

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
Direktor: Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE PROGNOSEFAKTOREN BEI SPEICHELDRÜSENKARZINOMEN
-DIE BEDEUTUNG VON WACHSTUMSFAKTORREZEPTOREN UND VON HISTOLOGISCHEN
SUBTYPEN-

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Clemens Stiegler

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
Direktor: Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE PROGNOSEFAKTOREN BEI SPEICHELDRÜSENKARZINOMEN
-DIE BEDEUTUNG VON WACHSTUMSFAKTORREZEPTOREN UND VON HISTOLOGISCHEN
SUBTYPEN-

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Clemens Stiegler

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gero Brockhoff

2. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Gaumann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2012

Gewidmet meinen lieben Eltern mit

Besonderem Dank an meinen Vater Element Stiegler.

Inhalt

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Speicheldrüsen	1
1.1.1 Allgemeiner Aufbau	1
1.1.2 Glandula parotidea	2
1.1.3 Glandula submandibularis	3
1.1.4 Glandula sublingualis	3
1.1.5 Kleine Speicheldrüsen	4
1.2 Das Speicheldrüsenkarzinom	4
1.2.1 Epidemiologie	4
1.2.2 Ätiologie	5
1.2.3 Klassifikation der Speicheldrüsenkarzinome	7
1.2.4 Das Mukoepidermoidkarzinom	11
1.2.5 Klinik, Diagnostik und Therapie	12
1.3 Tumorgenetik	13
1.3.1 Kanzerogenese	13

1.3.2 EGFR und Her2	15
1.3.3 Translokation t(11;19)(q21;p13)	16
1.4 Ziele dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	
<hr/>	
2.1 Datenerhebung	21
2.2 Histologie und Klassifizierung	21
2.3 Tissue Microarrays (TMAs)	22
2.3.1 Tissue Microarrays in dieser Arbeit	22
2.3.2 Prinzip der TMA-Herstellung	22
2.4 Verwendete Materialien und Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie	24
2.4.1 Materialien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	24
2.4.2 Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	24
2.4.3 Verwendete FISH-Sondenkits	25
2.4.4 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von EGFR	26
2.4.5 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von Her2	26
2.4.6 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CK5	26
2.4.7 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CK7	27

2.4.8 Geräte für die (immun-)histologische Auswertung und Dokumentation	27
2.4.9 Geräte für die FISH-Auszählung	27
2.4.10 Kamera zur Ergebnisdokumentation	28
2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	28
2.5.1 Prinzip der FISH	28
2.5.2 Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	30
2.5.3 Ergebnisevaluation der Hybridisierung	31
2.5.4 Auswertungskriterien der MEC-Sonde	32
2.5.5 Auswertungskriterien der EGFR- und Her2-Sonden	32
2.6 Immunhistochemie	33
2.6.1 Prinzip der Immunhistochemie	33
2.6.2 Protokoll für die Immunhistochemie von EGFR	35
2.6.3 Protokoll für die Immunhistochemie von Her2	36
2.6.4 Protokoll für die immunhistochemischen Färbungen von CK5 und CK7	38
2.6.5 Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien der Immunhistochemie	39
2.7 Statistische Auswertung	40

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Tumormaterials	41
3.1.1 Klinische Daten zu den Tumoren der untersuchten Speicheldrüsenkarzinomsammlung	41
3.1.2 Klinische Daten zu den untersuchten Mukoepidermoidkarzinomen	43
3.2 Allgemeine Prognosefaktoren der Speicheldrüsenkarzinome bei univariater Betrachtung	44
3.3 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich EGFR und Her2	49
3.3.1 Beschreibung des mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie erhobenen EGFR- und Her2-Status der Speicheldrüsenkarzinome	49
a) EGFR	49
b) Her2	54
3.3.2 Assoziation zwischen den EGFR- und Her2-Befunden mit klinisch-pathologischen Parametern	60
a) EGFR	60
b) Her2	61
3.3.3 Die prognostische Bedeutung der EGFR- und Her2-Befunde	63
a) EGFR	63
b) Her2	64
c) EGFR und Her2	65
3.3.4 Multivariate Analyse klinisch-pathologischer Faktoren in Bezug auf das Überleben	68
3.4 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome	70

3.4.1 Histologische Merkmale der untersuchten MECs	70
a) Klassisches Mukoepidermoidkarzinom	70
b) Variante Mukoepidermoidkarzinome	75
3.4.2 Auftreten der Translokation t(11;19) bei den Mukoepidermoidkarzinomen	83
3.4.3 Assoziationen zwischen den histologischen Subtypen und der Translokation t(11;19) mit klinisch-pathologischen Parametern	85
3.4.4 Die prognostische Bedeutung von klinisch-pathologischen Parametern bei MECs	87

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich allgemeiner klinisch-pathologischer Faktoren und der Wachstumsfaktorrezeptoren	91
4.1.1 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich allgemeiner klinisch-pathologischer Faktoren	91
4.1.2 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich des EGFR-Status	94
4.1.3 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich des Her2-Status in Abhängigkeit von den EGFR-Befunden	100
4.2 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome	104
4.2.1 Untersuchung der histologischen Subtypen	104
4.2.2 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome bzgl. weiterer klinisch-pathologischer Faktoren	107

5 Zusammenfassung und Ausblick

6 Appendix

6.1 Referenzen	112
6.2 Abkürzungsverzeichnis	120
6.3 Danksagung	122

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Speicheldrüsen

1.1.1 Allgemeiner histologischer Aufbau

Speicheldrüsen gehören zu den Anhangsdrüsen des Verdauungskanals und sind als solche exokrine Organe, die für die Produktion und Sekretion von Speichel zuständig sind. Sie lassen sich unterteilen in die großen, paarig angelegten *Glandulae parotideae*, *Glandulae sublinguales* und *Glandulae submandibulares*, sowie in die zahlreichen kleinen Drüsen, welche weitläufig im Mund und im Oropharynx verteilt sind.²⁸

Im Gegensatz zu den kleinen Drüsen besitzen die großen Speicheldrüsen eine derbe Organkapsel (*Tunica fibrosa*), von der aus Bindegewebssepten in das Organinnere ziehen, den Drüsenapparat in *Lobi* und *Lobuli* unterteilen und schließlich in das *Stroma glandulae* übergehen, von welchem die Drüsen- und Gangepithelien durch eine sie verankernde Basalmembran abgegrenzt sind. Das Bindegewebe ist reich an Nerven sowie an Blut- und Lymphgefäßen.

Allen Speicheldrüsen gemeinsam ist ihr Aufbau aus sekretorischen *Acini*, die über zum Ausführungsgangsystem gehörende Schalt- und Streifenstücke ihr Sekret ableiten, welches durch *Ductus interlobulares* und *Ductus interlobares* gesammelt und über die *Ductus excretorii* entleert wird.⁴¹ Zwischen der basalen Zytoplasmamembran der sekretorischen Zellen der Endstücke sowie der Zellen der Schaltstücke und der Basalmembran finden sich myoepitheliale Zellen mit langen, dendritischen Ausläufern. Sie enthalten Aktin glatter Muskulatur, Myosin und Intermediärfilamente wie Zytokeratin 14 und sind zur Kontraktion befähigt.

Acini können serös, mukös oder gemischt sein. Die serösen, prismatischen Zellen zeichnen sich durch ihren runden Kern und apikalen, basophilen Zymogengranula aus, welche PAS-positiv reagieren und eine hohe Amylase-Aktivität aufweisen. Die muzinösen Zellen hingegen besitzen basal gelegene, abgeflachte Kerne und klares Zytoplasma mit Sialomuzinvakuolen.

Das Epithel der in der Regel kurzen *Schaltstücke* ist einschichtig und kuboidal mit relativ großen, zentral gelegenen Kernen, wohingegen die *Streifenstücke* einschichtiges, hochprismatisches, eosinophiles Epithel aufweisen, welches zahlreiche Einfaltungen der basalen Plasmamembran besitzt. Diese sowie der Reichtum an Mitochondrien sind verantwortlich für die basale Streifung, die den *Streifenstücken* schließlich ihren Namen gibt. Der Mitochondrienreichtum ergibt sich aus dem hohen Energiebedarf dieser Zellen, welcher aus der Modifizierung des Primärspeichels resultiert.²⁸

1.1.2 Glandula parotidea

Die *Glandula parotidea* stellt die größte Mundspeicheldrüse dar. Sie ist auf dem *M. masseter* gelegen und dehnt sich vom *Arcus zygomaticus* bis zum Unterkieferrand aus, den sie überschreitet. Nach medial begrenzt sie mit ihrer faszienlosen *Pars profunda* das *Spatium lateropharyngium*. Der überwiegende Teil der Drüse wird von der derben *Fascia parotidea* umhüllt, welche die Fortsetzung der *Lamina superficialis fasciae cervicalis* bzw. auf der medialen Seite die Fortsetzung der *Fascia masseterica* darstellt. Der Ausführungsgang der Drüse, der *Ductus parotideus*, überquert den *M. masseter* und durchbohrt den *M. buccinator*, um gegenüber dem 2. oberen Molaren an der *Papilla parotidea* in die Mundhöhle zu münden.

