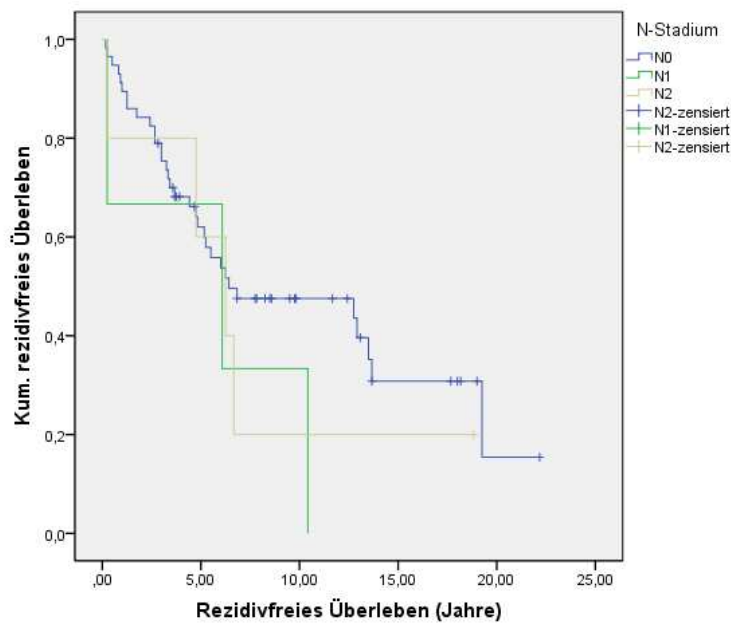


Abb. 23: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom N-Stadium. Keine statistische Korrelation ($p=0,387$).

Erwartungsgemäß fiel die rezidivfreie Überlebenszeit mit steigendem Erstdiagnosealter (Abb. 24). Eine Bereinigung der Daten durch Miteinbeziehen natürlicher Todesfälle in die statistische Analyse war nicht möglich da die entsprechenden Angaben zur Todesursache bei einigen Patienten nicht vorlagen.

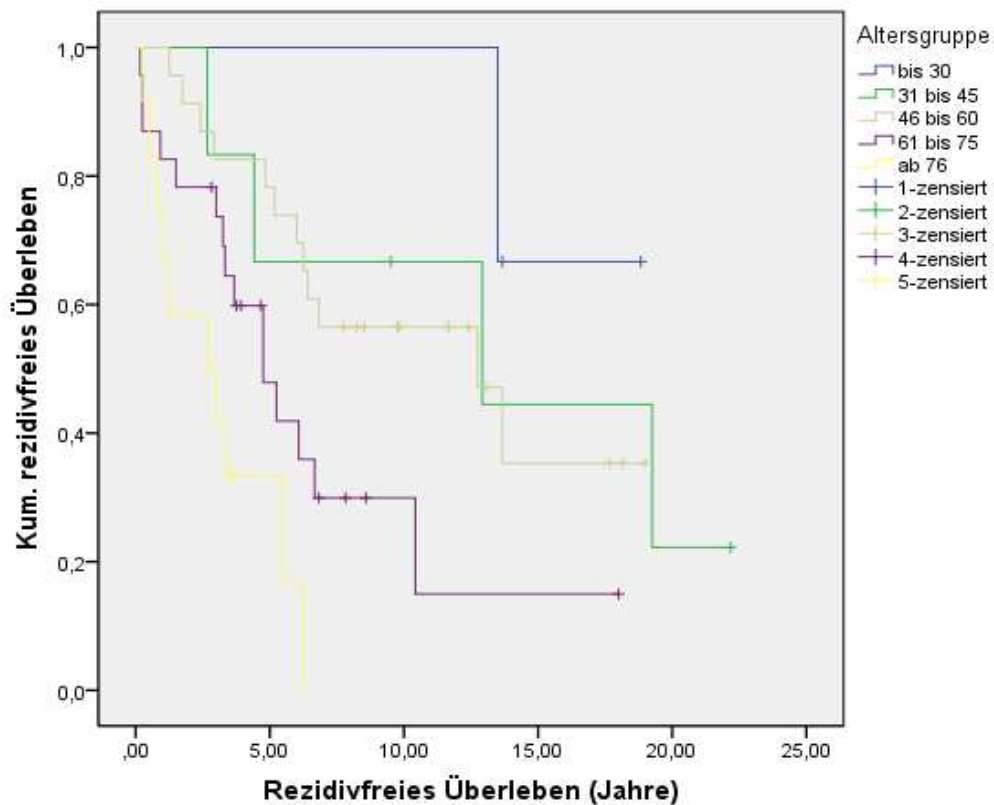


Abb. 24: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose. Mit steigender Erstdiagnose-Altersstufe sank die rezidivfreie Prognose signifikant ($p=0,001$).

Interessanterweise wurde außerdem eine signifikant längere ($p=0,036$), rezidivfreie Überlebenszeit für das männliche Geschlecht beobachtet (Abb. 25). Die 3-, 5- und 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate betrug jeweils 87% : 70%, 78% : 51% und 58% : 26% (Abb. 26, 27, 28). Diese Beobachtung hängt allerdings mit der Tatsache zusammen, daß der Anteil der männlichen Patienten mit steigendem Alter deutlich sank und daß Frauen in unserem Kollektiv durchschnittlich erst im höheren Alter erkrankten (Abb. 6).

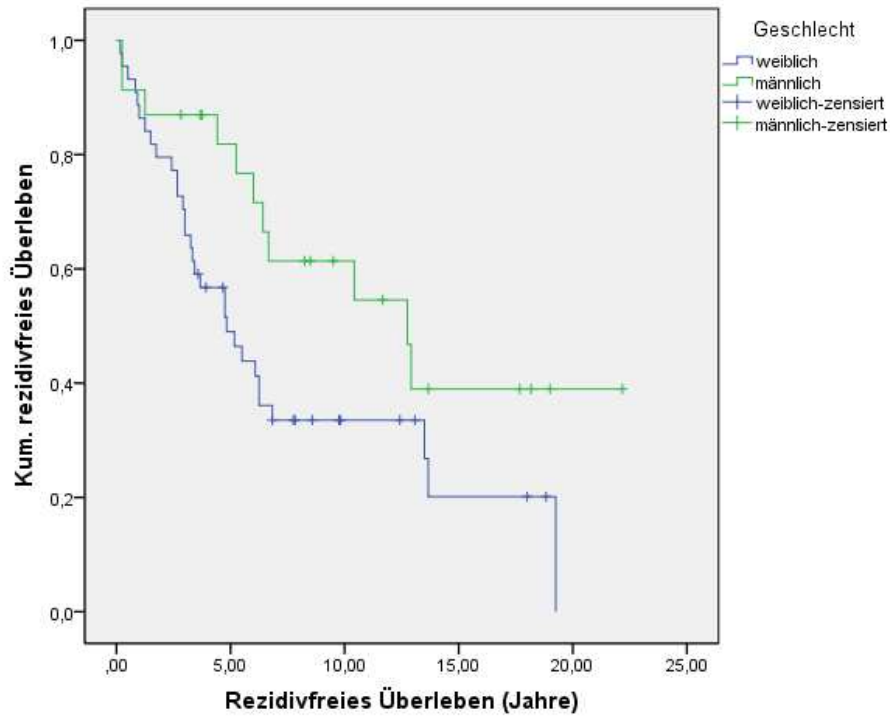


Abb. 25: Rezidivfreies Überleben abhängig vom Geschlecht der Patienten. Für das männliche Geschlecht war die rezidivfreie Überlebensprognose signifikant besser ($p=0,036$).

3 Jahre rezidivfrei / Geschlecht Kreuztabelle
Statistik: Anteil

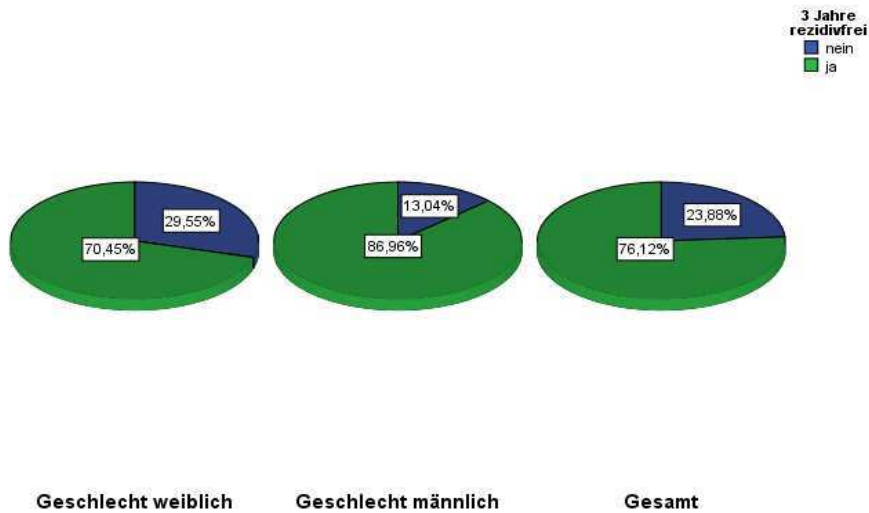


Abb. 26: Rezidivfreie 3-Jahresüberlebensrate im Vergleich weiblich/männlich.

5 Jahre rezidivfrei / Geschlecht Kreuztabelle
Statistik: Anteil

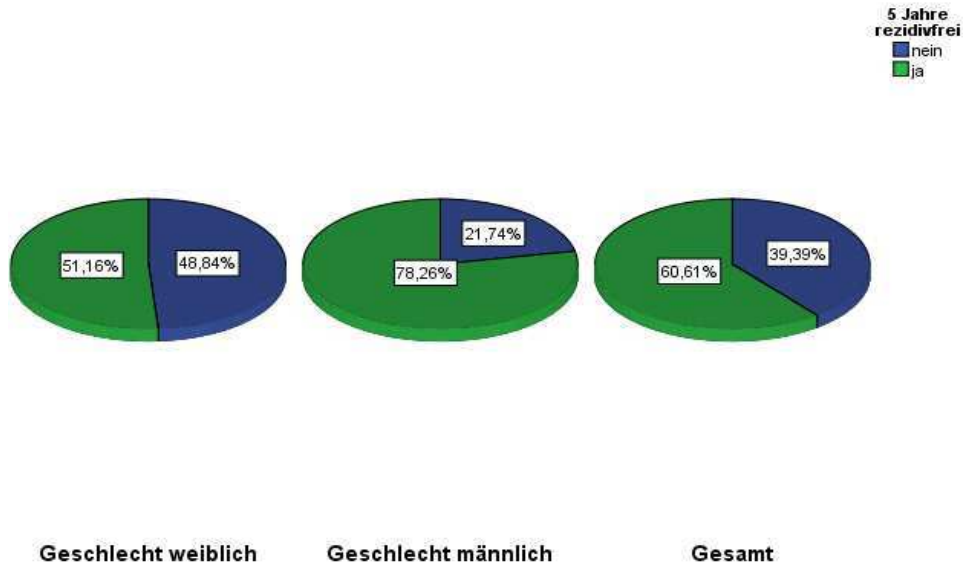


Abb. 27: Rezidivfreie 5-Jahresüberlebensrate im Vergleich weiblich/männlich.

10 Jahre rezidivfrei / Geschlecht Kreuztabelle
Statistik: Anteil

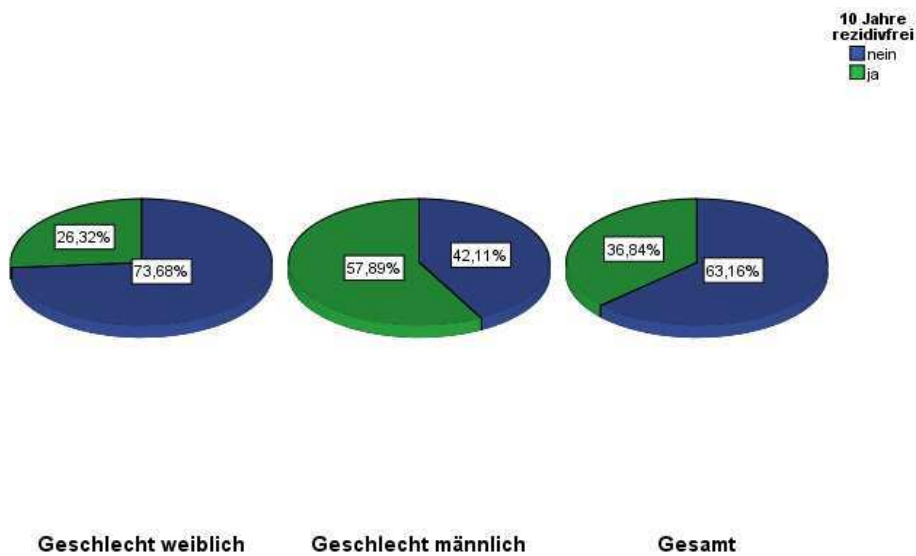


Abb. 28: Rezidivfreie 10-Jahresüberlebensrate im Vergleich weiblich/männlich.

Eine prognostische Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben konnte weder für den Nachweis von HR-HPV (Abb. 29) noch für die Positivität für den HPV-relevanten Biomarker p16 (Abb. 30) gezeigt werden.

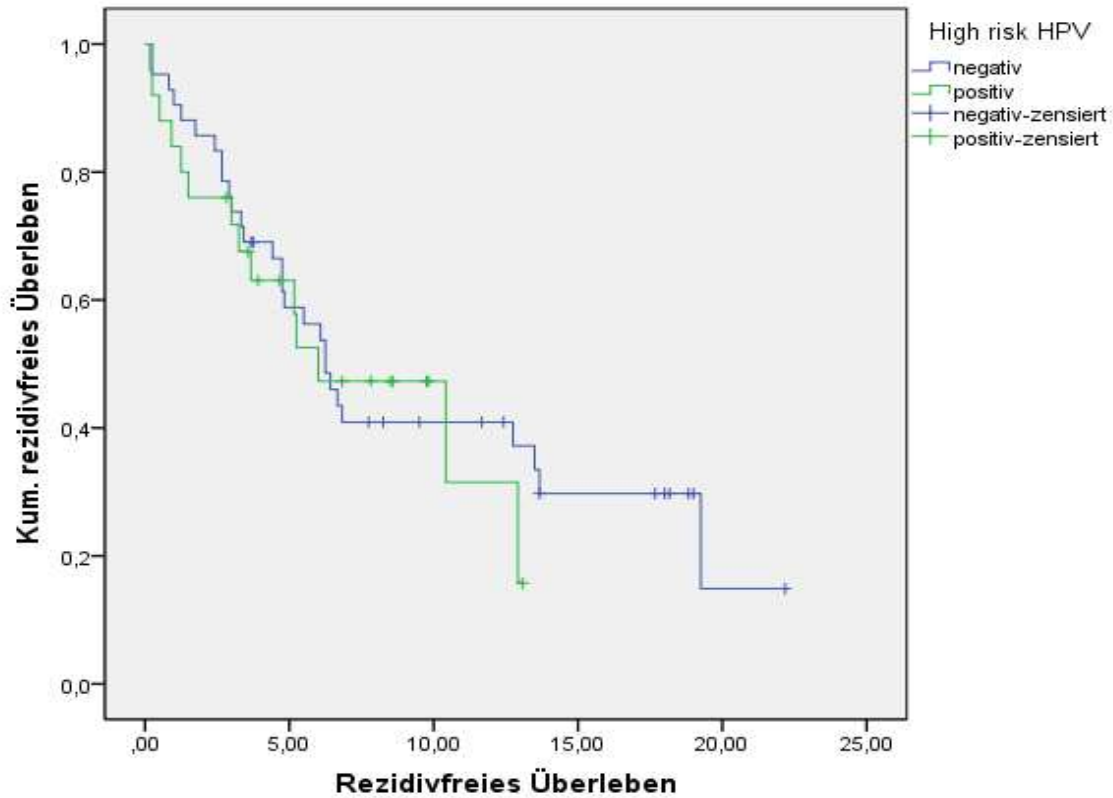


Abb. 29: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status. Zwischen HR-HPV-Nachweis und rezidivfreiem Überleben konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden ($p=0,674$).