Im Drüsenkörper verzweigt sich der *N. facialis* und bildet den *Plexus intraparotideus*, welcher bei operativen Eingriffen an der Ohrspeicheldrüse gefährdet ist. Die arterielle Versorgung erfolgt aus Ästen der *A. temporalis superficialis* und der venöse Abfluss über die die Drüse durchziehende *V. retromandibularis*, wohingegen die Lymphe über die tiefen, in der Drüse gelegenen sowie die oberflächlichen parotischen Lymphknoten in die *Nodi lymphatici cervicales superficiales* abdrainiert wird. Sympathische und parasymphatische Fasern erreichen die Parotis über den *N. auriculotemporalis*, dem sie sich in seinem Verlauf anschließen.²

Die *Glandula parotidea* ist eine verzweigte, azinöse, rein seröse Drüse, wobei die sekretorischen Drüsenzellen etwa 90% des Drüsenvolumens ausmachen.⁴¹ Intra- und extralobulär finden sich gehäuft Fettzellen, deren Zahl mit dem Alter zunimmt. Zudem kommen im Bindegewebe Lymphozytenaggregate und Lymphknoten vor. Diese können

Ausführungsgänge der Drüse oder auch Azini enthalten (sogenannte *Neisse-Nicholson-Reste*). Auch Talgdrüsen werden vereinzelt oder in Gruppen gelegen beobachtet.²⁸

1.1.3 Glandula submandibularis

Die *Glandula submandibularis* umgreift hakenförmig den durch den *M. mylohyoideus* gebildeten Mundboden und wird nach lateral durch die Innenseite der *Mandibula* und nach medial durch den *M. hyoglossus* begrenzt. Sie wird von der *Lamina superficialis fasciae cervicalis* bedeckt. Ihr Ausführungsgang vereinigt sich mit dem *Ductus sublingualis major* der *Glandula sublingualis* auf dem *Diaphragma oris* und mündet mit diesem gemeinsam auf der *Caruncula sublingualis* neben dem Zungenfrenulum in die Mundhöhle.

Die arterielle Versorgung sowohl der *Glandula submandibularis* als auch der *Glandula sublingualis* erfolgt aus der *A. facialis* und der *A. submentalis*. Beide Gefäße durchziehen die *Glandula submandibularis*. Über die *Vv. submentalis et sublingualis* fließt das venöse Blut in die *V. facialis* oder direkt in die *V. jugularis interna* ab. Die für beide Drüsen zuständigen Lymphknoten sind die *Nodi lymphatici submentales et submandibulares*. Parasympathische Bahnen ziehen nach ihrem Verlauf mit dem *N. lingualis* und ihrer Umschaltung im *Ganglion submandibulare* von diesem aus zu den Drüsen, während sympathische Fasern von die *Aa. facialis et lingualis* umgebenden Plexus stammen.²

Die *Glandula submandibularis* ist eine mukoseröse, verzweigt tubuloazinöse Drüse, wobei die serösen Anteile mit etwa 80% überwiegen. In den gemischten Endstücken sitzen den muzinösen Tubuli seröse, halbmondförmige Kappen auf (sogenannte *von-Ebner-Halbmonde*).⁴¹ Die Schaltstücke sind kürzer und die Streifenstücke auffälliger als bei der *Glandula parotidea*.^{28,28}

1.1.4 Glandula sublingualis

Die *Glandula sublingualis* liegt auf dem *M. mylohyoideus* lateral vom *M. genioglossus* und entleert ihr Sekret über ihren Hauptausführungsgang, den *Ductus sublingualis major*, welcher sich mit dem *Ductus submandibularis* vereinigt (s.o.), sowie über die zahlreichen *Ductus sublinguales minores*, welche an kleinen Öffnungen in der Mundbodenschleimhaut münden.

Die arterielle, venöse, lymphatische und nervale Versorgung entspricht derjenigen der *Glandula submandibularis* (s.o.).²

Die *Glandula sublingualis* ist eine verzweigte tubulo-azinöse, seromuköse Drüse. Hierbei überwiegen die mukösen Drüsenzellen mit etwa 60% des Drüsenvolumens, während die serösen Zellen fast ausschließlich als *von-Ebner-Halbmonde* den tubulösen Endstücken aufsitzen. Schalt- und Streifenstücke fehlen fast vollständig.⁴¹

1.1.5 Kleine Speicheldrüsen

Kleine Speicheldrüsen sind zahlreich und weit verbreitet in Mund und Oropharynx. Am häufigsten finden sie sich am Übergang des harten in den weichen Gaumen, an den Lippen und der Wangenschleimhaut. Sie können seromukös (Lippe, Wangenschleimhaut, Zungenrand), überwiegend mukös (ventrale Zungenseite, Gaumen, Rachen) oder aber rein serös sein (v. *Ebner-Spüldrüsen* an den *Papillae circumvallatae*). Im Gegensatz zu den großen Speicheldrüsen besitzen sie keine Kapsel, die sie vom umgebenden Gewebe abgrenzt. So können sie beispielsweise tief in der Muskulatur der Zunge oder der Lippen lokalisiert sein.²⁸

1.2 Das Speicheldrüsenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Speicheldrüsentumoren sind selten und entsprechend schlecht ist die Datenlage bezüglich ihrer Epidemiologie.⁷³ Dies ergibt sich unter anderem auch daraus, dass in einigen Studien nur Tumoren von einer Speicheldrüse wie der *Glandula parotidea* oder den großen Speicheldrüsen untersucht werden entgegen der Tatsache, dass sich das Speicheldrüsenengewebe nicht auf ein einzelnes Organ beschränkt. Zum Anderen variiert die Häufigkeit der verschiedenen Tumorentitäten geographisch.²⁸

Die weltweite Inzidenz aller Speicheldrüsentumoren liegt zwischen 0,4 – 13,5 pro 100000 Einwohner.²⁵ Bösartige Tumoren der Speicheldrüsen stellen weniger als 0,5% aller malignen

Neoplasien des Menschen dar.⁸⁵ Ihre Inzidenz wird mit 0,4 – 2,6 pro 100000 Einwohner angegeben.^{43,71,73,87} Sie machen etwa 20% aller Speicheldrüsentumoren aus, so dass der überwiegende Teil gutartig ist.⁸⁵ Der Anteil von gut- und bösartigen Speicheldrüsentumoren an den Tumoren im Kopf-Halsbereich liegt zwischen 2 und 6,5%. Tumoren der *Glandula parotidea* (zwischen 64% und 80%) und der kleinen Speicheldrüsen (zwischen 9% und 23%) überwiegen. Diejenigen der *Glandula submandibularis* machen 8-12%, die der *Glandula sublingualis* weniger als 1% aus.^{28,26} Umgekehrt verhält es sich mit den Anteilen der bösartigen Neoplasien an der Gesamtzahl der Tumoren: hierbei sind 15-32% der Tumoren der *Glandula parotis*, 41-45% der Tumoren der *Glandula submandibularis* und 70-90% der Tumoren der *Glandula sublingualis* maligne. Bei den kleinen Speicheldrüsen sind es 50%, wobei allerdings nahezu 100% der Speicheldrüsentumoren in der Zunge und in der retromolaren Schleimhaut bösartig sind.^{28,85}

In den Vereinigten Staaten sind Männer bezüglich des Speicheldrüsenkrebses um den Faktor 1,42 häufiger betroffen als Frauen. Für beide Geschlechter steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter. Bei Männern liegt das Durchschnittsalter bei 61 Jahren und bei Frauen bei 58 Jahren.⁸⁷ Allerdings ergeben sich Unterschiede je nach Tumortyp. So liegt die höchste Inzidenz des Mukoepidermoidkarzinoms und des Azinuszellkarzinoms in der dritten und vierten Lebensdekade.²⁸

Bei Kindern, bei welchen Speicheldrüsentumoren eine noch größere Rarität darstellen als bei Erwachsenen, ist die Häufigkeit gut- und bösartiger Neoplasien in etwa gleich. Wie bei Erwachsenen stellt das Mukoepidermoidkarzinom auch bei Kindern den häufigsten bösartigen Tumor dar.^{42,69,28}

1.2.2 Ätiologie

Aus Langzeit-Studien von Überlebenden der Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki ist bekannt, dass ionisierende Strahlung einen starken Risikofaktor für die Entwicklung von Speicheldrüsentumoren darstellt. Das relative Risiko für bösartige Tumoren stieg hierbei auf bis zu 11,0 an. Dabei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Strahlendosis einerseits und der Inzidenz andererseits nachgewiesen werden, die in Richtung Hypozentrum anstieg. Insbesondere das Mukoepidermoidkarzinom nahm in seiner

absoluten und relativen Häufigkeit überproportional stark mit zunehmender Bestrahlungsdosis zu.^{91,92} Bei den gutartigen Tumoren stieg vor allem die Zahl der Warthin's Tumoren.⁸⁰ Entsprechend erhöhen auch therapeutische oder diagnostische Bestrahlungen im Kopf-Halsbereich wie Röntgenuntersuchungen oder Behandlung der Schilddrüse mit I¹³¹ das Risiko, an Speicheldrüsenkrebs zu erkranken.^{22,59,78} I¹³¹ wird zudem in den Speicheldrüsen angereichert.³⁸

Da starker Alkoholkonsum, aber auch regelmäßiges Rauchen das Risiko für Zungen- und Mundbodenkrebs steigern, stellt sich die Frage, ob auch Speicheldrüsenkrebs hierbei gehäuft auftritt. In einer Studie wurde tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Tabak- und schwerem Alkoholkonsum und dem Auftreten von Speicheldrüsenkrebs gefunden, allerdings nur bei Männer.³⁹ Diese Assoziation konnte aber nicht bestätigt werden.⁶⁴

Diätetische Faktoren scheinen eine gewisse Rolle zu spielen. Während eine hohe tägliche Cholesterinzufuhr das Risiko steigern soll, wirkt regelmäßige Zufuhr von täglich mehr als 200mg Vitamin C protektiv.⁴⁰

Zwar wurde eine starke Assoziation zwischen dem Epstein Barr Virus (EBV) und dem lymphoepithelialen Karzinom gefunden, jedoch nicht mit anderen Karzinomen der Speicheldrüsen.⁹⁶ Auch konnte kein Zusammenhang zwischen AIDS oder anderen Virus-assoziierten malignen Erkrankungen und Speicheldrüsenkarzinomen gefunden werden.^{28,87}

Wenn auch der Kontakt zu bestimmten chemischen Substanzen in einigen Berufsgruppen nachweislich zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Speicheldrüsenkarzinomen führt, scheint die Art der beruflichen Betätigung als Risikofaktor insgesamt jedoch nur von untergeordneter Bedeutung zu sein und sollte deswegen nicht überschätzt werden.⁶⁴ Betroffen sind am ehesten Beschäftigte, die Nickel, Chrom, Asbest oder Zementstäuben ausgesetzt sind.²² Zudem scheint die Beschäftigung in der Gummi verarbeitenden Industrie risikobehaftet, aber auch Angestellte in Kosmetikstudios oder in Friseursalons sind gefährdet.^{39,88,89}

Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob Sexualsteroidhormone bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Hinsichtlich der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Speicheldrüsentumoren gibt es keine übereinstimmenden Ergebnisse. Allerdings konnte für Androgenrezeptoren gezeigt werden, dass diese vermehrt in duktalem Adenokarzinomen

und anderen hochmalignen Karzinomtypen exprimiert werden, nicht jedoch bei gutartigen Tumoren, so dass Androgene womöglich an der Entwicklung bestimmter Karzinomformen beteiligt sein könnten.^{28,66}

1.2.3 Klassifikation der Speicheldrüsenkarzinome

Speicheldrüsentumoren stellen in histopathologischer Hinsicht eine Herausforderung dar, da zum Einen die Zahl verschiedener Tumorentitäten sehr hoch ist und in den letzten WHO Richtlinien zur Klassifizierung der Tumoren weiterhin zugenommen hat, zum Anderen die Inzidenzen der verschiedenen Entitäten sehr gering sind. Hinzu kommt die Tatsache, dass einige Tumore in ihrem histologischen Muster überlappen, weswegen die differentialdiagnostische Abgrenzung nicht selten eine Schwierigkeit darstellt. Aber auch klinisch sind maligne Speicheldrüsentumore komplex, da bei manchen Entitäten die Prognose stark variieren kann.⁴⁵

Speicheldrüsenkarzinome werden – wie andere Karzinome auch – nach verschiedenen Kriterien klassifiziert. Zu diesen gehören das *Typing*, die Zuordnung des Tumors also zu einer bestimmten Entität, das *Grading*, das zur Beschreibung des Differenzierungsgrades des Tumors dient sowie das *Staging*, um die Größe und die Ausbreitung des Tumors zu beschreiben.^{45,51}

Tumortypisierung (Typing)

In der WHO Klassifizierung von Kopf- und Halstumoren von 2005 werden 24 maligne Tumorentitäten der Speicheldrüsen unterschieden. Es handelt sich hierbei um eine Auflistung und Beschreibung der verschiedenen Entitäten, deren Unterscheidung in erster Linie morphologisch begründet ist. Dabei mag die klare Zuordnung eines histologischen Musters zu einer bestimmten Entität teilweise schwierig sein.⁸⁵

Unter den malignen Speicheldrüsentumoren stellt das Mukoepidermoidkarzinom den häufigsten Typ mit einem Anteil von 30 % dar.^{52,85} In der Klassifizierung des Armed Forces Institute of Pathology folgt diesem das Adenokarzinom NOS (*not otherwise specified*) mit einem Auftreten in 17 % der Fälle unter den Karzinomen an zweiter Stelle, während das

Azinuszellkarzinom auf Platz Drei steht.²⁴ Das Adenoid-zystische Karzinom hingegen macht etwa 10 % aller bösartigen epithelialen Neoplasien der Speicheldrüsen aus.²³ Im Speicheldrüsenregister Hamburg liegt es mit einem Anteil von knapp 15 % allerdings an zweiter Stelle unter den malignen Tumoren und somit vor dem Azinuszellkarzinom. Karzinome ex pleomorphem Adenom folgen sodann mit etwa 4 %.⁵¹

Grading

Unter *Grading*, Tumorgraduierung, versteht man die morphologische und funktionelle Entdifferenzierung von Karzinomen verglichen mit Normalgewebe. Je stärker ein Tumor von seinem ursprünglichen, gewebescharakteristischen Differenzierungsgrad abweicht, desto maligner ist er in der Regel. So meint der Terminus "*high grade*" (G3) hohe Entdifferenzierung des Tumors, "*low grade*" (G1) entsprechend nur geringe, was also im Allgemeinen die niedrig malignen Tumoren betrifft, während "*intermediate grade*" (G2) jenen Übergangsbereich zwischen den beiden Extremen betrifft.

Tabelle 1.2.1 zeigt die Zuordnung von Karzinomtypen zu den jeweiligen *Grading*-Kategorien. Manche Karzinome lassen sich mehreren Kategorien zuordnen und sind deshalb mehrfach aufgeführt.

G1	G2	G3
Mukoepidermoidkarzinom	Mukoepidermoidkarzinom	Mukoepidermoidkarzinom
Azinuszellkarzinom	Myoepitheliales Karzinom	Myoepitheliales Karzinom
Epithelial-myoepitheliales Karzinom	Adenoid-zystisches Karzinom	Karzinom ex pleomorphem Adenom
Polymorphes low-grade Adenokarzinom	Sebaziöses Adenokarzinom	Duktales Adenokarzinom
Adenokarzinom NOS	Adenokarzinom NOS	Adenokarzinom NOS
Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom
Klarzelliges Karzinom		Kleinzelliges Karzinom
Basalzelladenokarzinom		Großzelliges Karzinom
Sebaziöses Lymphadenokarzinom		Karzinosarkom
Zystadenokarzinom		Onkozytisches Karzinom
Low-grade cribriformes Zystadenokarzinom		Lymphoepitheliales Karzinom
Muzinöses Adenokarzinom		

Tabelle 1.2.1: *Grading (low (G1)- intermediate (G2)- high grade (G3))* von Speicheldrüsenkarzinomen; einige Tumorentitäten finden sich in mehreren *Grading*-Kategorien und treten deshalb in der Tabelle mehrfach auf. (Quellen: siehe Referenz ⁴⁵ und "Cellular classification of Salivary gland cancer" des National Cancer Institute, www.cancer.gov)

Staging

Das Staging der Tumoren der großen Speicheldrüsen richtet sich nach der TNM-Klassifikation und umfasst die Tumorgöße, die lokale Ausdehnung, regionale Lymphknotenmetastasen sowie distale Metastasen. Die Kriterien zur Klassifizierung sind in Tabellen 1.2.2-1.2.4 aufgelistet. Tabelle 1.2.5 zeigt die Stadieneinteilung. Diese Kriterien gelten für alle Arten von

Speicheldrüsenkrebs. Die TNM-Klassifizierung der kleinen Speicheldrüsen entspricht derjenigen anderer Tumoren in der jeweiligen anatomischen Region wie beispielsweise der Mundhöhle.²⁸

T Ausdehnung	
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm und/oder extraparenchymale Ausdehnung
T4a	Tumorinvasion von Haut, Unterkiefer, Gehörgang und/oder <i>N. facialis</i>
T4b	Tumorinvasion der Schädelbasis und/oder der pterygoidalen Muskel und/oder der <i>A. carotis</i>

Tabelle 1.2.2: T-Staging von Tumoren der großen Speicheldrüsen⁶

N Lymphknotenregion	
Nx	Regionale Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem einzelnen ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm \geq im größten Durchmesser
N2	Metastasen in einem einzelnen ipsilateral Lymphknoten, 6 cm \geq größter Durchmesser > 3 cm, oder in bi- oder kontralateralen Lymphknoten, 6 cm \geq größter Durchmesser
N2a	Metastase in einem einzelnen ipsilateralen Lymphknoten, 6 cm \geq größter Durchmesser > 3 cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, 6 cm \geq größter Durchmesser
N2c	Metastasen in bi- oder kontralateralen Lymphknoten, \geq 6 cm größter Durchmesser
N3	Metastasen in einem Lymphknoten, > 6 cm größter Durchmesser

Tabelle 1.2.3: N-Staging^{6,6,35}

Fernmetastasen	
MX	Distale Metastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine distalen Metastasen
M1	Distale Metastasen

Tabelle 1.2.4: M-Staging⁶

Tumorstadium	Definition		
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Stadium IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
Stadium IVB	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 1.2.5: Stadieneinteilung⁶