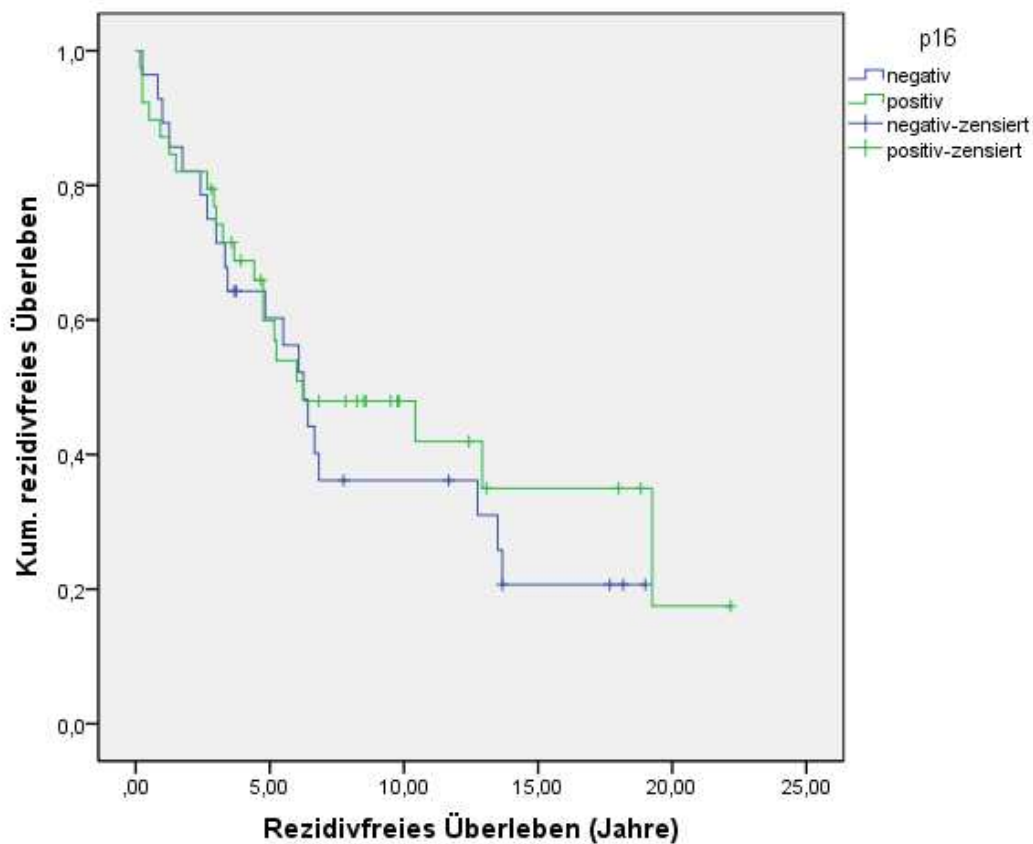


Abb. 30: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p16-Expression. Zwischen p16-Expression und rezidivfreiem Überleben konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden ($p=0,512$).

Bei der Untersuchung der rezidivfreien Überlebensdauer für die unterschiedlichen Expressionsstufen des Proliferations-relevanten Markers Ki-67 fiel ein relativer Abfall der rezidivfreien Prognose mit zunehmender Expressionsrate auf (Abb. 31), ohne jedoch ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen ($p=0,162$).

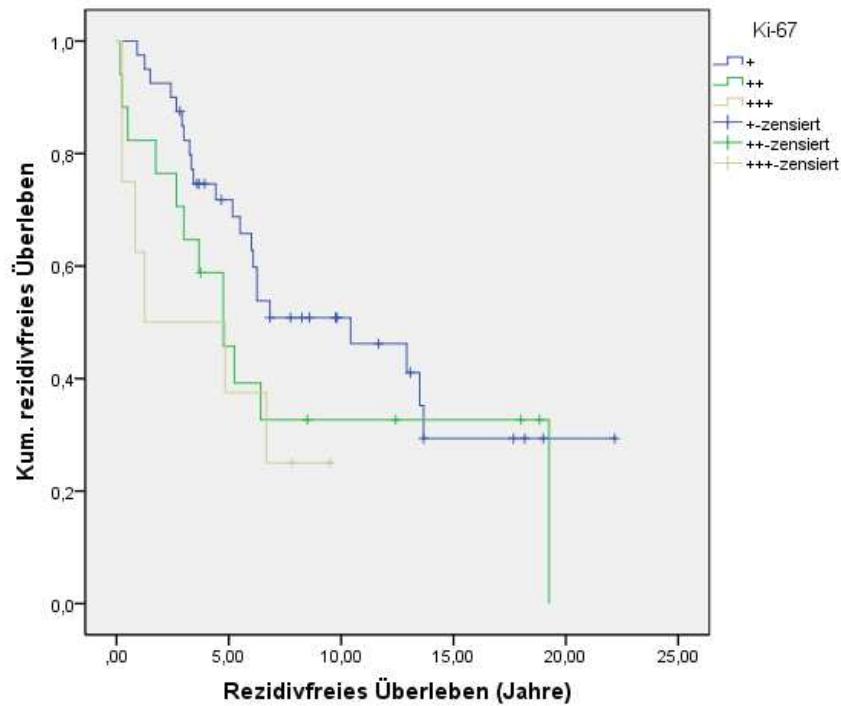


Abb. 31: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Ki-67-Expressionsstatus ($p=0,162$).

Die sinkende 3-, 5- und 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate bei steigender Ki-67-Expression lässt sich den Abb. 32-34 entnehmen.

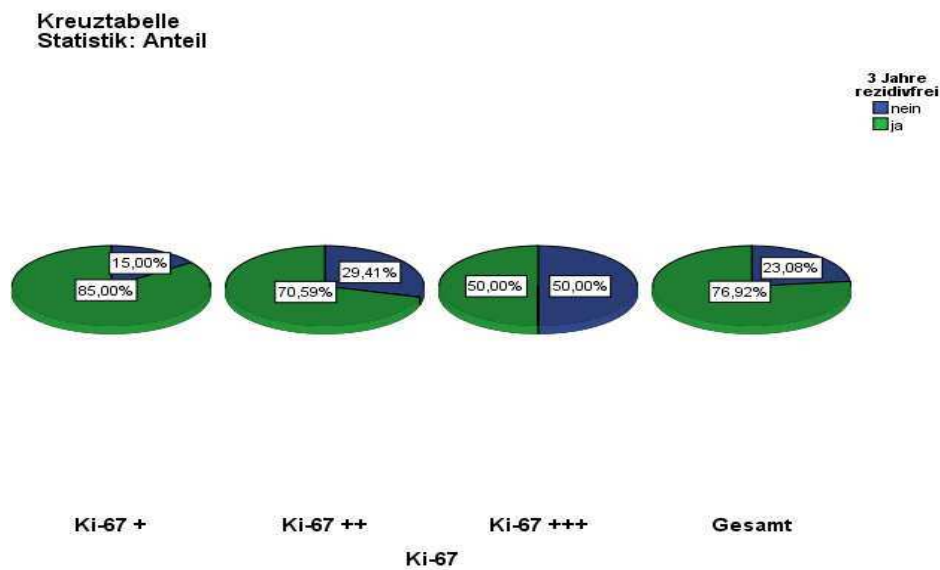


Abb. 32: 3-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression.

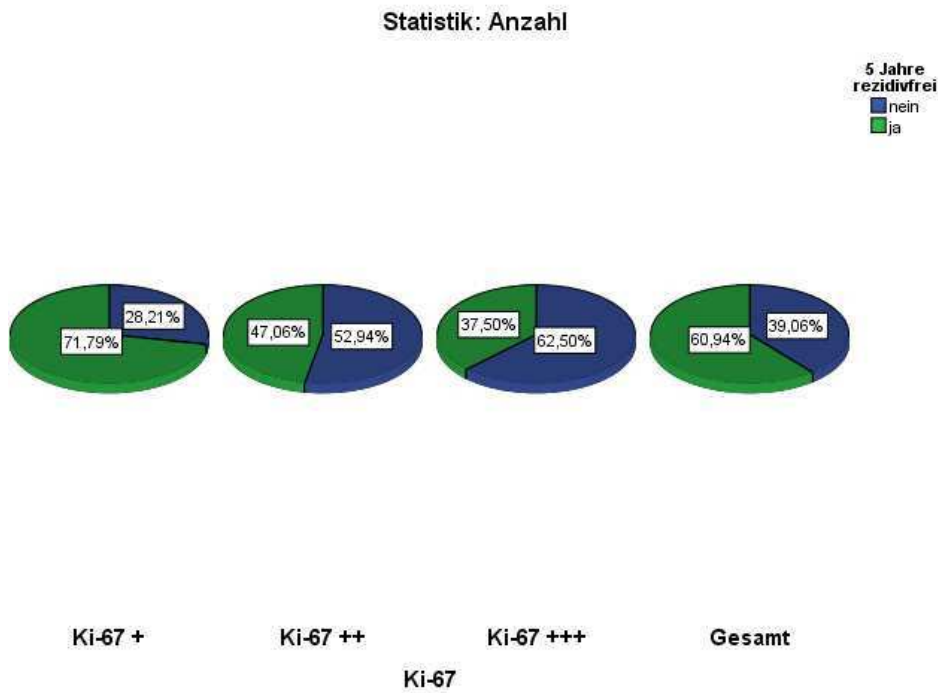


Abb. 33: 5-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression.

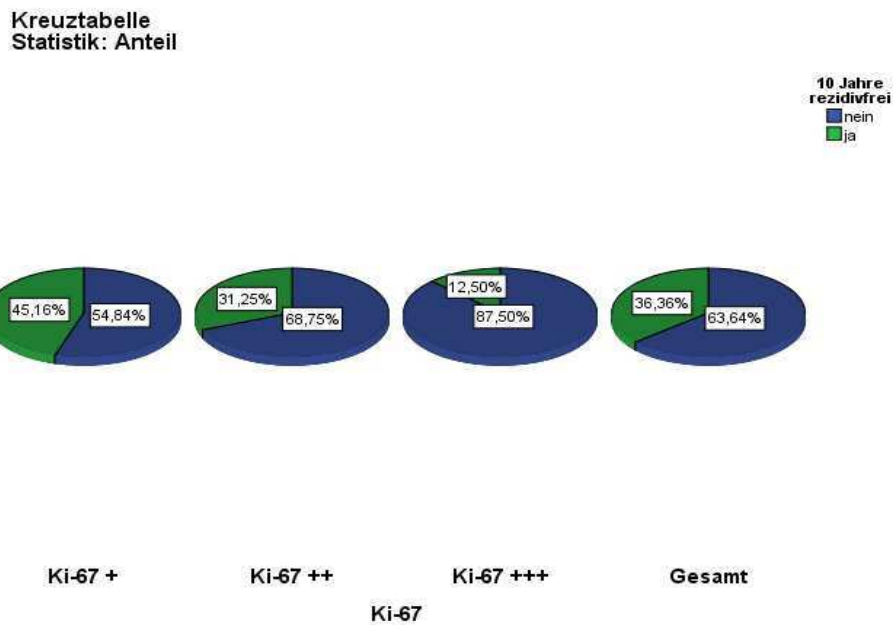


Abb. 34: 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression.

Für die Biomarker p53 und EGFR konnte keine Relevanz für die rezidivfreie Überlebensdauer ermittelt werden (Abb. 35-36).

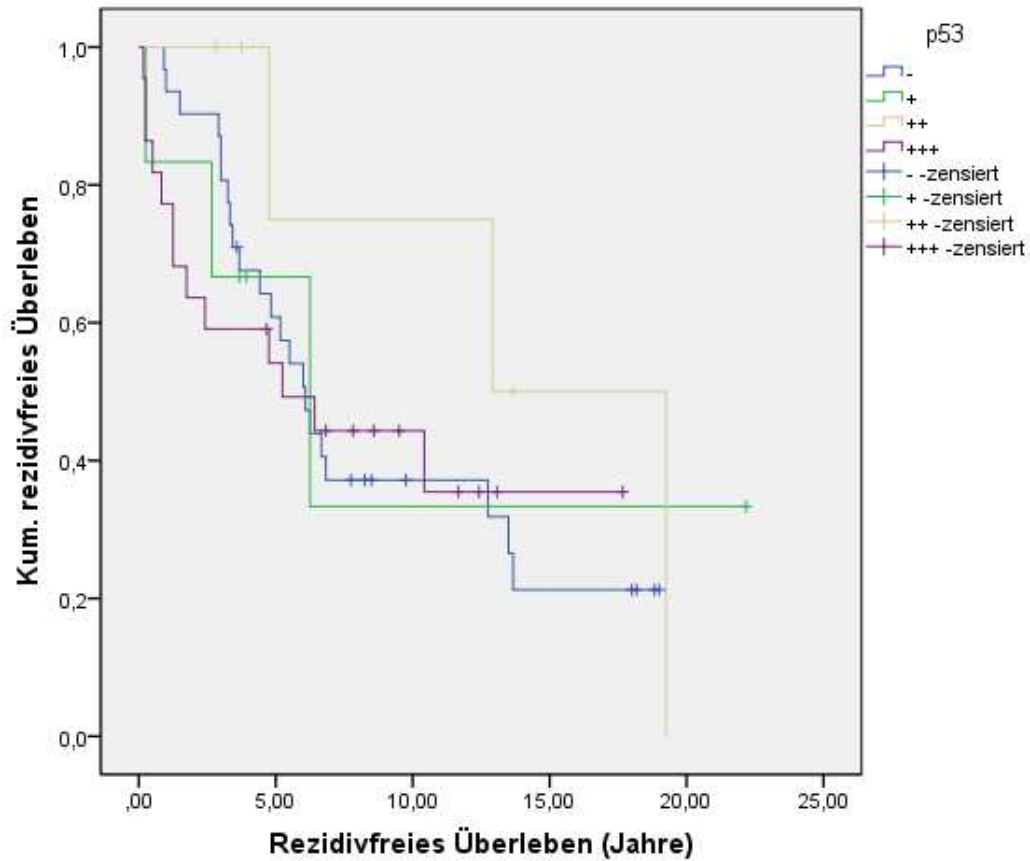


Abb. 35: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Expression. Zwischen p53-Expression und rezidivfreiem Überleben konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden ($p=0,701$).