1.2.4 Das Mukoepidermoidkarzinom

Das Mukoepidermoidkarzinom stellt, wie bereits erwähnt, mit einem Anteil von etwa einem Drittel den häufigsten Typ maligner Speicheldrüsentumoren dar.⁸⁵ Das Karzinom tritt bei einem durchschnittlichen Patientenalter von 45 Jahren auf, wobei Frauen in einem Verhältnis von 3:2 häufiger betroffen sind als Männer. In etwa der Hälfte der Fälle sind die großen Speicheldrüsen, vorrangig die Ohrspeicheldrüse, betroffen. Andere häufige Lokalisationen sind der Gaumen sowie die Wangenschleimhaut. Histologisch setzt sich der Tumor aus drei Zelltypen zusammen, deren Verhältnis zueinander variiert: neben Mukuszellen finden sich epitheloide (squamoide) Zellen sowie Intermediärzellen (histologische Abbildungen siehe unter *Ergebnisse*). Unter Umständen lassen sich nicht alle drei Zelltypen im histologischen Präparat nachweisen, so dass bei Dominanz eines Zelltyps differentialdiagnostische Schwierigkeiten resultieren können. Zudem können onkozytische (eosinophile) oder helle, glykogenreiche Zellen auftreten und das feingewebliche Erscheinungsbild prägen, so dass von varianten Mukoepidermoidkarzinomen im Gegensatz zu den klassischen gesprochen wird.³⁴ Auch dies mag differentialdiagnostische Probleme bedingen. So könnte beispielsweise das onkozytische (eosinophile) MEC mit einem Onkozytom verwechselt werden.¹⁷ Für die diagnostisch sehr hilfreiche Detektion vereinzelter Mukuszellen, die in der Regel weniger als 10% des Tumors ausmachen, eignen sich Spezialfärbungen wie *Meyer's Muzikarmin* oder das *PAS-Reagenz* (Periodsäure-Schiff). Ferner finden immunhistochemische Färbungen Anwendung, um epitheloide oder Intermediärzellen zu erkennen und eine Abgrenzung zu anderen, in der Morphologie ähnlich wirkenden Karzinomen zu erreichen.^{21,77} Für das *Grading* der Tumoren wurden verschiedene

Systeme entwickelt, darunter ein Score-System des *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP), das anhand von fünf histologischen Kriterien zwischen *low*, *intermediate* und *high grade* Tumoren unterscheidet und von der WHO übernommen worden ist.^{5,34,60} Die Aussagekraft dieses Grading-Systems relativiert sich allerdings, da sich gezeigt hat, dass *low grade* Tumoren der *Glandula submandibularis* ein ähnlich aggressives Verhalten wie *high grade* Tumoren der *Glandula parotidea* zeigen.³³ Ferner finden sich widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Prognose von *intermediate grade* Tumoren, die ähnlich den *low grade* Tumoren günstig, jedoch auch so schlecht wie bei aggressiven Tumoren aussehen kann.^{3,65} Brandwein et al. diskutieren, dass das genannte *Grading-System* Mukoepidermoidkarzinome „unterschätzt“ und schlagen weitere Merkmale wie Infiltrationsmuster, Gefäßinvasion und Knocheninfiltration zur Komplettierung des Gradings vor.¹³

Eine Besonderheit stellt die für Mukoepidermoidkarzinome spezifische Translokation t(11;19)(q21;p13) dar, die zu einem Fusionsprotein führt, welches in allen drei Zelltypen nachgewiesen werden kann. Translokation-positive Fälle sollen eine bessere Prognose als solche ohne Translokation zeigen.¹⁷ Auf die Translokation t(11;19) wird im Abschnitt *Tumorgenetik* noch genauer eingegangen.

1.2.5 Klinik, Diagnostik und Therapie

Speicheldrüsenkarzinome der *Glandula Parotidea* fallen durch eine knotige Verhärtung derselben mit Größenprogredienz auf, die bei Azinuszell-, Mukoepidermoid- sowie adenoidzystischen Karzinomen in der Regel langsamer vonstatten geht als bei den anderen Karzinomen und nicht oder kaum schmerzhaft ist. Bei schneller wachsenden Tumoren tritt Spontan- und Druckschmerz, im Falle der Ohrspeicheldrüse also im Bereich der *Fossa retromandibularis*, auf. Als Zeichen der Malignität gelten Infiltration der Haut, Ulzerationen und Durchbruch nach außen oder, falls die Parotis betroffen ist, auch in den Gehörgang sowie Fazialisparese und Metastasierung.¹²

Diagnostisch sind nach ausführlicher Anamnese und klinischer Untersuchung vor allem bildgebende Verfahren wie Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie zu nennen, wobei insbesondere letzteres Verfahren aufgrund seines hohen

Weichteilkontrastes in der Darstellung der Grenzfläche zwischen Tumor und umgebenden Gewebe und somit seiner Ausdehnung überlegen ist und zudem keine Strahlenbelastung beinhaltet. Mithilfe der Feinnadelaspirationsbiopsie ist es möglich, auf nicht-chirurgischem Weg an eine Diagnose zu gelangen und zu klären, ob es sich um eine entzündliche oder neoplastische Läsion handelt und in letzterem Fall unter Umständen, ob diese am ehesten einen Primärherd oder eine Metastase darstellt oder ob die Läsion epithelialer oder lymphatischer Natur ist. Vor allem bei Patienten in schlechtem Allgemeinzustand oder solchen mit einer generalisierten Grunderkrankung, welche die Speicheldrüsen mit involvieren könnte oder aber auch bei einer höheren Wahrscheinlichkeit eines entzündlichen Prozesses ist es sinnvoll, dem Patienten einen operativen Eingriff zu ersparen. Allerdings ist zu bedenken, dass das Risiko falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse zwischen 1-14 % liegt und die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Diagnose mit 81-98 % angegeben wird. Eine spezifische Diagnose kann sogar nur in 60-75 % gestellt werden. Der häufigste Fehler liegt in der falschen Probeentnahme, so dass der Tumor also nicht korrekt getroffen wird. Im Zweifelsfall oder bei hoher Wahrscheinlichkeit eines malignen Prozesses ist daher eine operative Probenentnahme mit Schnellschnittuntersuchung des Gewebes sinnvoll, um davon ausgehend das weitere operative Vorgehen sowie die Nachbehandlung festzulegen.^{12,28}

Die betroffene Speicheldrüse sollte operativ entfernt werden. Bei der Ohrspeicheldrüse ist, außer bei Azinuszell- und *low grade*-Mukoepidermoidkarzinomen, der *Nervus facialis* zu erhalten, wohingegen dieser bei den hochgradig malignen Karzinomen mitreseziert werden sollte. Zudem wird eine funktionelle *Neck dissection* durchgeführt. An die Operation schließt sich eine Radiotherapie als Nachbehandlung an. Bei Inoperabilität stellt diese die primäre Therapieoption dar.¹²

1.3 Tumorgenetik

1.3.1 Kanzerogenese

Die Krebsentstehung stellt nach heutiger Vorstellung einen Mehrschrittprozess dar, bei dem es zu einer Reihe von genetischen Veränderungen kommt, die in ihrer Summe die

Transformation einer Zelle zu einer Tumorzelle bewirken. Am besten untersucht ist die Tumorentstehung bei epithelialen Neoplasien. Nach der monoklonalen Entwicklungstheorie geht man davon aus, dass die Transformation einer einzigen Zelle zu einer Tumorstammzelle genügt, um eine Geschwulst entstehen zu lassen, die durch Proliferation normales Gewebe verdrängt und im Falle der Malignität dieses invadiert und zur Metastasierung befähigt ist. Dabei vollzieht sich dieser Prozess zunächst über Dysplasien des Epithels (=intraepitheliale Neoplasie) hin zum flächenhaft wachsenden *Carcinoma in situ*, das die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat und nach Überschreiten jener mikroanatomischen Grenze schließlich als invasives Karzinom gilt.

Hinsichtlich genetischer Veränderungen werden insbesondere zwei große antagonistische Systeme unterschieden, die Onkogene und die Tumorsuppressorgene bzw. deren Genprodukte.

Protoonkogene sind „normale“ Gene, welche an der Steuerung der Zellproliferation, -differenzierung und -motilität beteiligt sind. Sie sind größtenteils Bestandteile eines komplizierten Netzwerks verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind. Liegen modifizierende und konstitutiv aktivierende Mutationen dieser Gene oder eine Vervielfältigung derselben vor, so spricht man von Onkogenen, deren Funktion also gesteigert und dereguliert ist (*gain of function*). Dabei ist die Alteration eines Allels ausreichend.

Tumorsuppressorgene üben einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation aus. Fehlende oder durch Mutationen verursachte fehlerhafte Bildung der Genprodukte führen damit zu einem deregulierten Wachstum der Tumorzellen (*loss of function*). Tumorsuppressorgene zeigen rezessives Verhalten, so dass, gemäß der Knudson-Hypothese, beide Allele alteriert sein müssen.¹¹

Im Folgenden werden kurz zwei im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung seiende Onkogene aus der Gruppe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, EGFR und Her2, dargestellt. Eine weitere, insbesondere bei Mukoepidermoidkarzinomen bedeutende genetische Veränderung ist die reziproke Translokation t(11;19)(q21;p13), die anschließend kurz besprochen wird.