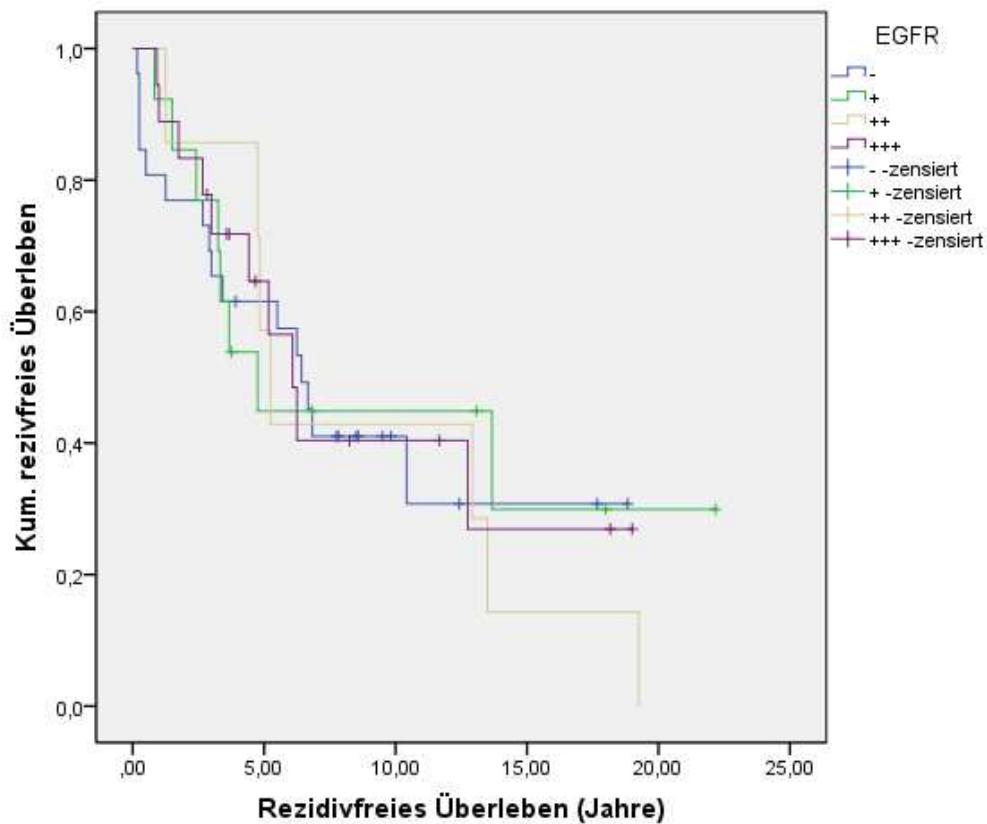


Abb. 36: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR-Status. Zwischen EGFR-Expression und rezidivfreiem Überleben konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden ($p=0,953$).

3.6 Gesamtüberleben

Als Gesamtüberlebensdauer wurde der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Tod festgelegt. Bei lebenden Patienten wurde der zeitliche Abstand zwischen Erstdiagnose und Januar 2011 als Nachbeobachtungszeit festgelegt. Eine eventuelle Korrelation zwischen Gesamtüberleben und verschiedenen Faktoren wurden mittels Kaplan-Meier- und Cox-Regresionsanalysen untersucht. Zusätzlich wurden statistisch die 3-, 5- und 10- Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern berechnet. Die Signifikanzen wurden mittels des Log-Rang-Tests ermittelt.

Sowohl die Tumorlokalisierung (Abb. 37) als auch das T- (Abb. 38) und N-Stadium (Abb. 39) hatten keinen Einfluß auf die Gesamtüberlebensdauer.

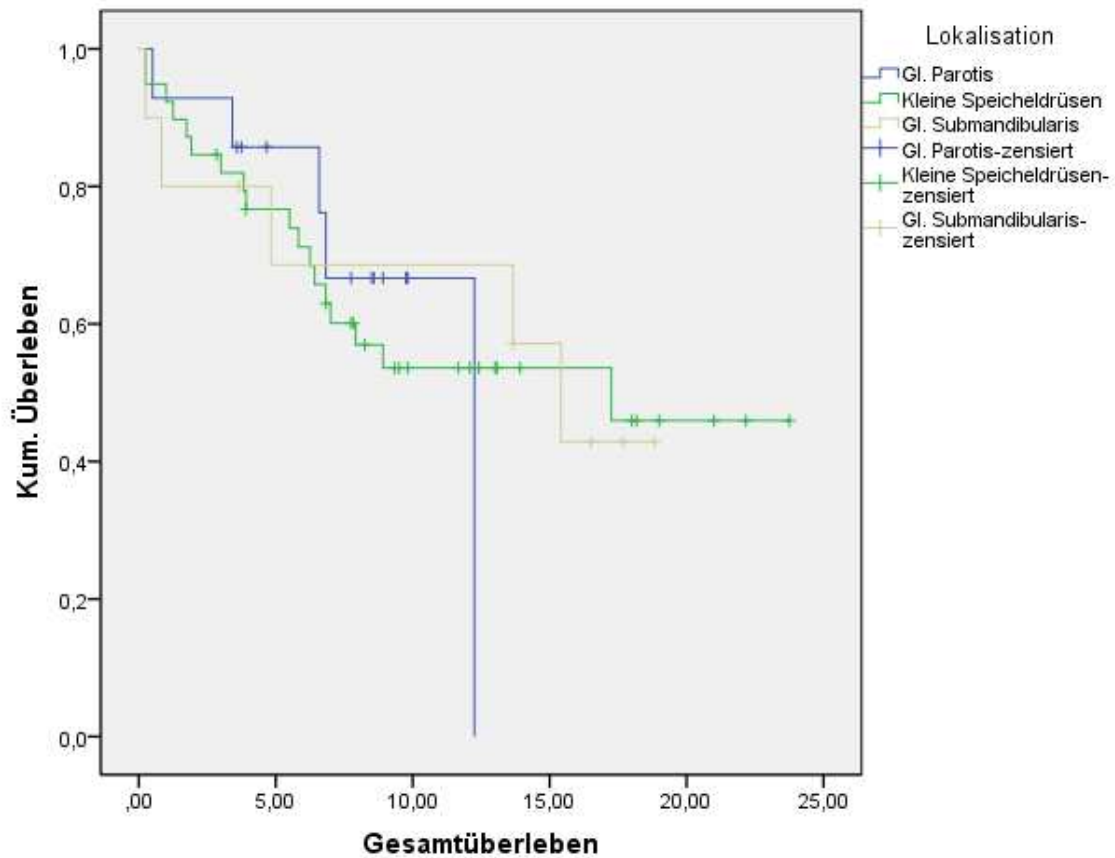


Abb. 37: Gesamtüberleben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen. Keine statistische Korrelation ($p=0,989$).

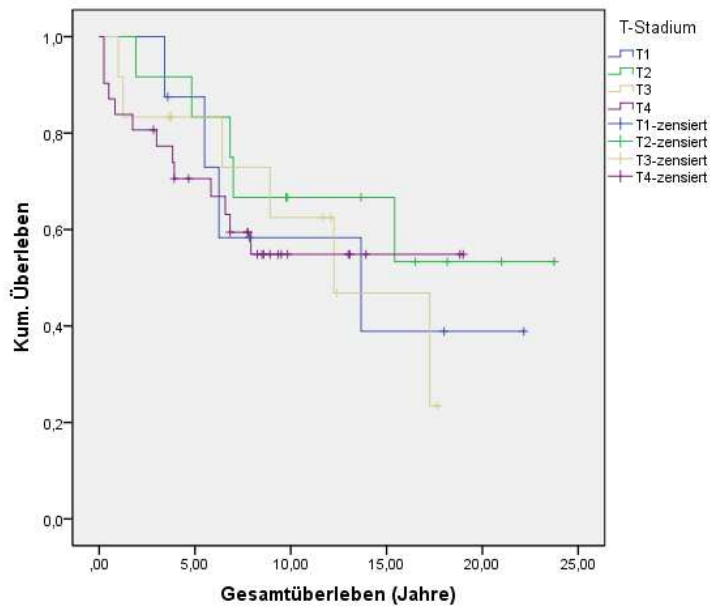


Abb. 38: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom T-Stadium. Keine statistische Korrelation ($p=0,840$).

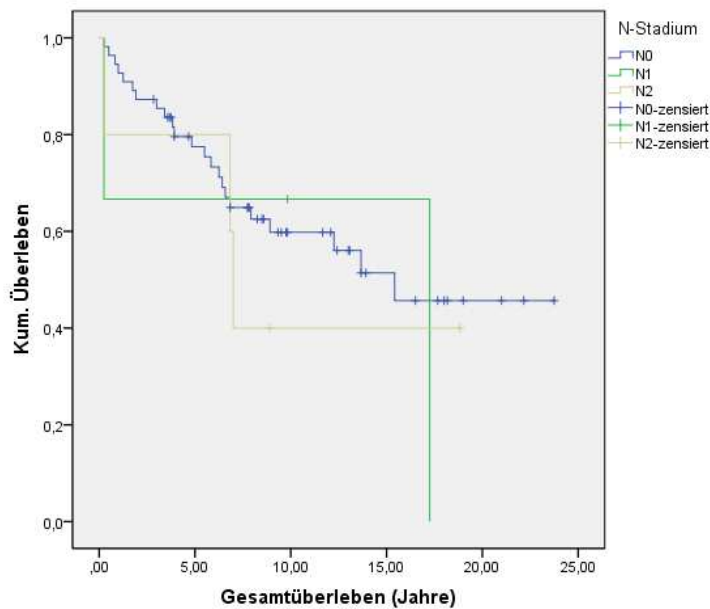


Abb. 39: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom N-Stadium. Keine statistische Korrelation ($p=0,773$).

Bei bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fernmetastasierten Tumoren war die Gesamtüberlebensprognose deutlich schlechter und statistisch signifikant geringer (Abb. 40).

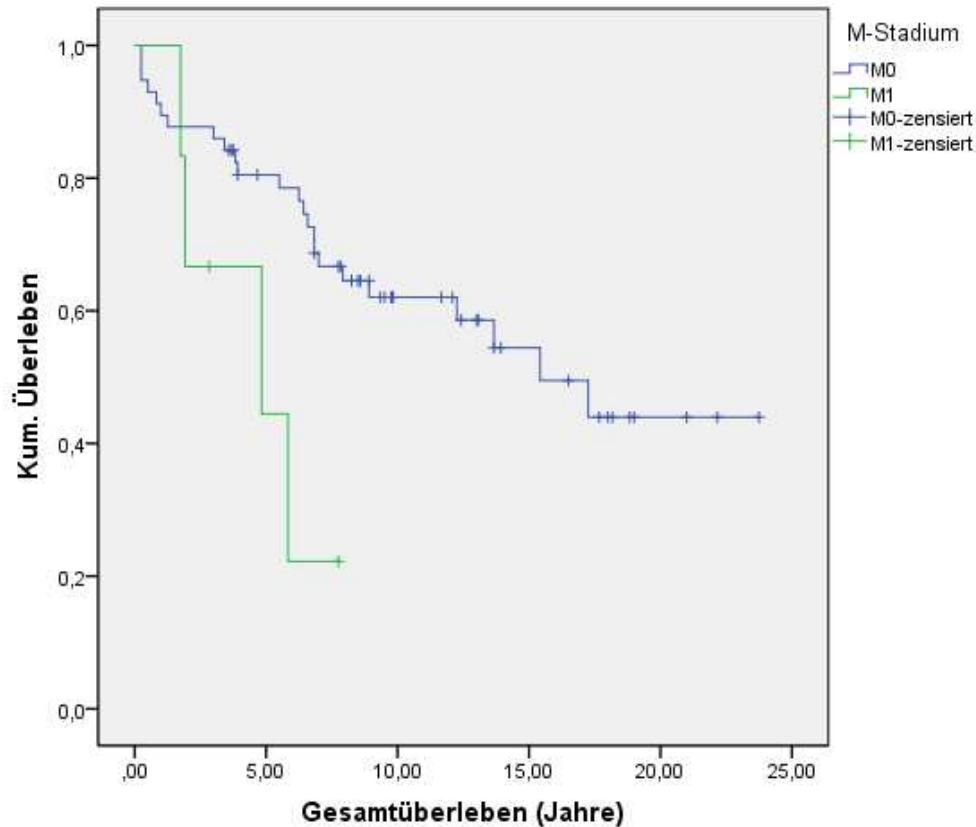


Abb. 40: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom M-Stadium. Tumore im Stadium M1 zeigten eine signifikant schlechtere Überlebensprognose ($p=0,027$).

Ähnlich wie für das rezidivfreie Überleben zeigte sich für das männliche Geschlecht eine relativ bessere Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens (Abb. 41). Diese Beobachtung steht vermutlich auch in Zusammenhang mit dem sinkenden Anteil der männlichen Patienten in den höheren Altersstufen.

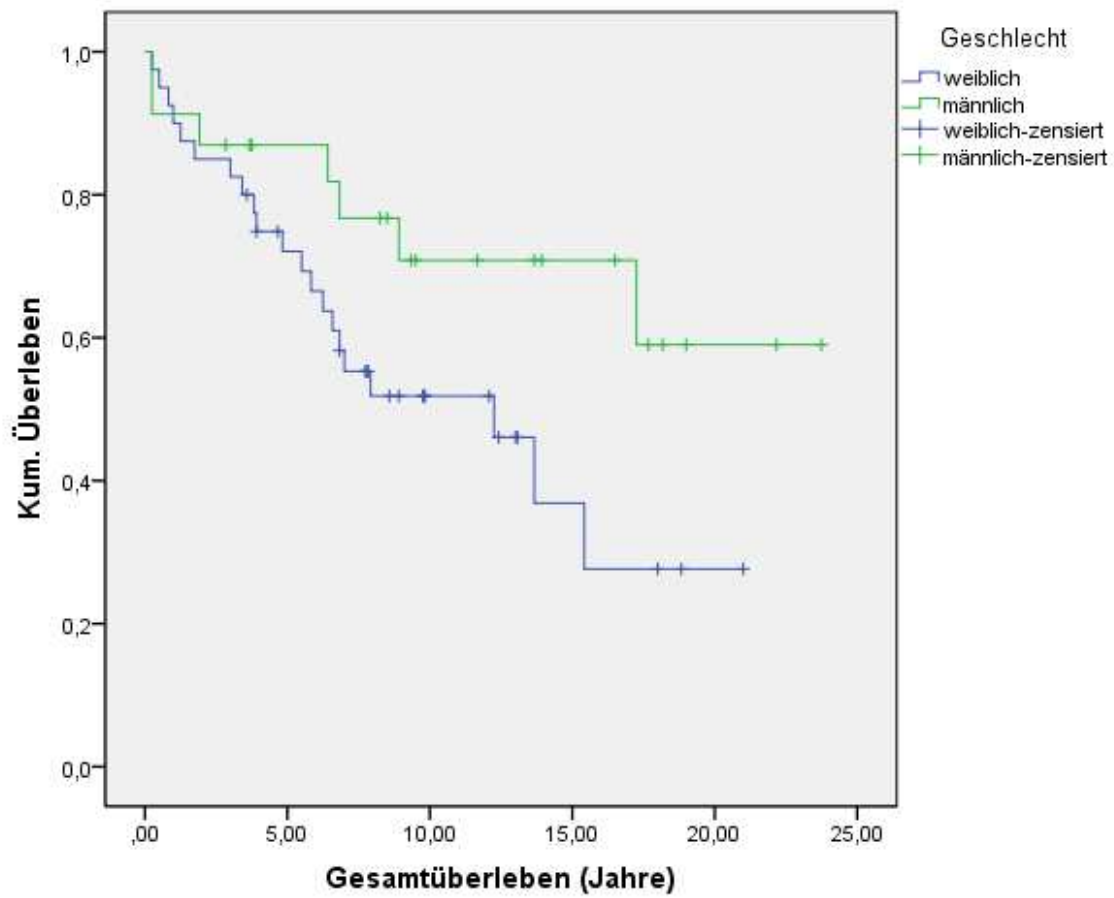


Abb. 41: Geschlechtsspezifisches Gesamtüberleben. Für das männliche Geschlecht zeigte sich ein relativer Trend zum längeren Überleben. Die Signifikanz betrug $p=0,058$.

Auch mit steigendem Erstdiagnosealter sank die Gesamt-Lebenserwartung signifikant (Abb. 42).

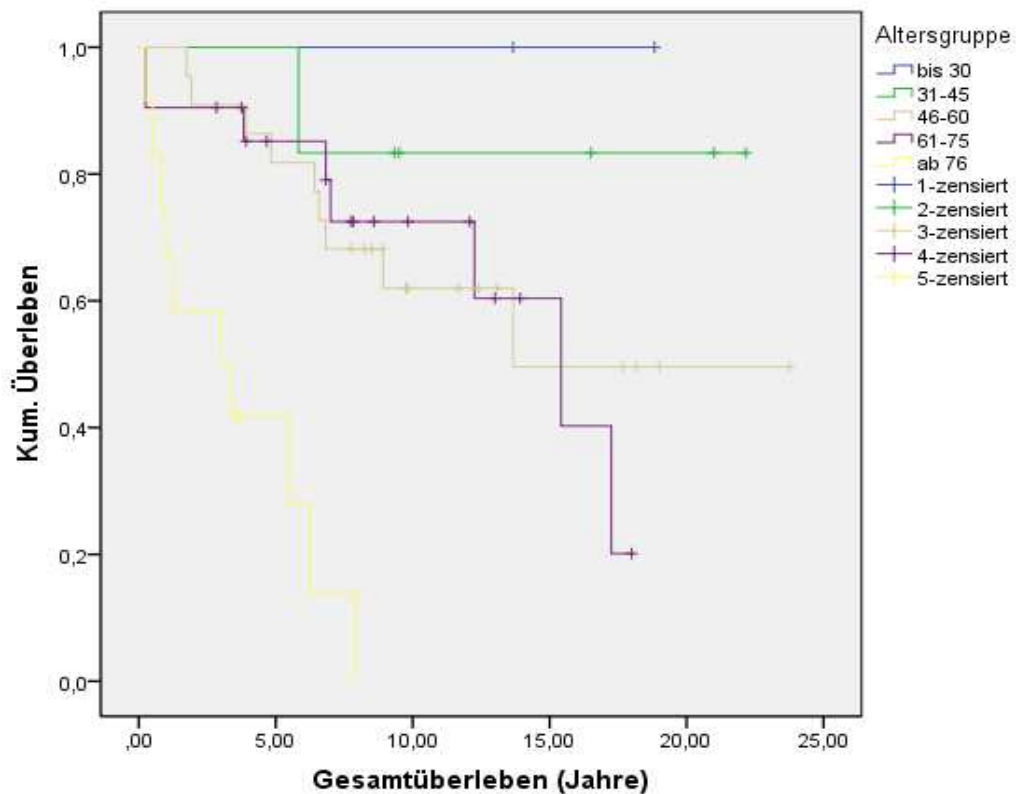


Abb. 42: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Patientenalter bei Erstdiagnose. Hochsignifikante Reduktion der Überlebensprognose mit zunehmendem Erstdiagnose-Alter ($p=0,001$).

Bei der Analyse der Gesamtüberlebensprognose in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status zeichnete sich ein Trend der HPV-positiven Tumore zum längeren Überleben aus. Dies erreichte allerdings kein signifikantes Niveau, $p=0,226$ (Abb. 43).

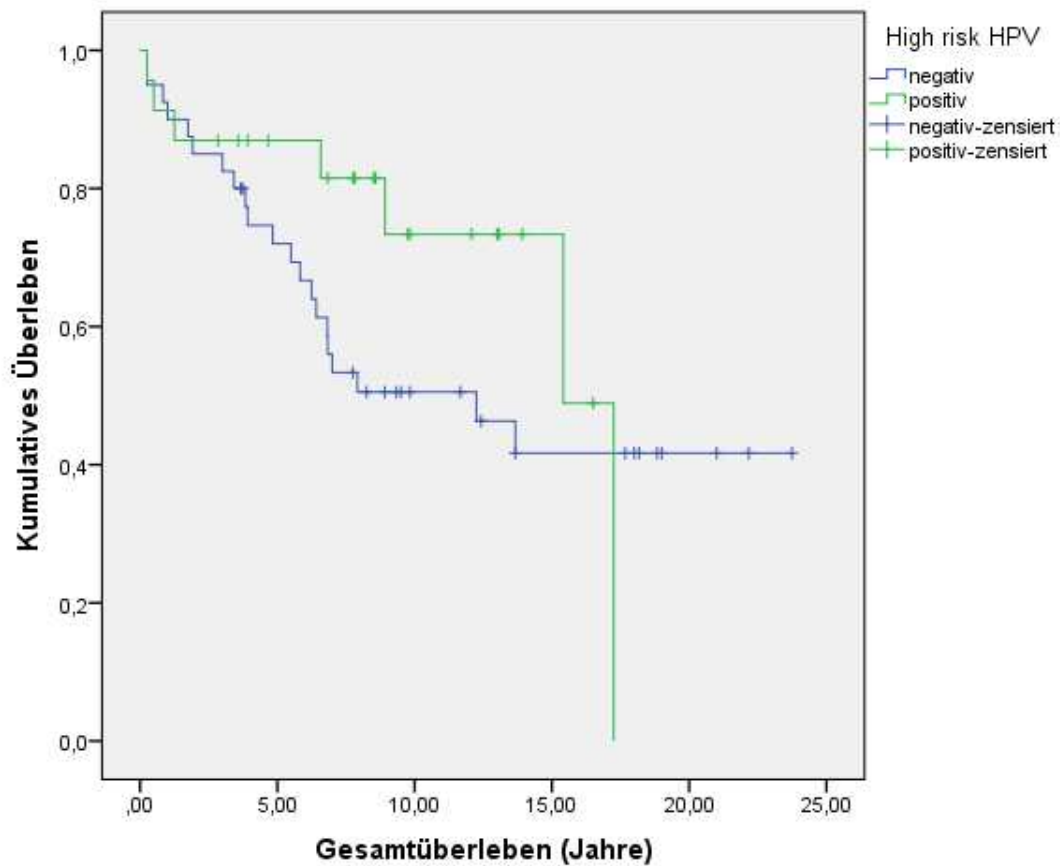


Abb. 43: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status ($p=0,226$).

Signifikant wird jedoch diese Tendenz wenn man die Gesamtüberlebenszeit in Bezug auf die Positivität für den HPV-relevanten Marker p16 untersucht (Abb. 44). Hier betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,037$. Das Verhältnis der 3-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten zwischen p16-positiven und -negativen Tumoren betrug jeweils 89%:81%, 86%:67% und 63%:39% (Abb. 45-47).

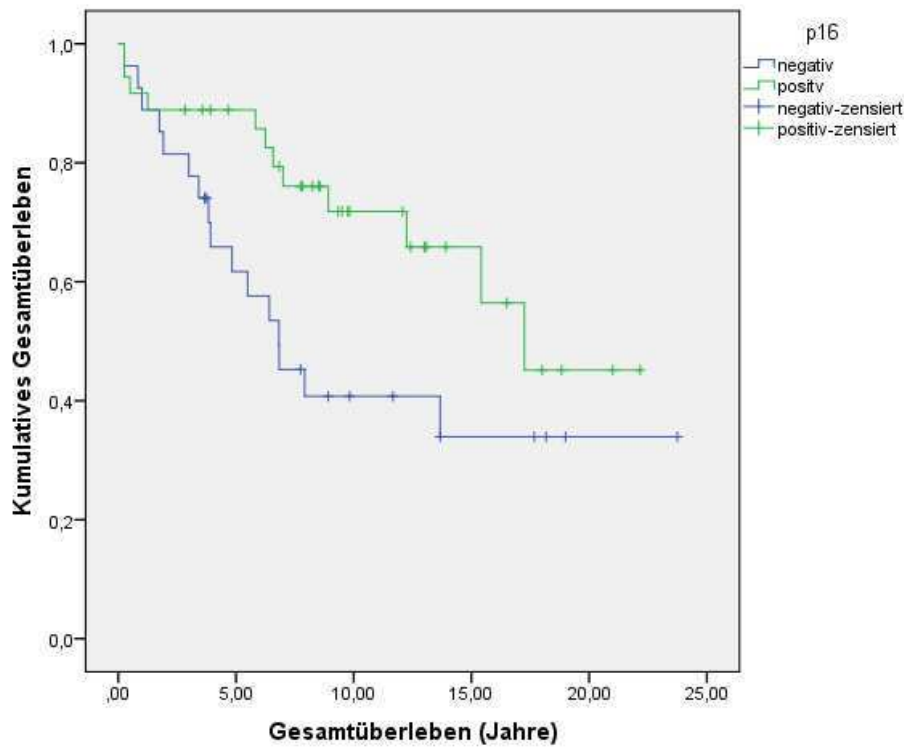


Abb. 44: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p16-Status. Signifikant bessere Überlebensprognose der p16-positiven Tumore ($p=0,037$).

Kreuztabelle
Statistik: Anteil

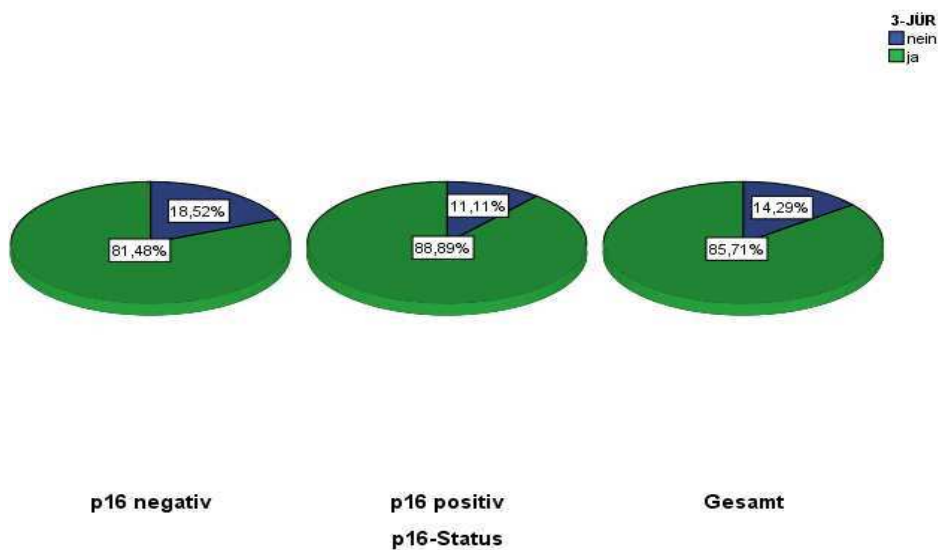


Abb. 45: 3-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status.

Kreuztabelle
Statistik: Anzahl

5-JÜR
■ nein
■ ja

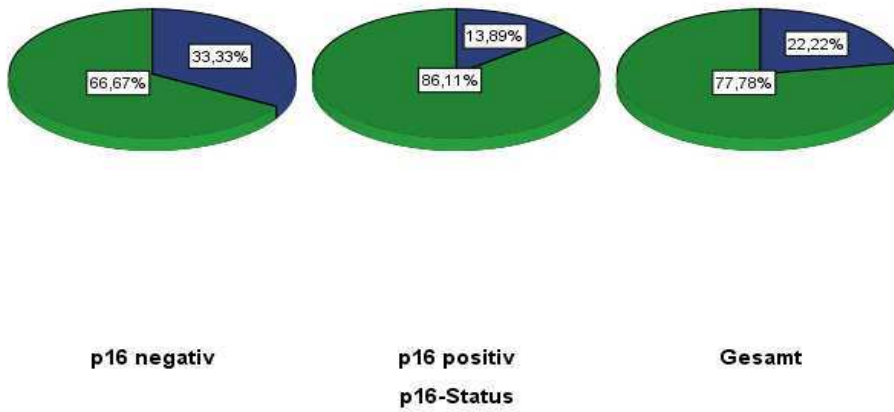


Abb. 46: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status.

Kreuztabelle
Statistik: Anzahl

10-JÜR
■ nein
■ ja

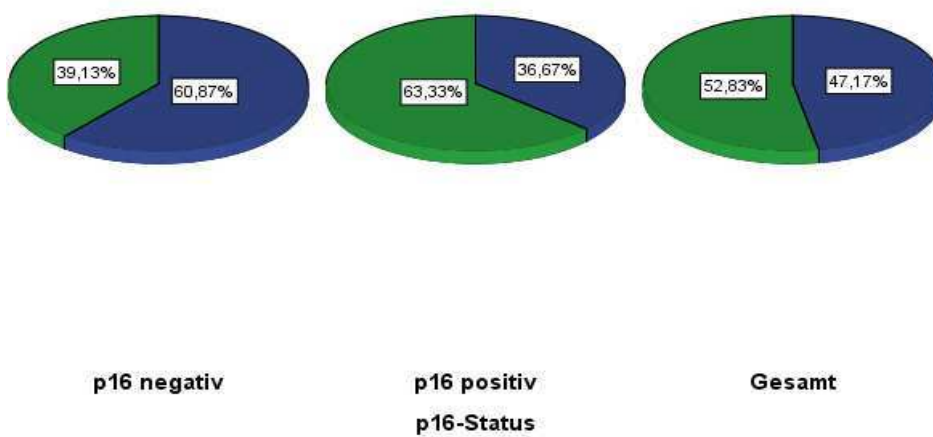


Abb. 47: 10-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status.

Auch die Expressionsstufe des proliferationsrelevanten Biomarkers Ki-67 war ein Indikator ($p=0,009$) für das Gesamtüberleben (Abb. 48).