1.3.2 EGFR und Her2

Wachstumsfaktorrezeptoren gehören in die Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, von welchen derzeit an die zwanzig Subfamilien bekannt sind. Die *Epithelial growth factor receptor* (EGFR)-Familie besteht aus vier Rezeptoren: EGFR (oder ErbB1), Her2 (ErbB2/neu), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4). Ihre Überexpression oder konstitutiv aktivierende Mutationen ihrer zugrunde liegenden Gene scheinen eine Rolle bei der Tumorentstehung einiger Karzinome zu spielen. Es handelt sich um transmembranöse Proteine mit einer extrazellulären n-terminalen Ligandenbindungsdomäne und einer intrazellulär lokalisierten, c-terminalen katalytischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität, welche die Autophosphorylierung der dimerisierten Rezeptoren bewirkt. Die Phosphorylierung bestimmter Tyrosylreste führt zu Bindungsmöglichkeiten von Enzymen, beispielsweise Phospholipase C γ , die sodann durch Phosphorylierung aktiviert werden, oder zur Bindung von Adaptorproteinen, welche die weitere Signaltransduktion vermitteln, etwa über den Ras/MAP-Kinase – Signalweg bei EGFR, der letztlich zur Gentranskription führt. Es gibt mehrere Liganden mit unterschiedlicher Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren, wobei *Epidermal growth factor* (EGF) und *Transforming growth factor alpha* (TGF α) ausschließlich an EGFR binden.^{11,36,67,110}

Die Besonderheit bei Her2 ist, dass es sich um einen *Orphan*-Rezeptor handelt, für welchen bislang kein Ligand gefunden wurde. Jedoch führt die Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren zur Aktivierung. Her2 stellt den bevorzugten Dimerisierungspartner für die anderen Rezeptoren der EGFR-Familie dar. Die Bedeutung von Her2-Heterodimeren liegt vor allem in der anhaltenden Aktivierung verschiedener Signale bzw. Enzyme wie beispielsweise der *Mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen oder von ERK1 und ERK2 (*Extracellular regulated kinases*). Da sowohl die Aktin-Myosin-Motoraktivität als auch die Proliferation der migratorischen Zellen über diese ER-Kinasen geregelt werden, könnte dies das erhöhte Risiko für Metastasen bei Her2 positiven Tumoren erklären.⁸⁶

Bei Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass eine EGFR- und TGF- α -Koexpression einen starken unabhängigen Faktor für aggressiveren Krankheitsverlauf und schlechtere Prognose darstellen.⁹⁸ Dieses Ergebnis deutet auf die mögliche Bedeutung einer autokrinen Stimulation des Wachstums der Tumorzellen über den EGF-Rezeptor hin, was in einer anderen Arbeit von Tzeng et al. ferner unterstrichen wurde. Dort fand sich, dass

ausschließlich Tumorzellen EGFR exprimierender Pankreaskarzinome zugleich den Liganden EGF exprimierten und dass dies signifikant stärker bei erhöhter Genkopiezahl von EGFR stattfand.⁹⁷

Eine Überexpression von EGFR oder Her2 findet sich jedoch auch bei einer Reihe anderer Tumoren, darunter Bronchialkarzinome, kolorektale Karzinome, Urothelkarzinome oder Prostata- und Ovarialkarzinome. Aber auch Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sollen mit einer schlechteren Prognose und distalen Metastasen assoziiert sein.^{67,81}

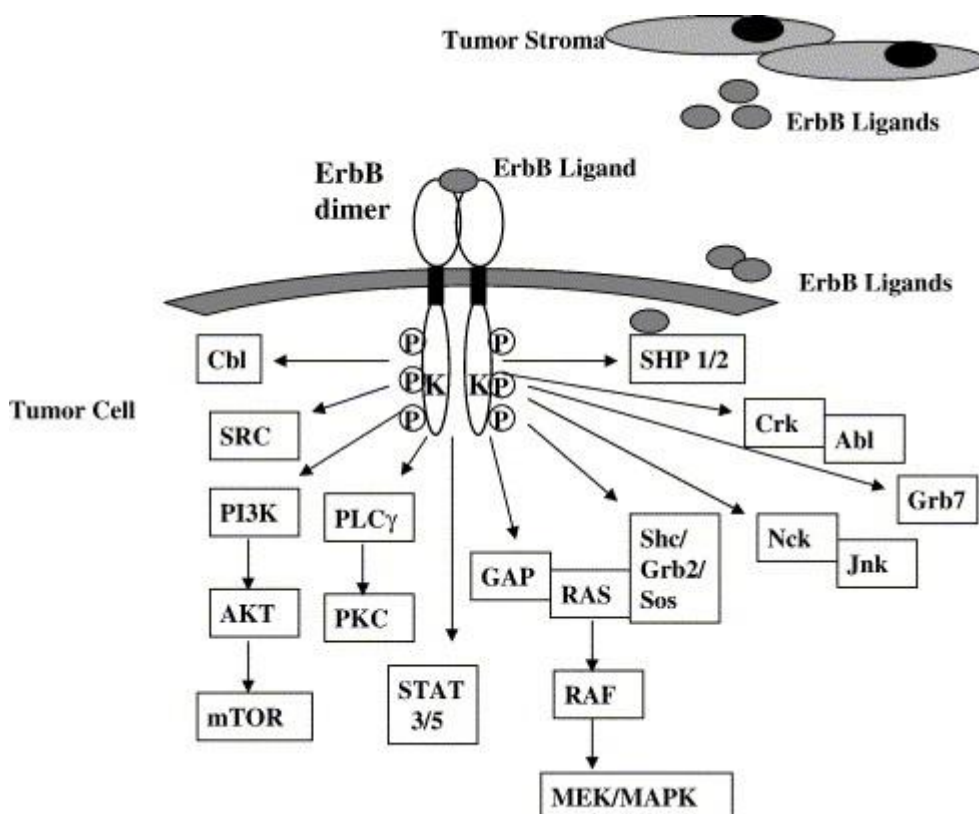


Abb. 1.3.1: Darstellung eines dimerisierten ErbB-Rezeptors mit Bindung des Liganden und Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intrazellulären Domäne: die Phosphorylierung ermöglicht zahlreiche Proteinbindungen mit konsekutiver Aktivierung verschiedener Signalwege, die Einfluss auf Wachstum und Proliferation der Zelle haben. (Quelle: Normanno et al., "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer."⁶⁷)

1.3.3 Translokation t(11;19)(q21;p13)

Die Translokation t(11;19)(q21;p13) stellt ein nahezu ausschließlich bei Mukoepidermoidkarzinomen vorkommendes chromosomales Rearrangement dar, welches in mehreren Studien bereits untersucht und durchschnittlich in über 50% der MECs nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch in anderen Speicheldrüsenkarzinomen.^{55,8,70,94}

Auch bei *Warthin's Tumoren* zeigten manche Studien die Translokation in einigen Fällen, andere hingegen konnten dies nicht bestätigen.^{70,94} Zudem wurden bei einem klarzelligem Hydroadenom der Haut die Translokation sowie das Translokationsprodukt nachgewiesen.⁸

Das Besondere bei dieser Translokation sei eine Assoziation mit einem günstigeren klinischen Verlauf. Translozierte Tumoren sollen demnach ein signifikant geringeres Risiko für Metastasen, lokaler Rezidiv sowie tumorbedingten Tod sowie eine positive Korrelation mit dem Gesamtüberleben aufweisen als nicht translozierte MECs.^{8,70} Eine in diesen Studien gefundene Restriktion der Translokation auf *low* und *intermediate grade* MECs und somit eine Assoziation mit einer günstigeren Tumorgraduierung konnte von anderen Autoren jedoch nicht bestätigt werden.^{68,94}

Die reziproke Translokation führt zu einer Fusion von Exon 1 eines Genes auf Chromosom 19, Bande p13, welches aufgrund der bei MECs entdeckten Translokation *mucoepidermoid carcinoma translocated gene 1* (MECT1) genannt wird, mit den Exons 2-5 eines Genes der sogenannten *mastermind-like gene family*, MAML2, auf 11q21. Sowohl MECT1 als auch MAML2 spielen eine Rolle bei Zellproliferation und -differenzierung.⁶⁸ MAML2 stellt einen von dem Transkriptionsfaktor CSL abhängigen Koaktivator des Liganden-stimulierten Notch-Rezeptors dar. Es bildet mit CSL und der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors einen Multiproteinkomplex.¹⁰⁷ Die Effekte des Notch-Signalweg sind komplex und können je nach Stimulus und Zelltyp onkogen als auch suppressiv sein.^{57,68,95,106} MECT1 (auch TORC1 genannt) ist ein Koaktivator von *cAMP-response element*-Bindungsproteinen und verstärkt die CREB (cAMP response element binding protein) -abhängige Transkription verschiedener Gene phosphorylierungsunabhängig.^{19,95}

Das Fusionsprotein weist sowohl die N-terminale CREB-Bindungsdomäne von MECT1 als auch die C-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) des MAML2-Genes auf. Dabei wurde gefunden, dass tatsächlich die CREB-abhängige Transkription verschiedener Gene durch das Fusionsprotein aktiviert und somit cAMP-abhängige Signalwege konstitutiv aktiviert werden.¹⁰⁶ Zudem wird die Transkription von Zielgenen des Notch-Signalweges, wie beispielsweise HES1, das bei der Zelldifferenzierung mitwirkt, Liganden-unabhängig aktiviert, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist. Ferner konnte ein tumorinduzierender Effekt des MECT1-MAML2 Fusionsproduktes an RK3E-Zellen, einer epithelialen Zelllinie, nachgewiesen werden.⁹⁵ Womöglich spielt also die Durchbrechung beider Signalwege durch

die Translokation eine Rolle bei der Entstehung von Mukoepidermoidkarzinomen. Eine kausale Erklärung für die günstigere Prognose translokationspositiver Tumoren gibt es bisweilen jedoch nicht.