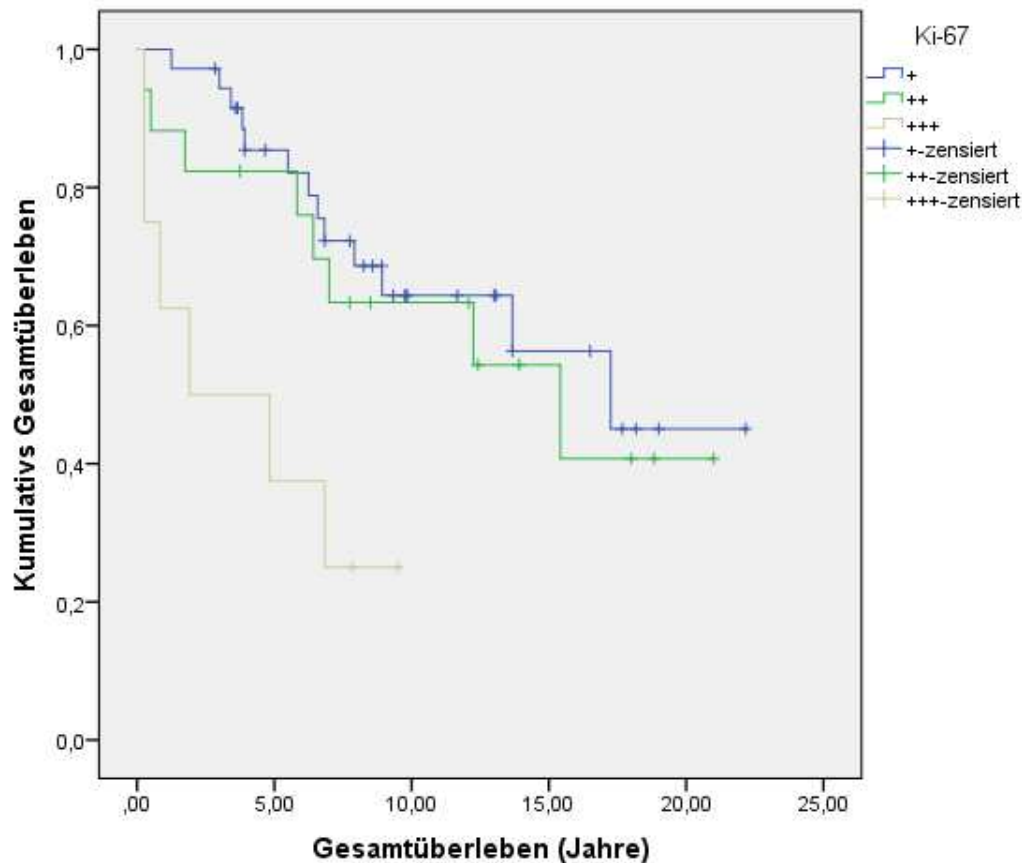


Abb. 48: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ki-67-Expressionsstatus. Mit steigender Ki-67-Expression sank die Überlebensprognose signifikant ($p=0,009$).

Für den Expressionsstatus der Biomarker p53 und EGFR konnte, ähnlich wie bei dem rezidivfreien Überleben, keine Relevanz für die Gesamtüberlebensdauer ermittelt werden (Abb. 49-50). Hier betrug die Irrtumswahrscheinlich jeweils $p=0,425$ und $p=0,717$.

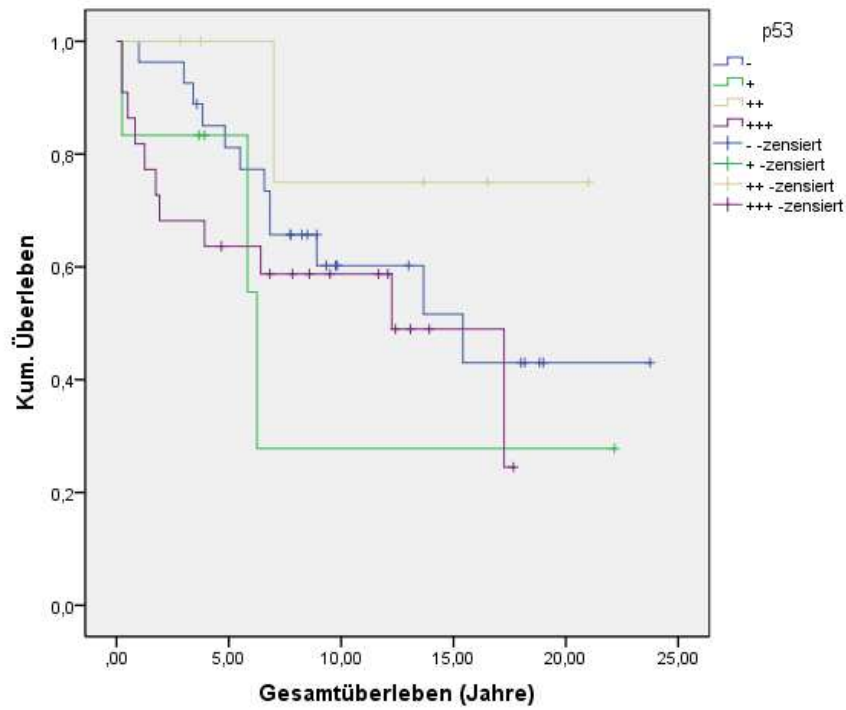


Abb. 49: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus ($p=0,425$).

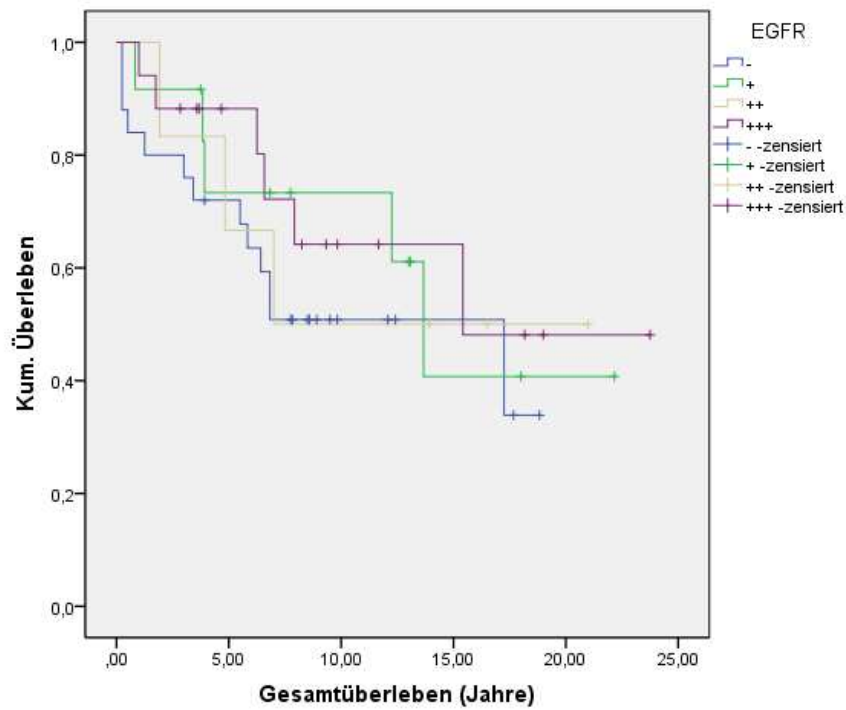


Abb. 50: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom EGFR-Status ($p=0,717$).

3.7 Histopathologische Merkmale von Rezidiven und Metastasen

Sowohl von den Lokalrezidiven (N=25) als auch den Lymphknoten- und Fernmetastasen (N=7), von denen histologische Biopsate vorlagen, wurde der HPV-Status und die p16-Expression untersucht und mit dem Status des zugehörigen Primärtumors verglichen (Tab. 29).

21 der 25 untersuchten Rezidivtumore wiesen einen identischen HPV-Status mit dem Primärtumor auf. Bei zwei Tumoren gelang der Nachweis von Hochrisiko-HPV erstmalig beim Rezidivtumor. Bei einem Rezidivtumor wurden andere Hochrisiko-HPV-Genotypen als beim Primärtumor nachgewiesen. In diesem Fall handelte es sich um ein Präparat aus dem Jahr 1983 dessen Qualität durch z.B. Verwendung ungepufferten Formalins beeinträchtigt sein könnte. Bei einem Rezidivtumor konnte der initial detektierte HR-HPV-Typ 16 nicht mehr nachgewiesen werden. Bezüglich des HPV-Status ergibt sich eine Übereinstimmungsquote zwischen Primärtumoren und Rezidiven von 84%.

Ähnlich verhielt sich auch der p16-Expressionsstatus. Bei 15 der 25 Tumore war die p16-Expressionsstufe des Rezidivtumors identisch zu derjenigen des Primärtumors, wobei bei 5 Rezidivtumoren p16 positiv blieb aber in unterschiedlicher Expressionsausprägung nachweisbar war. Die Übereinstimmungsquote für den p16-Nachweis zwischen Primär- und Rezidivtumoren betrug somit 80%.

Tab. 29: HPV- und p16-Status-Vergleich zwischen Primärtumoren und histologisch untersuchten Rezidiven.

	HPV-Primärtumor	HPV-Rezidiv	p16-Primärtumor	p16-Rezidiv
Patient AA	45	18	+	-
RA	33,59		+++	+++
AB			-	-
HC			++	++

SD	16	16	+++	+++
EG			-	-
EG	45	45	+	++
HH			-	-
IH			-	-
GH			-	++
EH			-	+
RK	11	11	-	-
FK			+	+
VK			-	-
GM	18	18	+	++
HM		16	++	+++
AN	16	16	+++	++
UO	16	16	++	+++
UP		18	-	+++
CP	18	18	++	++
IR	16	16	+++	+++
AS			++	++
HS	16	16	+++	+++
RV			++	-
GW	16	16	+++	+++
Insgesamt	25			

Bei den Metastasen war der HPV-Status bei allen 7 Tumoren identisch zum Primärtumor. Das entspricht einer 100%-igen Übereinstimmung bezüglich des HPV-Status. Die p16-Expression blieb identisch bei drei von 7 Tumoren. In drei weiteren Fällen variierte der Anteil der positiven Zellen im Vergleich zum Primärtumor. Eine einzige Metastase war schwach positiv für p16 (+) beim p16-negativen Primarius. Die auf die p16-Expression bezogene Übereinstimmungsquote zwischen Primärtumoren und deren lymphogenen oder hämatogenen Metastasen betrug 85,7% (Tab. 30).

Tab. 30: HPV- und p16-Status-Vergleich zwischen Primärtumoren und histologisch untersuchten Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Histologisch gesicherte Regional- und Fernmetastasen

			HPV- Primärtumor	HPV- Metastase	p16-Primärtumor	p16-Metastase
Patient	MD	1	16	16	+++	++
		2	16	16	+++	+
	EG	1	-	-	+	++
	HH	1	-	-	-	-
	IH	1	-	-	-	+
	AN	1	16	16	+++	+++
	HP	1	-	-	+	+
	Insgesamt	7				

4. Diskussion

Das adenoid-zystische Karzinom gilt in der westeuropäischen Bevölkerung als das häufigste Malignom der Kopfspeicheldrüsen^{3, 7}. Die Angaben zur Geschlechterverteilung (weiblich:männlich) in der Literatur variieren zwischen 7:3⁶ und 6:4¹²¹. Passend dazu betrug in unserem Kollektiv das Verhältnis 44:23 (66%:34%) (Abb. 3). Laut Ellington et al.¹²¹ lag in einem großen Kollektiv von 3026 Patienten das mediane Alter bei Erstdiagnose bei 58 Jahren. Auch dies steht im Einklang mit dem von uns ermittelten medianen Alter von 61,0 (Tab. 1), 58,0 bei männlichen und 64,5 bei weiblichen Patienten. Das Geschlechterverhältnis nahm in unserem Kollektiv mit zunehmendem Diagnosealter signifikant zu Gunsten des weiblichen Geschlechts zu. Zu der Verteilung der Lokalisation der adenoid-zystischen Karzinome der Kopfspeicheldrüsen gibt es bisher keine verlässlichen Angaben. In unserer Patientenkohorte gingen 40 (59,75%) der Tumore von den kleinen Speicheldrüsen, 17 (25,4%) von der Gl. Parotidea und 10 (14,9%) von der Gl. Submandibularis aus (Tab.3). Im weiblichen Geschlecht gegenüber dem männlichen fand sich ein relativ größerer Anteil von Tumoren der Gl. Parotidea (32%:13%) und dagegen ein eher kleinerer Anteil von Tumoren die von der Gl. Submandibularis ausgingen (11%:22%). Diese Lokalisationsverteilung wies in den verschiedenen Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Auch in Abhängigkeit von den unterschiedlichen, ermittelten T-, N- und M-Stadien zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen bei der Lokalisationsverteilung (Tab. 7-9).

Bis heute existieren keine gesicherten ätiologischen Faktoren für die Karzinogenese der adenoid-zystischen Karzinome. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Tumoren relativ geringen Häufigkeit von genetischen Veränderungen liegt eine virale Genese im Bereich des möglichen. Die Wahrscheinlichkeit einer viralen Genese einer Subpopulation der adenoid-zystischen Karzinome wird durch die sporadische mikropathologische Beobachtung von sog. Koilozyten, die u.a. auf eine HPV-Infektion hinweisen können, unterstützt und führte zur vorliegenden Studie¹³⁵.

Hauptergebnis dieser Arbeit ist die erstmalige Beschreibung der Prävalenz von onkogenen HPV in einem Kollektiv von 67 adenoid-zystischen Karzinomen und die Typisierung bzw. Kategorisierung der nachweisbaren Virus-Genotypen. Der Zusammenhang zwischen HR-HPV-Infektion und

Karzinogenese von Zervixkarzinomen bzw. von Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich wie z.B. der Tonsille gilt bereits als gesichert ^{113, 123}. Über 99% der Zervixkarzinome sind mit den Hochrisiko HPV-Typen 16, 18 und 33 assoziiert ¹²⁶. Die Angaben zu der Prävalenz der HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich variieren sehr stark in Abhängigkeit von der Nachweismethode und vom untersuchten Patientenkollektiv. In der europäischen Bevölkerung sind ungefähr 50%-70% der Tonsillenkarzinome HPV-assoziiert. In ca. 90% davon lässt sich HPV16 nachweisen ¹¹⁴. Die beiden wichtigsten, von HR-HPV-Typen stammenden viralen Onkogene sind das E6 und E7. Das E6-Protein inaktiviert p53 und inhibiert damit die Apoptose, während das E7-Protein durch Interaktion mit pRb den Zellzyklus aktiviert. Es kommt zur Akkumulation von Mutationen mit chromosomaler Instabilität bei gleichzeitiger Zunahme der Apoptoseresistenz, so daß die Tumorprogression verstärkt wird. Bisher gab es keine Daten zu einer eventuellen Assoziation zwischen HPV und adenoid-zystischen Karzinomen. Lediglich in einer Gruppe von 47 Malignomen aller Entitäten der kleinen Speicheldrüsen, darunter 17 adenoid-zystischen Karzinomen, konnte neuerdings eine p16-Positivität in 38 Fällen nachgewiesen werden ¹¹⁸. Ein direkter Virusnachweis gelang jedoch in dieser Studie nur in 2 Fällen. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Sensitivität der Virus-Nachweismethode und weiterer Einflüsse wie z.B. einer möglichen DNA-Fragmentierung bei inadäquater Lagerung.