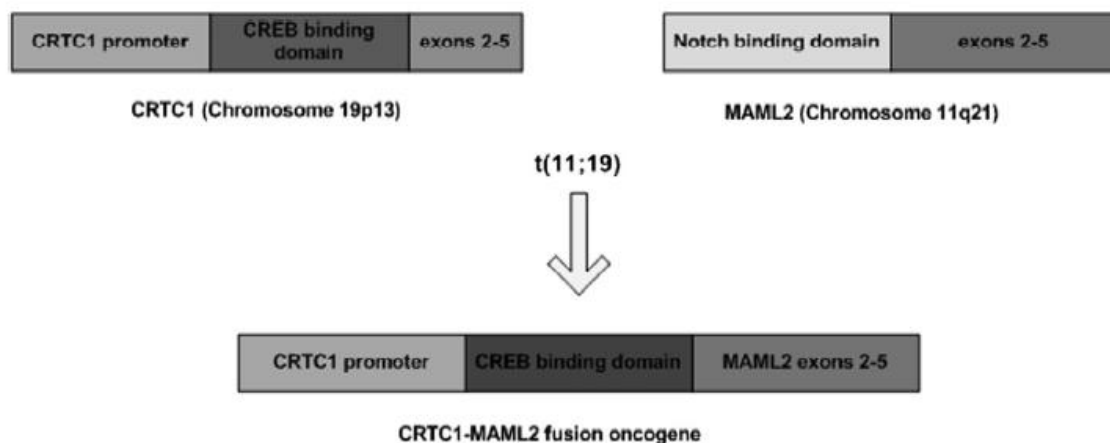


Abb. 1.3.2: Schematische Darstellung des Fusionsgenes MECT1-MAML2. Die Notch-Bindungsdomäne von MAML2 wurde ersetzt durch die CREB-Bindungsdomäne von MECT1 (synonym CRTC1), dessen Promotor dem Fusionsgen vorgeschaltet bleibt. (Quelle: O'Neill, "t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma."⁶⁸)

1.4 Ziele dieser Arbeit

Grundlage dieser Arbeit bildete eine Sammlung von 289 Speicheldrüsenkarzinomen unterschiedlicher Entitäten. Zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Niederschrift fand sich keine entsprechende Studie mit vergleichbar hoher Fallzahl.

Anhand dieser großen Tumorsammlung sollten zum Einen Fragen zu Speicheldrüsenkarzinomen im Allgemeinen beantwortet werden, zum Anderen sollten speziell die Mukoepidermoidkarzinome als häufigster Tumortyp der Speicheldrüsen näher untersucht werden.

Da Speicheldrüsenkarzinome eine Gruppe sehr unterschiedlicher Tumoren darstellen, deren histologische Formen sich teils in ähnlicher Weise auch in anderen Organen manifestieren, beispielsweise im Falle des duktales Adenokarzinoms, welches sowohl in Speicheldrüsen als auch u.a. in der Mamma vorkommt, wäre es sowohl speziell für die Tumoren im Kopf-Hals-Bereich als auch generell hilfreich, in dieses komplexe Gebiet mit seinen vielfachen Aufsplitterungen und Subtypisierungen mehr Überschaubarkeit zu bringen. Deshalb stellte sich die Frage, ob sich Tumoren durch gemeinsame Prognosemarker biologisch zusammenfassen lassen, die zugleich möglicherweise ein therapeutisches Ziel darstellen. Diesbezüglich sollten die Gene zu den epithelialen Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und Her2 bzw. die immunhistochemisch nachweisbare Expression dieser Rezeptoren untersucht werden, die auch bei zahlreichen anderen Tumoren eine bedeutende Rolle spielen. Es sollte geprüft werden, ob eine positive Immunhistochemie und/oder eine Genamplifikation und/oder eine Polysomie der zugrunde liegenden Chromosomen mit einem schlechteren Tumordifferenzierungsgrad und einem schlechteren Überleben assoziiert sind und ob sich diese Variablen in einer multivariaten Analyse als prognostisch relevant erweisen. Zudem sollte überprüft werden, ob entsprechende Veränderungen des EGFR- und Her2-Genstatus auf bestimmte, womöglich malignere Tumortypen begrenzt sind. Ferner sollte die Frage beantwortet werden, ob sich eine durch Genamplifikation oder Chromosomenvervielfachung bewirkte Erhöhung der "Gendosis" in der immunhistochemisch zu prüfenden Genexpression bemerkbar macht und ob es Fälle mit einer Koexpression beider Rezeptoren gibt.

Wie bereits dargestellt, stellen Mukoepidermoidkarzinome eine Tumorentität mit heterogenem histologischen Erscheinungsbild dar. Neben der klassischen Form können abweichende, sogenannte variante Subtypen, unterschieden werden. In der Literatur finden sich bisher jedoch keine Untersuchungen bezüglich möglicher Assoziationen varianter Formen mit der WHO Tumorgraduierung, dem Überleben oder mit anderen klinischen Faktoren. Auch stellte sich die Frage, ob die für Mukoepidermoidkarzinome beschriebene spezifische Translokation t(11;19) auf bestimmte histologische Subtypen beschränkt ist. Ferner sollte überprüft werden, ob die in der Literatur beschriebene Restriktion des genannten chromosomalen Rearrangements auf MECs zu bestätigen ist oder ob auch andere Speicheldrüsentumortypen betroffen sind.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zunächst TMAs des für die Arbeit gesammelten Tumormaterials hergestellt und sodann Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit Sonden für die Translokation t(11;19) sowie für die Gene zu EGFR auf Chromosom 7 sowie zu Her2 auf Chromosom 17 durchgeführt. Zudem kam eine immunhistochemische Bestimmung der Expression von EGFR und Her2 und zur genauen histologischen Einordnung der unterschiedlichen Subformen der Mukoepidermoidkarzinome eine immunhistochemische Färbung von CK5 und CK7 zum Einsatz. Die Befunde wurden zusammen mit klinischen Parametern statistisch ausgewertet.

2 Material und Methode

2.1 Datenerhebung

Das Tumormaterial dieser Arbeit stellt eine Sammlung von insgesamt 289 gut charakterisierten Fällen primärer Speicheldrüsenkarzinome dar, welche in den Universitätskliniken Erlangen und Regensburg sowie dem Stadtkrankenhaus Nürnberg zwischen 1990 und 2007 behandelt worden sind. Die klinischen Informationen wurden über die Tumorzentren Erlangen-Nürnberg und Regensburg sowie über das Speicheldrüsenkarzinomregister Erlangen bezogen.

2.2 Histologie und Klassifizierung

Es wurden Haematoxylin&Eosin (H&E)- bzw. PAS-gefärbte Schnitte von 289 einparaffinierten Tumorproben von Speicheldrüsenkarzinomen von zwei voneinander unabhängigen und in der Histologie von Speicheldrüsentumoren erfahrenen Pathologen untersucht, die weder die initiale Diagnose noch andere Daten hierzu kannten, wobei die WHO-Kriterien zur Tumorklassifizierung zugrunde lagen.⁷

Speziell für die Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome wurde eine Unterteilung in klassische MEC und in variante (nicht-klassische) MEC vorgenommen. Klassische MEC sind diejenigen, welche aus zwei oder drei Zelltypen zusammengesetzt sind: zum Einen aus Becherzellen, einzeln oder im Verband liegend, und zum Anderen aus Plattenepithelzellen und Intermediärzellen, welche in unterschiedlichen Proportionen vorliegen können. Bei den biphasischen Tumoren erfolgte die Einordnung in den Subtyp *klassisch*, wenn die Komponente aus schleimproduzierenden Becherzellen mindestens 50% ausmachte. Im Falle eines Vorliegens einer klassischen Histologie inmitten einer varianten, erfolgte die Einordnung als variante MEC, sofern die variante Komponente mehr als 80% ausmachte.

In schwierigen Fällen wurden zur Differenzierung der verschiedenen Zelltypen Immunfärbungen durchgeführt, die gegen Zytokeratin 5 (CK5) oder Zytokeratin 7 (CK7) gerichtet waren.

2.3 Tissue Microarrays (TMAs)

2.3.1 Tissue Microarrays in dieser Arbeit

Für eine Gewebsanalyse zahlreicher verschiedener Tumorproben hinsichtlich verschiedener für die Tumorentstehung von Interesse seiender Gene wäre eine separate Untersuchung eines jeden einzelnen Gewebeblocks sehr zeit-, da arbeitsaufwendig, aber auch kostenintensiv. Um deshalb möglichst viele Tumorproben zugleich untersuchen zu können, wurden im Vorfeld dieser Arbeit sogenannte *Tissue Microarrays* (TMAs) erstellt. Hierbei wurden Gewebeproben von bis zu 60 Stenzen in einen gemeinsamen Paraffinblock verbracht. Von diesen sog. Gewebsmultiblocken wurden anschließend Schnitte angefertigt, anhand derer das gestanzte Gewebe erneut von zwei Pathologen begutachtet und die Histologie jeweils dokumentiert wurde. Die hier getroffene Klassifikation der Proben wurde dann dem weiteren Vorgehen zugrunde gelegt.

Mit den *Multiarray*-Schnitten war es sodann möglich, in einem Arbeitsgang viele Tumorproben zugleich *in situ* mit fluoreszenzmarkierten Sonden zu behandeln, um sie anschließend auf Polysomien, Genamplifikationen oder Translokationen hin zu untersuchen. Ebenso wurden die immunhistochemischen Färbungen und ihre Auswertung an den Schnitten durchgeführt.