In unserem Kollektiv konnten mittels des im Kapitel 1 beschriebenen Verfahrens bei 25 (37,3%) von 67 Patienten HR-HPV nachgewiesen werden. Der Anteil der HR-HPV-positiven Tumoren betrug 40,9% bei Frauen und 30,4% bei Männern (Abb. 9). Anders bei den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist bei den meisten Studien eine deutlich höhere HR-HPV-Prävalenz für das männliche Geschlecht beobachtet worden ^{129, 130, 131}. In 16 Fällen wurde HPV16 (64%), in 4 Fällen HPV18 (16%), in zwei Fällen HPV45 (12%), in einem Fall HPV45 und HPV 56 und in zwei Fällen HPV33 und HPV59 (12%) nachgewiesen. Bei drei Patienten wurde eine Infektion mit dem Niedrigrisiko-Genotypen 11 beobachtet. In diesen drei Fällen war der als HR-HPV-relevant angesehene Marker p16 negativ. Dadurch wird deutlich, daß p16 ein adäquates, jedoch nicht uneingeschränkt verwertbares Äquivalent für den Nachweis einer HPV-Assoziation ist. HPV16 war ähnlich wie bei den Tonsillen- und Zervixkarzinomen der mit Abstand am häufigsten nachweisbare HPV-Genotyp und machte 64% der HR-Typen aus. Bei 39 Patienten konnte keine HPV-DNA nachgewiesen werden (Tab. 10, Abb. 8). Bezüglich der HR-HPV-Nachweisrate bei verschiedenen Tumorlokalisationen ergaben sich interessanterweise, signifikante Unterschiede

($p=0,03$). So waren 58,82% der Tumore der Gl. Parotidea, 32,5% der Tumore der kleinen Speicheldrüsen und nur 20% der Tumore der Gl. Submandibularis positiv für HR-HPV (Tab. 11, Abb. 10). Diese Beobachtung könnte auf mögliche Zusammenhänge bzgl. des Infektionsweges in Abhängigkeit von den anatomischen und physiologischen Besonderheiten (Ganglänge, -weite, Sekretmenge, -zusammensetzung und -viskosität) oder von der unterschiedlichen Suszeptibilität der Zellen der verschiedenen Kopfspeicheldrüsen hinweisen. Auch in Bezug auf das Patientenalter bei der Erstdiagnose ergaben sich Unterschiede. Es wurde eine Steigerung des Anteils der HR-HPV-positiven Tumore mit zunehmendem Alter beobachtet. Erst bei älteren Patienten der Gruppe 5 (ab 76 Jahren) wurde dieser Anteil wieder kleiner (Tab. 12, Abb. 11). Diese Beobachtung weicht von Untersuchungsergebnissen bei HR-HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ab, die eine höhere Inzidenz bei jüngeren Patienten zeigen¹²⁹. Ein Zusammenhang zwischen HR-HPV-Nachweis und dem TNM-Stadium der Tumore konnte nicht gefunden werden (Tab. 13-15). Dies steht im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen¹²⁹.

HPV-positive unterscheiden sich von HPV-negativen Oropharynxkarzinomen bezüglich klinisch-pathologischer Charakteristika, der Expression verschiedener Zell-Zyklusproteine sowie aufgrund genetischer Veränderungen. Bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen weisen die p16-Expression und das Vorhandensein von onkogener HPV-DNA eine hohe Korrelation auf¹¹⁵. Es ist bekannt, dass transkriptionell aktive HPV16-E7-positive Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich in 90% der Fälle p16 koexprimieren. Eine Inhibition des Tumorsuppressorproteins pRb durch HPV16 E7 führt zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und zu einer Hochregulation von p16 durch den Verlust der negativen Expressionskontrolle durch pRb. P16 wird deshalb als ein, der HR-HPV-Typisierung äquivalenter Marker, der für die routinemäßige histopathologische Diagnostik insbesondere von Tonsillenkarzinomen geeignet ist, angesehen^{115, 124, 125}. Die Analyse des p16-Status in Bezug auf die Nachweisbarkeit von HR-HPV in unserem Patientenkollektiv ergab auch wie erwartet, eine signifikant höhere p16-Expression ($p=0,01$, $R=0,705$) bei den Tumoren die einen positiven HR-HPV-Status aufwiesen (Tab. 16, Abb. 12). Alle HR-HPV-positiven Tumore waren positiv für p16. Dagegen waren die LR-HPV11 positiven Tumore alle p16-negativ. Bei den 42 HR-HPV-negativen Tumoren zeigten 28 davon einen negativen p16-Status während bei 14 Präparaten p16 in unterschiedlichem Ausmaß positiv war. Inwieweit hier nicht detektierte HPV-Assoziationen oder die natürliche Seneszenz des Gewebes eine

Rolle spielen kann zunächst nicht geklärt werden. Die Verteilung dieser 14 HR-HPV-negativen und trotzdem p16-positiven Tumore in den verschiedenen Altersgruppen entsprach dem Verteilungsmuster für das gesamte Kollektiv, so daß hier keine Assoziation dieser Befundkonstellation mit Alterungsprozessen angenommen werden kann. Im Gegensatz dazu konnte keine Korrelation, wie bei anderen HR-HPV-induzierten Tumoren, zwischen dem Nachweis von HR-HPV und einer Herabregulation des p53-Expressionsstatus gesehen werden, $p=0,352$ (Tab. 18). Bezogen auf den Ki-67-Expressionsstatus fiel lediglich für die höchste Ki-67- Expressionsstufe (+++) eine höhere Inzidenz bei den HR-HPV-negativen Tumoren auf (7:1) (Tab. 19), eine signifikante Korrelation war jedoch nicht nachweisbar ($p=0,187$).

Unter der hypothetischen Annahme, daß wie bei den Plattenepithelkarzinomen p16 ein zuverlässiger Marker für eine HPV-Infektion ist, würde sich in unserem Patientenkollektiv eine HR-HPV-Prävalenz von 39:67 (58,2%) ergeben. Im Einklang mit dieser Annahme steht auch die Korrelation der p16-Positivität sowohl mit der Tumorlokalisierung als auch mit dem Erstdiagnosealter in unserem Kollektiv. Ähnlich wie bei der Lokalisationsverteilung von HR-HPV-positiven Tumoren fand sich bei den Tumoren der Gl. Parotidea eine relativ höhere prozentuale p16-Gewebeexpression, gefolgt von den Tumoren der kleinen Speicheldrüsen. Bei Tumoren der Gl. Submandibularis war p16 weniger häufig exprimiert (Tab. 21). Gleich verhielt sich der p16-Expressionsstatus auch bei der Verteilung in den unterschiedlichen Erstdiagnose-Altersgruppen. Die p16-Expression stieg mit zunehmendem Diagnosealter, erreichte ihr Maximum in der Altersgruppe 4 (61-75 Jahre) um erst in der Altersgruppe 5 (ab 76 Jahren) wieder abzufallen (Tab. 22). Zwischen p16-Expressionsstatus und den unterschiedlichen T-, N- und M-Stadien konnte wie für HR-HPV auch kein Zusammenhang beobachtet werden. Genauso wie zwischen HR-HPV-Nachweis und p53 konnte auch zwischen dem p16- und dem p53-Expressionsstatus keine Korrelation ermittelt werden (Abb. 16). Das Verhalten der p16-Expression zu den verschiedenen Variablen war zusammenfassend betrachtet sehr ähnlich zu dem des HR-HPV-Status.

Der bisher am häufigsten verwendete, prognostisch relevante Biomarker für adenoid-zystische Karzinome ist Ki-67, dessen Korrelation mit steigender Proliferationsrate bei mehreren Malignomen bekannt ist. Unter den Speicheldrüsentumoren ist Ki-67 bei adenoid-zystischen Karzinomen deutlich höher exprimiert als z.B. bei niedrig-malignen Adenokarzinomen^{109, 110}. Außerdem korreliert die Ki-67-Expressionsrate bei den adenoid-zystischen Karzinomen eindeutig mit der

Überlebensprognose^{106, 107}. So fand sich auch in unserem Kollektiv eine Korrelation zwischen Ki-67-Expressionsstufe und N- (p=0,054), sowie M-Stadium (p=0,019). Tumore mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen zeigten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine vergleichsweise erhöhte Ki-67-Expression (Abb. 18-19). Ebenso interessant war die ermittelte umgekehrt proportionale Korrelation zwischen Ki-67- und EGFR-Expressionsstufe (Abb. 20). Hierbei ergab sich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson $R = -0,277$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,025$. Es gibt zwei Möglichkeiten zur Erklärung dieser Beobachtung. Tumorzellen könnten durch einen EGFR-Verlust EGF-unabhängig geworden sein. Das würde zu einer erhöhten Proliferation und damit zu einer höheren Ki-67-Expression führen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Tumorzellen das EGF-Analogon TGF-alpha sezernieren. Dies bindet an EGFR und führt zu einer Heruntermodulierung dessen. Dadurch entstünde ein Wachstumssignal was wiederum zu einer erhöhten Ki-67-Expression führen würde.

Bei den p16-positiven Tumoren mit einer hohen Ki-67-Expression konnte keine höhere HR-HPV-Assoziation im Vergleich zu den Tumoren mit einer niedrigeren Ki-67-Expression gezeigt werden. Umgekehrt war unter den HR-HPV-negativen und p16-positiven Tumoren die Ki-67-Expression nicht überproportional niedrig. Die Hypothese einer altersbedingten p16-Überexpression konnte daher anhand unserer Daten nicht gestützt werden.

Bezüglich des Gesamtüberlebens erfolgte eine Multivariantanalyse auf mögliche Kovarianten wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, TNM-Stadium, HR-HPV, p16 und für die restlichen Biomarker p53, Ki-67 und EGFR. Die gesamte 3-, 5- und 10-Jahresüberlebensrate betrug jeweils 86%, 78% und 53%. T- und N- Stadium hatten, wie von anderen Studien bekannt¹²¹, keinen Einfluß auf die Überlebensprognose (Abb. 38, 39). Bei zum Zeitpunkt der Diagnose bereits fernmetastasierten Tumoren (M1) sank dagegen das Gesamtüberleben signifikant, $p = 0,027$ (Abb. 40). Im Gegensatz zu anderen Studien, wo das männliche Geschlecht eine schlechtere Prognose aufwies, zeigte sich in unserem Kollektiv für männliche Patienten ein Trend zu einer längeren Überlebensdauer als beim weiblichen Geschlecht, $p = 0,058$ (Abb. 41). Es ist jedoch anzumerken, daß in unserem Kollektiv der Anteil der männlichen Patienten mit zunehmendem Erstdiagnosealter signifikant sank, so daß die bessere Prognose zum großen Teil durch das niedrigere mediane Alter für das männliche Geschlecht zum Zeitpunkt der Diagnose in unserem Patientenkollektiv zu erklären ist. Auch mit steigendem Erstdiagnosealter sank die Gesamt-Lebenserwartung signifikant,

was allerdings sicher zum Teil auch durch die steigenden Komorbiditäten im Alter zu erklären ist (Abb. 42). Ellington et al.¹²¹ beschrieben eine signifikant schlechtere Überlebensprognose bei Patienten mit adenoid-zystischen Karzinomen des Oropharynx in Vergleich mit Patienten bei denen die Tumore in den großen Speicheldrüsen lokalisiert waren. Bei unserem Kollektiv fand sich statistisch kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Abb. 37). Bei der Analyse der Gesamtüberlebensprognose in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status zeichnete sich ein Trend der HR-HPV-positiven Tumore zum längeren Überleben aus. Dies erreichte allerdings kein signifikantes Niveau (Abb. 43). Signifikant wird jedoch diese Tendenz wenn man die Gesamtüberlebenszeit in Bezug auf die Positivität für den HPV-relevanten Marker p16 untersucht (Abb. 44). Patienten mit einem p16-positiven Tumor hatten eine deutlich bessere Überlebensprognose als diejenigen mit einem negativen p16-Status. Hier betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,037$. Das Verhältnis der 3-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten zwischen HR-HPV-positiven und -negativen Tumoren betrug jeweils 89%:81%, 86%:67% und 63%:39% (Abb. 45-47). Diese Signifikanzsteigerung lässt auch mutmaßen, daß bei einem Anteil der HPV-positiven-Tumore möglicherweise nur p16, aber nicht virale DNA nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde passen zu der mittlerweile mehrfach statistisch nachgewiesenen, besseren Prognose der HR-HPV-positiven Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome^{129, 132}. In Anbetracht der höheren Inzidenz von HR-HPV und p16-Positivität in den höheren Altersstufen unseres Kollektivs wird der prognostisch günstige Charakter des HR-HPV-Nachweises für den Krankheitsverlauf noch deutlicher. Für den Proliferationsaktivitätsmarker Ki-67 ergab sich bei steigender Expressionsrate eine signifikant schlechtere Gesamtüberlebensprognose, $p=0,009$ (Abb. 48). Diese Korrelation wurde bereits in anderen Studien belegt^{106, 107}. Für den Expressionsstatus der Biomarker p53 und EGFR konnte keine Relevanz für die Gesamtüberlebensdauer ermittelt werden (Abb. 49-50). Alle vorgenannten Kovarianten wurden ebenso auf eine mögliche Korrelation mit der rezidivfreien Überlebenszeit untersucht. Sowohl die Tumorlokalisation (Abb. 21) als auch das T- (Abb. 22) und N-Stadium (Abb. 23) hatten keinen Einfluß auf die rezidivfreie Überlebensdauer. Fürs männliche Geschlecht ergab sich, wie für das Gesamtüberleben, eine signifikant bessere Prognose ($p=0,036$) bzgl. der rezidivfreien Überlebenszeit (Abb. 25). Im Vergleich männlich: weiblich betrug die 3-, 5- und 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate jeweils 87%:70%, 78%:51% und 58%:26% (Abb. 26, 27, 28). Hier sei wieder auf die unterschiedliche Geschlechterverteilung in den Altersstufen unseres

Patientenkollektivs hingewiesen. So hatte auch das steigende Erstdiagnosealter einen negativen Einfluß ($p=0,001$) auf die rezidivfreie Prognose (Abb. 24).

Im Gegensatz zu der Gesamtüberlebenszeit konnte für die rezidivfreie Überlebenszeit eine prognostische Korrelation weder zum HR-HPV-Status (Abb. 29) noch zu der Positivität für den HPV-relevanten Biomarker p16 (Abb. 30) ermittelt werden. Bei der Untersuchung der rezidivfreien Überlebensdauer für die unterschiedlichen Expressionsstufen des proliferationsrelevanten Markers Ki-67 fiel ein relativer Abfall der rezidivfreien Prognose mit zunehmender Expressionsrate auf (Abb. 31), ohne jedoch ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen ($p=0,162$). P53 und EGFR hatten wie für das Gesamtüberleben keinen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben.

Ferner, wurde bei den histologisch gesicherten Lokalrezidiven sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen der Patienten unseres Kollektivs nach den gleichen Verfahren der HPV- und p16-Status untersucht und mit denen des jeweiligen Primärtumors verglichen. In der Mehrheit der Fälle entsprachen die Befunde der HPV- und p16-Bestimmung denen der Primärtumore. Diese Tatsache kann als Bestätigung für eine mögliche Kausalität der HR-HPV-Infektion für die Onkogenese des adenoid-zystischen Karzinoms aufgefasst werden. Die punktuelle Nichtübereinstimmung könnte durch eine fehlende HPV-Detektion bei älteren Primarius-Präparaten schlechterer Qualität bedingt sein.

In Zusammenschau der Befunde ergibt sich ein erstmalig beschriebenes, beträchtliches Prävalenzniveau von HR-HPV bei den adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen. Interessant ist weiterhin das anscheinend ähnliche Expressionsmuster von relevanten Biomarkern in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status, hier sei vor allem p16 genannt, wie bei anderen, besser untersuchten, HPV-induzierten Malignomen. Die Analyse liefert außerdem erste Hinweise auf eine mögliche prognostische Relevanz einer HPV-Assoziation für diese Tumorentität. Ein limitierender Faktor bei der Evaluation der Ergebnisse ist die beschränkte Fallanzahl des Kollektivs, die unter anderem auch durch die relativ niedrige Inzidenz des adenoid-zystischen Karzinoms in der Bevölkerung bedingt ist. Diese ersten gewonnenen Ergebnisse müssten zweifelsfrei im Rahmen von größeren, ggf. multizentrischen Studien verifiziert, ergänzt und ggf. bestätigt werden.

Eine so verbesserte Datenlage über für die Prognose und den Krankheitsverlauf bedeutsamen Faktoren könnte zukünftig zu differenzierteren therapeutischen Vorgehensweisen sowie zu der Übernahme von etablierten, systemischen Therapiansätzen von anderen HPV-induzierten Kopf-Hals-Malignomen, ggf. bei selektierten Patientenpopulationen führen. Auch eine Übertragung von

neuen Therapieformen bzw. Vakzinierungsstrategien, die derzeit für genitale HPV-induzierte Erkrankungen entwickelt werden, wäre dann zu prüfen.

5. Zusammenfassung

Das adenoid-zystische Karzinom gilt als eines der häufigsten Malignome der Kopfspeicheldrüsen, jedoch ist über seine Ätiologie und assoziierte Risikofaktoren bis heute wenig bekannt. Da genetische Alterationen selten sind, werden z.B. Genmutationen, epigenetische Regulation oder eine virale Genese diskutiert. Eine persistierende HR-HPV-Infektion steht in ätiologischem Zusammenhang mit einer Reihe von Karzinomen im Anogenital- und Kopf-Hals-Bereich. Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die erstmalige retrospektive Untersuchung der Prävalenz von onkogenen HPV in adenoid-zystischen Karzinomen und ihr Einfluß, im Zusammenspiel mit den Biomarkern p16-, p53-, Ki-67 und EGFR auf die Prognose der Erkrankung. Hierdurch könnte, in Anlehnung an Erkenntnisse bei HPV-assoziierten Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, eine Subpopulation mit bekanntem auslösendem Agens definiert werden. Das retrospektiv untersuchte Patientenkollektiv umfasste 67 Patienten. Klinischen Daten wurden aus den Patientenakten und dem Deutschen Nationalen Krebsregister erhoben und Gewebeschnitte aus den Tumorpräparaten für immunhistochemische Analysen von p16, p53, Ki-76 und EGFR und für die HPV-Genotypisierung mittels der Luminex-Methode angefertigt. Letztere kann zwischen 27 unterschiedlichen HPV-Genotypen differenzieren und ist außerdem aufgrund der kleinen Amplifikat-Größe besonders sensitiv. Das untersuchte Kollektiv beinhaltete 44 Frauen (65,7%) und 23 Männer (34,3%). Das Alter bei Erstdiagnose lag zwischen 16 und 90 Jahren, im Mittel 64,2 bei Frauen und 55,9 bei Männern. 40 (59,75%) der Tumore gingen von den kleinen Speicheldrüsen, 17 (25,4%) von der Glandula Parotidea und 10 (14,9%) von der Glandula Submandibularis aus. 25 (37,3%) der 67 Tumore waren HR-HPV-positiv und es wurde 16 mal HPV16, 4 mal HPV18, 2 mal HPV45, je 1 mal HPV45 und HPV56 und 2 mal HPV33 und HPV59 detektiert. Bei drei Patienten wurde eine Infektion mit dem Niedrigrisiko-Genotypus 11 beobachtet. Bei 39 Patienten wurde keine HPV-DNA nachgewiesen. 58,82% der Tumore der Gl. Parotidea, 32,5% der Tumore der kleinen Speicheldrüsen und nur 20% der Tumore der Gl. Submandibularis waren für HR-HPV positiv. Die Verteilung der p16-Expression zeigte ein vergleichbares Muster und korrelierte hochsignifikant mit der HR-HPV-Positivität. Mit zunehmendem Alter wurde eine Steigerung des Anteils der HR-HPV- und p16-positiven Tumore beobachtet. Zwischen HPV bzw. p16 und den Biomarkern p53, Ki-67 und EGFR konnte keine Korrelation beobachtet werden.

Die Tumorlokalisation, das T- und N-Stadium hatten keinen Einfluß auf das rezidivfreie oder auf das Gesamtüberleben. Bei zum Zeitpunkt der Diagnose bereits fernmetastasierten Tumoren (M1) war die Überlebensprognose schlechter. Für das männliche Geschlecht war die Prognose der Erkrankung in unserem Kollektiv besser. Das zunehmende Diagnosealter hatte eine negative Wirkung auf die Gesamt- und Rezidivfreiheitsprognose. Im Einklang mit den bereits vorhandenen Erkenntnissen über die HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome scheint der Nachweis einer HR-HPV-Assoziation und p16-Expression bei adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen einen positiven Einfluß auf das Gesamtüberleben, jedoch nicht auf das rezidivfreie Überleben zu haben. Eine zunehmende Expression des proliferationsrelevanten Biomarkers Ki-67 korrelierte mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben. Für die restlichen Biomarker p53 und EGFR konnte kein Zusammenhang mit der Prognose der Erkrankung ermittelt werden. Bezüglich des HPV- und p16-Status verhielt sich die große Mehrheit der histologisch untersuchten Rezidive und Metastasen identisch zu dem jeweiligen Primärtumor, was auf eine mögliche Kausalität der HPV-Infektion für die Onkogenese hinweisen könnte.

Im Rahmen dieser Studie gelang erstmalig eine Prävalenzbestimmung von HPV bei den adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen. Hierdurch konnte eine Subgruppe von adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen definiert werden. Die Erkenntnisse über die Ähnlichkeit des adenoid-zystischen Karzinoms bzgl. der prognostischen Bedeutung von HPV, zu anderen, häufigeren und bezüglich dieses Aspektes besser untersuchten Tumorentitäten könnte eine sinnvolle Übertragung von Therapiestrategien in der Zukunft begünstigen. Diese ersten Ergebnisse bedürfen zweifelsohne weiterer Verifizierung im Rahmen von größeren Studien.

6. Literaturverzeichnis

1. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 2005;114:806-16
2. Barnes L EJ, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics, Head and Neck Tumours., 2005
3. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol* 1985;146(1):51-8
4. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 1986;8:177-84
5. Bell RB, Dierks EJ, Homer L, Potter BE. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:917-28
6. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med* 2007;36:207-14
7. Eneveroth CM. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland, and the palate region. *Cancer* 1971;27(6):1415-8
8. Yih WY, Kratochvil FJ, Stewart JC. Intraoral minor salivary gland neoplasms: review of 213 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(6):805-10

9. Waldron CA, el-Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(3):323-33
10. Regezi JA, Lloyd RV, Zarbo RJ, McClatchey KD. Minor salivary gland tumors. A histologic and immunohistochemical study. *Cancer* 1985;55(1):108-15
11. Toida M, Shimokawa K, Makita H, et al. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(5):528-32
12. Isacson G, Shear M. Intraoral salivary gland tumors: a retrospective study of 201 cases. *J Oral Pathol* 1983;12(1):57-62
13. Roh J-L, Kim J-M, Park CI. Synchronous benign and malignant tumors in the ipsilateral parotid gland. *Acta Oto-Laryngologica* 2007;127(1):110 – 112
14. T. Billroth, Beobachtung über Geschwülste der Speicheldrüsen, *Virchow Arch. A* 17 (1859) 357–375
15. J.D. Reid, Adenoid cystic carcinoma (cylindroma) of the bronchial tree, *Cancer* 5 (1952) 685–694
16. F.W. Foote, E.L. Franzell, Tumors of the salivary glands, *Cancer* 6 (1953) 1065–1133
17. J. Albores-Saavedra, C. Manivel, A. Mora, F. Vuitch, S. Milchgrub, E. Gould, The solid variant of adenoid cystic carcinoma of the cervix, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 11 (1992)2–10
18. L.S. Eby, D.S. Johnson, H.W. Baker, Adenoid cystic carcinoma of the head and neck, *Cancer* 29 (1972)1160–1168
19. H.M. Matsuba, G.J. Spector, S.E. Thawley, J.R. Simpson, M. Mauney, F.J. Pikul, Adenoid cystic salivary glands carcinoma: a histopathology review of treatment failure patterns, *Cancer* 57

(1986) 519–524

20. K.H. Perzin, P. Gullane, A.C. Clairmont, Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course, *Cancer* 42 (1978) 265–282
21. R.H. Spiro, A.G. Huvos, Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma, *Am. J. Surg.* 164 (1992) 623–628
22. R.H. Spiro, A.G. Huvos, E.W. Strong, Adenoid cystic carcinoma: factors influencing survival, *Am. J. Surg.* 138 (1979) 579–583
23. Y. Yamamoto, I.I. Wistuba, Y. Kishimoto, A.K. et al., DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining, *Pathol. Int.* 48 (1998) 273–280
24. Spiro RH. Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. *Am J Surg* 1997; 174:495–498
25. Gomez DR, Hoppe BS, Wolden SL, Zhung JE, Patel SG, Kraus DH, Shah JP, Ghossein RA, Lee NY. Outcomes and prognostic variables in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a recent experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70:1365–72
26. Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iorda-nidis F, Koufogiannis D. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:1114–20
27. Howard DJ, Lund VJ. Reflections on the management of adenoid cystic carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985; 93:338–41
28. Khan AJ, DiGiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter D, Son YH, Haffy BG. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001; 96:149–58

29. Prokopakis EP, Snyderman CH, Hanna EY, Carrau RL, Johnson JT, D'Amico F. Risk factors for local recurrence of adenoid cystic carcinoma: the role of postoperative radiation therapy. *Am J Otolaryngol* 1999; 20:281–6
30. Esmaeli B, Ahmadi MA, Youssef A, Diba R, Amato M, Myers JN, Kies M, El-Naggar A. Outcomes in patients with adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2004; 20:22–6
31. Friedrich RE, Bleckmann V. Adenoid cystic carcinoma of salivary and lacrimal gland origin: localization, classification, clinical pathological correlation, treatment results and long-term follow-up control in 84 patients. *Anticancer Res* 2003; 23: 931–40
32. Gaissert HA, Grillo HC, Shadmehr MB, Wright CD, Gokhale M, Wain JC, Mathisen DJ. Long-term survival after resection of primary adenoid cystic and squamous cell carcinoma of the trachea and carina. *Ann Thorac Surg* 2004; 78:1889–96 [discussion 1896–1897].
33. Mashkevich G, Undavia S, Iacob C, Arigo J, Linstrom C. Malignant cylindroma of the external auditory canal. *Otol Neurotol* 2006; 27:97–101
34. Muslimani AA, Ahluwalia MS, Clark CT, Daw HA. Primary adenoid cystic carcinoma of the breast: case report and review of the literature. *Int Semin Surg Oncol* 2006; 3:17
35. Rhee CS, Won TB, Lee CH, Min YG, Sung MW, Kim KH, Shim WS, Kim YM, Kim JW. Adenoid cystic carcinoma of the sinonasal tract: treatment results. *Laryngoscope* 2006; 116:982–6
36. Yang SY, Lee JW, Kim WS, Jung KL, Lee SJ, Lee JH, Bae DS, Kim BG. Adenoid cystic carcinoma of the Bartholin's gland: report of two cases and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2006; 100:422–5
37. Carlinfante G, Lazzaretti M, Ferrari S, Bianchi B, Crafa P. p53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate. A clinico-pathologic study of 21 cases with long-term

follow-up. *Pathol Res Pract*. 2005; 200(11-12):791-9

38. Lin YC, Chen KC, Lin CH, Kuo KT, Ko JY, Hong RL. Clinicopathological features of salivary and non-salivary adenoid cystic carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan 7
39. Schneider AB, Favus MJ, Stachura ME, Arnold MJ, Frohman LA. Salivary gland neoplasms as a late consequence of head and neck irradiation. *Ann Intern Med* 1977; 87(2):160-4
40. Beal KP, Singh B, Kraus D, Yahalom J, Portlock C, Wolden SL. Radiation-induced salivary gland tumors: a report of 18 cases and a review of the literature. *Cancer J* 2003;9(6):467-71
41. Saku T, Hayashi Y, Takahara O, et al. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer* 1997; 79(8):1465-75
42. Klussmann JP, Muller A, Wagner M, et al. Human herpesvirus type 8 in salivary gland tumors. *J Clin Virol* 2000; 16(3):239-46
43. Liu J, Shao C, Tan ML, Mu D, Ferris RL, Ha PK., Molecular biology of adenoid cystic carcinoma. *Head Neck*. 2011 Oct 17. doi: 10.1002/hed.21849
44. Bell D, Hanna EY. Salivary Gland Cancers: Biology and Molecular Targets for Therapy. *Curr Oncol Rep*. 2012 Jan 14
45. Sandros J, Stenman G, Mark J. Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer. Genet Cytogenet* 1990; 44:153–167
46. Stenman G, Sandros J, Dahlenfors R, Juberg–Ode M, Mark J. 6q- and loss of the Y chromosome—two common deviations in malignant human salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22:283–293

47. Mark HF, Hanna I, Gnepp DR. Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:187–192
48. Jin C, Martins C, Jin Y, et al. Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by FISH, including multicolor COBRA- FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30:161–167
49. El-Rifai W, Rutherford S, Knuutila S, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12–q13 in adenoid cystic carcinoma. *Neoplasia* 2001; 3:173–178
50. Rao PH, Roberts D, Zhao YJ, et al. Deletion of 1p32–p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5181–5187
51. Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, et al. Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 159:89–95
52. Toida M, Balazs M, Mori T, et al. Analysis of genetic alterations in salivary gland tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 127:34–37
53. Frierson HF Jr, El-Naggar AK, Welsh JB, et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 161:1315–1323
54. Patel KJ, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. Genes associated with early development, apoptosis and cellcycle regulation define a gene expression profile of adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42:994–1004
55. Frierson HF Jr, El-Naggar AK, Welsh JB, et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:1315–

56. Rutherford S, Hampton GM, Frierson HF, Moskaluk CA. Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 2005; 85:1076–1085
57. Yu Y, Baras AS, Shirasuna K, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Concurrent loss of heterozygosity and copy number analysis in adenoid cystic carcinoma by SNP genotyping arrays. *Lab Invest* 2007; 87:430–439
58. Rutherford S, Yu Y, Rumpel CA, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Chromosome 6 deletion and candidate tumor suppressor genes in adenoid cystic carcinoma. *Cancer Lett* 2006; 236:309–317
59. Pramoonjago P, Baras AS, Moskaluk CA. Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene* 2006; 25:5626–5639
60. Liao YL, Sun YM, Chau GY, et al. Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprinting-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008; 27:5578–5589
61. Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson HF Jr. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol* 1999;12:956–960
62. Perez-Losada J, Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, et al. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood* 2002; 100:1274–128.
63. Tang Y, Liang X, Zheng M, et al. Expression of c-kit and Slug correlates with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2010; 46:311–316
64. Persson M, Andren Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 2009;106:18740–18744