2.3.2 Prinzip der TMA-Herstellung

Aus den jeweils interessanten Regionen des zu untersuchenden Gewebes wurden Proben gewonnen, indem während der histopathologischen Beurteilung des dem jeweiligen Paraffinblock zugehörigen H&E-Schnittes die Tumorareale mit dem höchsten *Staging* und *Grading* markiert wurden und diese Markierung sodann auf die Schnittflächen des entsprechenden Paraffinblockes mit Markerstift übertragen wurden. Dabei war darauf zu

achten, dass die Markierung auf dem Block zu derjenigen auf dem H&E-Schnitt kongruent war. Aus den so markierten Gewebelöcken werden dann die relevanten Gewebebezirke herausgestanzt. Hierzu wird eine Handstanze verwendet, eine geschliffene Hohnadel mit einem Stempel und einem Innendurchmesser von 2mm. Das gestanzte Gewebe wurde anschließend in einen neuen Paraffinblock überführt und in diesem eingebettet. Von den fertigen Multiblöcken wurden sodann 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Adhäsionsobjektträgern mit Hämatoxylin&Eosin gefärbt, um die Qualität der Stanzen beurteilen zu können und für die FISH-Untersuchung eine histologische Orientierung zur Verfügung zu haben.

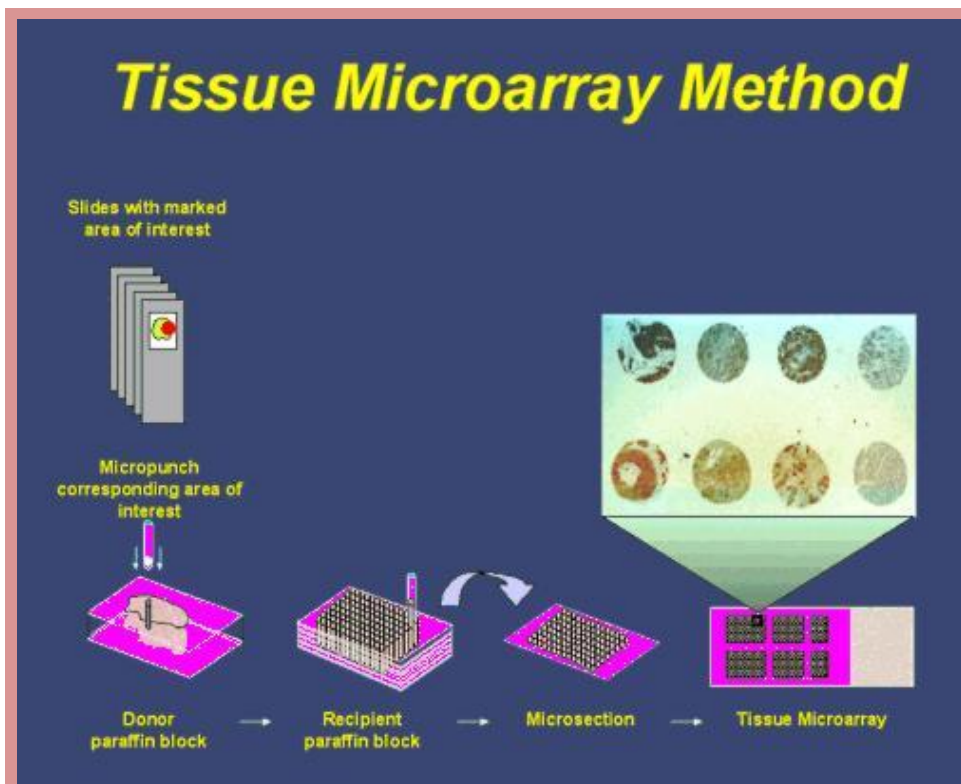


Abbildung 2.3.1: Prinzip der Herstellung eines *Tissue Micro Array*: ausgehend von H&E-gefärbten Schnittpräparaten verschiedener einparaffinierte Gewebeproben wird das jeweils interessierende Material (Tumor) markiert und sodann gezielt Stanzen aus den jeweiligen Gewebelöcken entnommen, die in einen *Multiarray*-Block eingebracht und eingeschmolzen werden, von welchem erneut Schnitte erstellt werden. (Quelle: <http://sunnybrook.ca/research>)

2.4 Verwendete Materialien und Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie

2.4.1 Materialien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Schlittenmikrotom (Mikrom, Heidelberg)

Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm Super Frost® Plus (Mezel-Gläser, Braunschweig)

Metallständer (Wagner & Munz, München)

Brutschrank B6060 (Heraeus Sepatech, Osterode)

Glasküvette (Dako Diagnostika, Hamburg)

Heizplatte (Ika Labortechnik, Staufen i. Br.)

Deckgläser 24 x 50 mm (Engelbercht GmbH, Edermünde)

Fixogumm (Marabuwerke GmbH & Co.KG, Tamm)

Entellan (Merck, Darmstadt)

2.4.2 Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

20 x SSC-Lösung

175,32 g NaCl

88,24 g Natriumcitrat-Dihydrat

ad 1,00 l Aqua dest.

2 x SSC-Lösung

100,00 ml 20 x SSC-Lösung

ad 900,00 ml Aqua dest.

pH-Werteinstellung zwischen 7,0 und 7,5 mit 200-500 µl 2 M HCl

Igepal Ca-630

[Octylphenoxy]polyethoxyethanol (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA)

4 x SSC + 0,3 % Igepal

200 ml 20 X SSC

ad 800 ml Aqua dest.

3 ml Igepal

pH-Werteinstellung zwischen 7,0 und 7,5 mit 200-500 µl 2 M HCl

1 x SSC

50 ml 20 X SSC

ad 950 ml Aqua dest.

pH-Werteinstellung zwischen 7,0 und 7,5 mit 200-500 µl 2 M HCl

0,01 N Natriumcitratlösung

0,490 g tri-C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O

ad 500 ml Aqua dest.

pH-Werteinstellung auf 6,0 mit HCl

Citratpuffer

Lösung 1: 29,41 g Natriumcitrat in 1 l Aqua dest. gelöst

Lösung 2: 21,01 g Zitronensäure in 1 l Aqua dest. gelöst

Puffermischung (pH=7,3): 1 ml Lösung 1 mit 49 ml Lösung 2 in 450 ml Aqua dest.

0,1 % Pepsinlösung

50 mg Pepsin (P7012, Sigma-Aldrich®)

ad 50 ml 0,01 M HCl

2.4.3 Verwendete FISH-Sondenkits

Verwendet wurden folgende ZytoLight® FISH-Sondenkits der Firma ZytoVision GmbH, Bremerhaven:

- MEC I Probe = SPEC t(11;19) Dual Color Break Apart Probe für die Tranlokation t(11;19)
- SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe für den EGFR-Genlocus und das zugehörige Centromer auf Chromosom 7
- SPEC HER2/CEN17 Dual Color Probe für den Her2-Genlocus und das zugehörige Centromer auf Chromosom 17

Zur Anfärbung der Zellkerne wurde das "Vectashield® Mounting Medium for fluorescence with DAPI" (4,6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) verwendet. Das Fluorochrom DAPI interagiert mit der DNA.

2.4.4 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von EGFR

Verwendet wurde ein monoklonaler Primärantikörper gegen EGFR (Klon E30) der Firma Dako Diagnostik, Hamburg, in einer Verdünnung von 1:50. Von derselben Firma kam das Detektionssystem EnVision zur Anwendung, welches alle erforderlichen Reagenzien wie Enzym-markiertes Polymer mit Sekundärantikörpern und Enzymsubstrat beinhaltet.

2.4.5 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von Her2

Es kam ein anti-c-erbB2-Antikörper der Firma Dako Diagnostik GmbH, Hamburg, in einer Verdünnung von 1:400 zum Einsatz. Der polyklonale Antikörper bindet an intrazellulär gelegene Strukturen des HER2/neu-Rezeptors.

Im verwendeten Streptavidin-Biotin-Kit der Firma Dako Diagnostik GmbH sind des Weiteren enthalten: biotinylierter Sekundärantikörper, Enzymkonjugat HRP-Streptavidin, Chromogen DAB.

2.4.6 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CK5

Verwendet wurden polyklonale Primärantikörper gegen hochmolekulares Zytokeratin 5 von der Firma Zytomed Systems GmbH, Berlin, in einer Verdünnung von 1:40. Als Detektionssystem wurde "ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit" der Firma Zytomed verwendet. Als

Substrat für die enzymatische, durch die Polymer-gebundene alkalische Phosphatase katalysierte Färbereaktion, kam Neufuchsin zum Einsatz, so dass im Falle einer Färbung ein pink-rötlicher Farbniederschlag zu verzeichnen war.

2.4.7 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von CK7

Es kam ein monoklonaler Primärantikörper gegen das niedermolekulare Zytokeratin 7 (Klon OV-TL 12/30) von „DCS – Innovative Diagnostik Systeme“ (Dr. Christian Sartori GmbH & Co.KG, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 zum Einsatz. Als Detektionssystem wurde, wie bei der immunhistochemischen Färbung von CK5, das Detektionssystem “ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit“ der Firma Zytomed Systems GmbH, Berlin, verwendet. Als Substrat kam Neufuchsin derselben Firma zum Einsatz (siehe oben).

2.4.8 Geräte für die (immun-)histologische Auswertung und Dokumentation

Mikroskop der Firma Leica, Objektive von Olympus Optical; Bilddokumentation mit Kamera und Software der Firma Visitron Systems, Puchheim, RT Color Diagnostic.