65. Mitani Y, Li J, Rao PH, et al. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability and clinicopathological significance. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4722–4731.
66. West RB, Kong C, Clarke N, et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:92–99
67. Wang L, Sun M, Jiang Y, et al. Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:636–641
68. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, et al. Expression of cerbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1995; 15:2623–2626
69. Vered M, Braunstein E, Buchner A. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck* 2002; 24:632–636
70. Glisson B, Colevas AD, Haddad R, et al. HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin Cancer Res* 2004;10:944–946
71. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, et al. Expression of cerbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1995; 15:2623–2626
72. Dori S, Vered M, David R, Buchner A. HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2002; 31:463–467

73. Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF- α protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 1998; 69:55–62
74. Monteiro LS, Bento MJ, Palmeira C, Lopes C. Epidermal growth factor receptor immunoexpression evaluation in malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:508–513
75. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:45–51
76. Daa T, Kaku N, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of beta-catenin, E-cadherin and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24:83–87
77. Queimado L, Lopes CS, Reis AM. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46:215–225
78. Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999; 431:199–209
79. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54:1169–1174
80. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis—the p53 network. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 20):4077–4085
81. Papadaki H, Finkelstein SD, Kounelis S, Bakker A, Swalsky PA, Kapadia SB. The role of p53 mutation and protein expression in primary and recurrent adenoid cystic carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27:567–572

82. Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, et al. Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 2001; 37:315–322
83. Yamamoto Y, Wistuba II, Kishimoto Y, et al. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int* 1998; 48:273–280
84. Franchi A, Gallo O, Bocciolini C, Franchi L, Paglierani M, Santucci M. Reduced E-cadherin expression correlates with unfavorable prognosis in adenoid cystic carcinoma of salivary glands of the oral cavity. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:43–50
85. Li J, El-Naggar A, Mao L. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2005; 104:771–776
86. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989; 108:2435–2447
87. Zhang CY, Mao L, Li L, et al. Promoter methylation as a common mechanism for inactivating E-cadherin in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2007; 110:87–95
88. Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995; 375:503–506
89. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58:1193–1198
90. Mihara K, Cao XR, Yen A, et al. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 246:1300–1303

91. Johns MM III, Westra WH, Califano JA, Eisele D, Koch WM, Sidransky D. Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res* 1996; 56:1151–1154
92. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995; 11:210–212
93. Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:3630–3633
94. Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, et al. Infrequent alternations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclinD1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer Res* 2000; 20:2169–2175
95. Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, et al. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2003; 10:555–560
96. Dincer N, Tezel GG, Sungur A, Himmetoglu C, Huebner K, Guler G. Study of FHIT and WWOX expression in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Oral Oncol* 2010; 46:195–199
97. Koukoulis GK, Patriarca C, Gould VE. Adhesion molecules and tumor metastasis. *Hum Pathol* 1998; 29:889–892
98. Franchi A, Gallo O, Bocciolini C, Franchi L, Paglierani M, Santucci M. Reduced E-cadherin expression correlates with unfavorable prognosis in adenoid cystic carcinoma of salivary glands of the oral cavity. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:43–50
99. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 6):2241–2251

100. Westernoff TH, Jordan RC, Regezi JA, Ramos DM, Schmidt BL. Beta-6 Integrin, tenascin-C, and MMP-1 expression in salivary gland neoplasms. *Oral Oncol* 2005; 41:170–174
101. Perschbacher K, Jackson–Boeters L, Daley T. The adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary gland tissues and salivary gland malignancies. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:230–236
102. Franca CM, Jaeger MM, Jaeger RG, Araujo NS. The role of basement membrane proteins on the expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in an adenoid cystic carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2000; 36:248–252
103. Hutcheson JA, Vural E, Korourian S, Hanna E. Neural cell adhesion molecule expression in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2000; 110:946–948
104. Gandour–Edwards R, Kapadia SB, Barnes L, Donald PJ, Janecka IP. Neural cell adhesion molecule in adenoid cystic carcinoma invading the skull base. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117:453–458
105. Mithani SK, Shao C, Tan M, et al. Mitochondrial mutations in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *PLoS One* 2009; 4:e8493
106. Ben–Izhak O, Laster Z, Araidy S, Nagler RM. TUNEL – an efficient prognosis predictor of salivary malignancies. *Br J Cancer* 2007; 96:1101–1106
107. Ettl T, Schwarz S, Kleinsasser N, Hartmann A, Reichert TE, Driemel O. Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas. *Histopathology* 2008;53:567–577
108. Ramer N, Wu H, Sabo E, et al. Prognostic value of quantitative p63 immunostaining in adenoid cystic carcinoma of salivary gland assessed by computerized image analysis. *Cancer* 2010;

116:77–83

109. Saghravanian N, Mohtasham N, Jafarzadeh H. Comparison of immunohistochemical markers between adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *J Oral Sci* 2009; 51:509–514

110. Beltran D, Faquin WC, Gallagher G, August M. Selective immunohistochemical comparison of polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:415–423

111. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1):12-9

112. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1072-9

113. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(2):467-75

114. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23):1772-83

115. Klusmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003; 162(3):747-53

116. derReimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(8):1731-

117. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24(17):2606-11
118. Brunner M, Koperek O, Wrba F et al. HPV infection and p16 expression in carcinomas of the minor salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011 Dec 30
119. Vageli D, Sourvinos G, Ioannou M, Koukoulis GK, Spandidos DA. High-risk human papillomavirus (HPV) in parotid lesions. *Int J Biol Markers.* 2007 Oct-Dec; 22(4):239-44
120. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2):504-12
121. Ellington CL, Goodman M, Kono SA et al., Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 Surveillance, Epidemiology, and End Results data, *Cancer.* 2012 Jan 31. doi: 10.1002/cncr.27408
122. Ross PJ, Teoh EM, A'hern RP, et al. Epirubicin, cisplatin and protracted venous infusion 5-fluorouracil chemotherapy for advanced salivary adenoid cystic carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2009; 21:311-314
123. Allen CT, Lewis JS, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B (2010) Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope* 120:1756– 1772
124. Hoffmann M, Ihloff AS, Go'ro'gh T et al (2010) p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 127:1595–1602
125. Ang KK, Harris J, Wheeler R et al (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24–35

126. Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., and Muñoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, 189: 12–19, 1999
127. Miller, C. S., and Johnstone, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 91: 622–635, 2001
128. McKaig, R. G., Baric, R. S., and Olshan, A. F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*, 20: 250–265, 1998
129. Ringström E., Peters E., Hasegawa M et al., Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, *Clinical Cancer Research* 3187 Vol. 8, 3187–3192, October 2002
130. Cruz, I. B. F., Snijders, P. J. F., Steenberg, R. D. M., Meijer, C. J. L. M., Snow, G. B., Walbloomers, J. M. M., and van der Waal, I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, 32B: 55–62, 1996
131. Miller, C. S., Zeuss, M. S., and White, D. K. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 77: 480–486, 1994
132. Schwartz, S. R., Yueh, B., McDougall et al., Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell carcinoma: a population-based study. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 125: 1–9, 2001
133. <http://jcm.asm.org/content/44/2/504/F1.expansion.html>

134. International Union Against Cancer (UICC) (1997) TNM classification of malignant tumours (5th edn). Wiley-Liss, New York
135. Koss LG, Durfee GR: Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1959; 63:1245-1247.

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientenalter bei Erstdiagnose	21
Tab. 2: Altersgruppenverteilung	22
Tab. 3: Tumorlokalisation	23
Tab. 4: T-Stadium	26
Tab. 5: N-Stadium	26
Tab. 6: M-Stadium	26
Tab. 7: T-Stadium in Relation zur Tumorlokalisation	27
Tab. 8: N-Stadium in Relation zur Tumorlokalisation	27
Tab. 9: M-Stadium in Relation Tumorlokalisation	28
Tab. 10: HPV-Typen-Prävalenz	29
Tab. 11: HR-HPV-Positivität bezogen auf die Tumorlokalisation	30
Tab. 12: HR-HPV-Nachweis in unterschiedlichen Altersgruppen	32
Tab. 13: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das T-Stadium	33
Tab. 14: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das N-Stadium	33
Tab. 15: HR-HPV-Verteilung bezogen auf das M-Stadium	34
Tab. 16: p16-Expression in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	35
Tab. 17: p16-Expressionstufen in Abhängigkeit vom HPV-Genotyp	36
Tab. 18: p53-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	37
Tab. 19: Ki-67-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	37
Tab. 20: EGFR-Status in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	38
Tab. 21: p16-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation	38
Tab. 22: p16-Expression in Abhängigkeit vom Erstdiagnose-Alter	39
Tab. 23: p16-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium	40
Tab. 24: p16-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium	41
Tab. 25: p16-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium	41
Tab. 26: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Erstdiagnose	43
Tab. 27: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium bei Erstdiagnose	44
Tab. 28: EGFR-Status in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression	45

Tab.29: HPV- und p16-Status-Vergleich zwischen Primärtumoren und histologisch untersuchten Rezidiven	67
Tab. 30: HPV- und p16-Status-Vergleich zwischen Primärtumoren und histologisch untersuchten Lymphknoten- und Fernmetastasen	69

8. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Rekrutiertes Patientenkollektiv. Zeitpunkt der Erstdiagnose und Anzahl der initial verfügbaren Tumorproben pro Jahr	13
Abb. 2 Schematische Übersicht der HPV-Genotypisierung von GP5+/6+ PCR-Produkten mittels bead based multiplex HPV genotyping (Abbildung stammt aus einem Tutorial der Firma Luminex Corp.)	17
Abb. 3: Geschlechterverteilung Patientenkollektiv	20
Abb. 4: Altersverteilung und Medianwerte	21
Abb. 5: Geschlechterverteilung in den unterschiedlichen Altersgruppen	23
Abb. 6: Geschlechterverteilung in Relation zu den Tumorlokalisationen	24
Abb. 7: Tumorlokalisationen in Relation zur Altersgruppenverteilung	25
Abb. 8: HPV-Genotypenverteilung	29
Abb. 9: Geschlechterverteilung der HR-HPV-positiven Tumore	30
Abb. 10: HR-HPV-Positivität bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen	31
Abb. 11: HR-HPV-Nachweis in unterschiedlichen Altersgruppen	32
Abb. 12: p16-Expression in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	35
Abb. 13: p16-Immunfärbung	36
Abb. 14: p16-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation	39
Abb. 15: p16-Expression in Abhängigkeit vom Erstdiagnose-Alter	40
Abb. 16: p53-Expression in Abhängigkeit von der p16-Expression	42
Abb. 17: Ki-67-Status in Abhängigkeit von der p16-Expression	42
Abb. 18: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Erstdiagnose	43
Abb. 19: Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom M-Stadium bei Erstdiagnose	44
Abb. 20: EGFR-Status in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression	45
Abb. 21: Rezidivfreies Überleben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen	46
Abb. 22: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom T-Stadium	47
Abb. 23: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom N-Stadium	47
Abb. 24: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose	48
Abb. 25: Rezidivfreies Überleben abhängig vom Geschlecht der Patienten	49

Abb. 26: Rezidivfreie 3-Jahresüberlebensrate weiblich/männlich	49
Abb. 27: Rezidivfreie 5-Jahresüberlebensrate weiblich/männlich	50
Abb. 28: Rezidivfreie 10-Jahresüberlebensrate weiblich/männlich	50
Abb. 29: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	51
Abb. 30: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p16-Expression	52
Abb. 31: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von Ki-67-Expressionsstatus	53
Abb. 32: 3-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression	53
Abb. 33: 5-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression	54
Abb. 34: 10-Jahre rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression	54
Abb. 35: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Expression	55
Abb. 36: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR-Status	56
Abb. 37: Gesamtüberleben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen	57
Abb. 38: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom T-Stadium	58
Abb. 39: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom N-Stadium	58
Abb. 40: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom M-Stadium	59
Abb. 41: Geschlechtsspezifisches Gesamtüberleben	60
Abb. 42: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Patientenalter bei Erstdiagnose	61
Abb. 43: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom HR-HPV-Status	62
Abb. 44: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p16-Status	63
Abb. 45: 3-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status	63
Abb. 46: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status	64
Abb. 47: 10-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom p16-Status	64
Abb. 48: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ki-67-Expressionsstatus	65
Abb. 49: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p53-Expressionsstatus	66
Abb. 50: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom EGFR-Status	66

9. Erklärung

Ich, Georgios Tzamalīs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung von HPV bei adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationsliste

Simultaneous squamous cell carcinoma and follicular lymphoma of the tonsil

Albers AE, Hummel M, Keilholz U, Tzamalis G

HNO. 2010 Dec; 58(12):1192-6

Simultane Manifestation und Plattenepithelkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom der

Tonsille, klinische und histopathologische Aspekte

Tzamalis G, Haisch A, Albers A

Dt. HNO-Kongress, 2008, Meeting of European Academy for Head and Neck Oncology, Zagreb 2008

The treatment of recurrent epistaxis in Osler-Disease with diode laser coagulation

Tzamalis G, Bethge F, Jovanovic S

European Rhinologic Society, Heraklion 2008

Modern Laser Technology in the Rhinosurgery

Tzamalis G, Jovanovic S

European Rhinologic Society, Heraklion 2008

Die Anwendung des CO₂-Lasers in der Chirurgie der Hammerkopffixation

Jovanovic S, Schönfeld U, Tzamalis G

Dt. HNO-Kongress, 2009

Aberranter Verlauf der A. carotis interna, rezidivierende Blutungsereignisse

nach Routineparazentese

Tzamalis G, Albers AE

Dt. HNO-Kongress 2009

Die magnetische Epithesenversorgung symptomatischer Septumperforationen

Tzamalís G, John P.

Dt. HNO-Kongress 2009

Erste Erfahrungen mit der Behandlung der chronischer Sialodochitis und Sialadenitis
mittels sialendoskopisch kontrollierter intraduktaler Kortikoid-Instillation

Tzamalís G, Lück S, Albers AE

Dt HNO-Kongress 2010

Leiomyoma : A rare neoplasia of the parotid gland.

Lehmann S, Tzamalís G, Reichelt U, Jovanovic S.

HNO. 2012 Apr 26

12. Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn PD Dr. Andreas Kaufmann für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung herzlich danken. Sein stetiges Engagement und seine konstruktive Kritik haben die zügige Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Kollegen und Betreuer, Herrn Dr. Andreas Albers. Seine stets unkomplizierte Resonanz, nimmermüde Hilfsbereitschaft bei diversen Fragestellungen und die freundliche Mitwirkung bei der Erhebung der klinischen Daten waren für die Entstehung dieser Arbeit von essentieller Bedeutung. Ohne seinen wesentlichen Beitrag hätte diese Arbeit nie zu der hier vorliegenden Form gefunden.

Für die Zurverfügungstellung der histologischen Präparate und für die Hilfe bei der immunhistologischen Begutachtung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Hummel sowie bei Frau Erika Berg vom Institut für Pathologie herzlich bedanken.

Ferner danke ich Herrn Steffen Sander für die Ermittlung der Sterbedaten aus dem Deutschen Krebsregister und dem Sterberegister des Charite Comprehensive Cancer Center.

Des Weiteren möchte ich Herrn Chao Chen für die Hilfe bei der DNA-Extraktion zum HPV-Nachweis danken.

Bester Dank gilt außerdem an Frau Heidrun Wolter für die technische Hilfe bei den immunhistochemischen Färbungen.

Zuletzt möchte ich meinem Bruder, Dr. Argyrios Tzamalīs, für die Aufmunterung zum Abschluß dieser Arbeit danken.