2.4.9 Geräte für die FISH-Auszählung

- Auflichtfluoreszenzmikroskop AxioImager Z1 (Zeiss) mit einer Plan-Apochromat-Linse (63x, 1.4) (Ölinversionsobjektiv)
- Fluoreszenzillumination HBO 100 Watt (Osram)
- Anregungs- und Emissionsfilter (AHF Analysetechnik, Tübingen):

	Anregung	Emission
DAPI	360 nm ± 20 nm	460 nm ± 25 nm
Rhodamin	545 nm ± 30 nm	610 nm ± 75 nm
Oregon-Green	500 nm ± 20 nm	535 nm ± 30 nm
Dualband (FITC/TRITC)		

2.4.10 Kamera zur Ergebnisdokumentation

Zur Bilddokumentation wurde die charge-coupled device (CCD) Kamera AxiocamMRm von Zeiss mit einer CCD-Basisauflösung von 1388 X 1040 (1,4 Megapixel) und einer Pixelgröße von 6,45 µm (H) x 6,45 µm (V) verwendet.

Software Metamorph, Version 3.51 (Univeral Imaging Corp.) zur Steuerung der Mikroskopfunktionen, Bildaufnahme und Bildanalyse:

2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

2.5.1 Prinzip der FISH

Durch Erhitzen der Gewebeschnitte werden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA denaturiert, sodass einzelsträngige DNA entsteht (DNA-Schmelzvorgang). Lässt man diese nun langsam abkühlen, hybridisieren die komplementären Abschnitte wieder regelrecht. Experimentell kann man Sonden zugeben, die an spezifischen Abschnitten der DNA anstelle der Gegenstrang-DNA binden. Die Sonden sind DNA-Sequenzen, die sich zu denjenigen DNA-Abschnitten, die sie detektieren sollen, komplementär verhalten; das können zum Beispiel Zentromerregionen einzelner Chromosomen oder spezielle Genloci sein.

Bei der Synthese dieser Oligonukleotide werden modifizierte Desoxynukleotidtriphosphate verwendet, die fluochrome Moleküle kovalent an Seitengruppen gebunden haben. Fluoreszierende Moleküle haben die physiko-chemische Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Exzitation) und Licht mit einer spezifisch längeren Wellenlänge wieder abzugeben (Emission). Bei der anschließenden mikroskopischen Betrachtung werden die Objekte mit UV-Licht angeregt. Zusätzlich verwendet man Filter spezieller Wellenlängen, die es ermöglichen, sich nur begrenzte Wellenbereiche anzusehen und damit spezifische Signale zu erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Sondenkits für die Gene Her1 (=EGFR) und Her2 zum Einsatz. Hierbei wurden jeweils sowohl ein Abschnitt der Centromerregion des dem Gen zugehörigen Chromosoms als auch ein Abschnitt des Genes selbst mit unterschiedlich

Fluorochrom-markierten Sonden hybridisiert, sodass zwischen Genamplifikationen und Polysomien unterschieden werden konnte.

Weiterhin kam für die Translokation t(11;19) eine sogenannte *break apart*-Sonde zum Einsatz, welche sich aus zwei unterschiedlich gelabelten DNA-Abschnitten zusammensetzt, von welchen einer distal und einer proximal des MAML2 Genes auf Chromosom 11, Bande 21, bindet, sodass sich ein Mischsignal beider Sondenanteile ergibt, das im Falle des Vorliegens einer Translokation in zwei unterschiedliche Einzelsignale aufgesplittet wird.

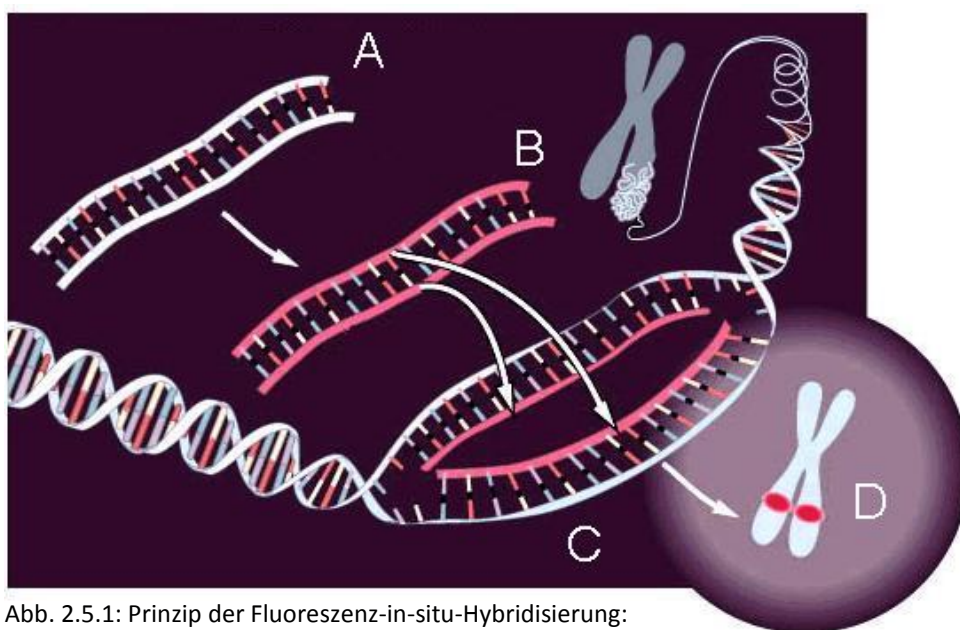


Abb. 2.5.1: Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Eine DNA-Sonde (A) ist komplementär zu einem Abschnitt (Gen oder Centromer) der DNA eines Chromosoms (D). Die Sonde wird mit fluoreszierenden Markern versehen (B), damit sie detektierbar ist. Durch Aufschmelzung der Sonden- und Ziel-DNA bilden sich jeweils Einzelstränge, so dass die komplementäre Sonde an die DNA binden kann. Die somit entstandene Markierung des Gens/Centromers ist fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar. (Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/451754>)

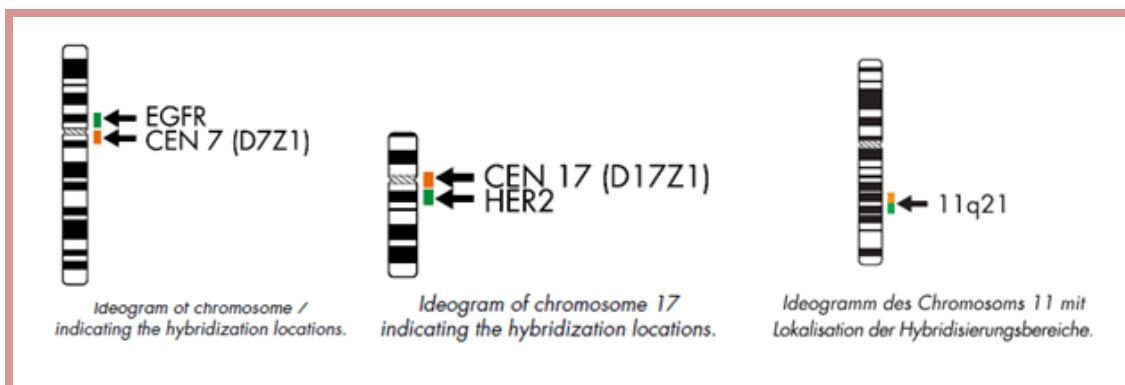


Abbildung 2.5.2: Darstellung der Hybridisierungsbereiche der jeweils verwendeten Sondenkits. Links und Mitte: Sonden für EGFR und Her2; rechts: *Break-apart*-Sonde für t(11;19). (Quelle: aus den jeweiligen Datenblättern zu den Sonden der Firma ZytoVision GmbH, Bremerhaven)

2.5.2 Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt: am ersten Tag erfolgte die Enparaffinierung der Stenzen, der Gewebeverdau mit Pepsin und, nach zwischengeschaltetem Waschschrift, die DNA-Denaturierung sowie anschließend die Hybridisierung mit den eingesetzten Sonden über Nacht, während am folgenden Tag die DAPI-Färbung der Zellkerne sowie die abschließende Konservierung durchgeführt wurden.

Entparaffinierung

- Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte für 35 Minuten in einen Brutschrank bei 72°C geben
- Zweimaliges, zehnminütiges Waschen in je einer frischen Xylol-Lösung.
- Rehydrierung der Gewebsstanzen durch Behandlung der Objektträger mit 100%, 80% und 70% Ethanol für jeweils 2 Minuten (absteigende Alkoholreihe).
- Kurzes Waschen in Aqua destillata

1. Vorbehandlung

- Einlegen der Objektträger in auf 95°C erwärmte 0,01 N Natriumcitratlösung für 40 Minuten

2. Vorbehandlung (= Gewebsverdau) und anschließendes Waschen

- Einbringen der Objektträger in 0,1 %ige Pepsinlösung mit 0,01 M HCl bei 37°C für 3 – 5 Minuten (Gewebsverdau)
- Abstoppen des Verdauens durch kurzes Waschen in 2 X SSC Lösung bei Raumtemperatur
- Kurzes Waschen in Aqua dest.
- Dehydrierung des Gewebes mittels aufsteigender Alkoholreihe bestehend aus 70%, 80% und 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten
- Trocknen der Objektträger

Denaturierung

- 10 µl der jeweils zum Einsatz kommenden Sonde unter möglichst lichtgeschützten Bedingungen auf die Objektträger geben
- Deckgläser auf die Objektträger aufbringen und mit Fixogumm luftdicht abschließen
- Inkubation der Objektträger bei 75°C für 5 Minuten auf der Heizplatte unter Lichtschutz zur DNA-Doppelstrangdenaturierung

Hybridisierung

- Überführen der Objektträger in eine feuchte Kammer und anschließende Inkubation in einem auf 37°C eingestellten Brutschrank über Nacht

DAPI-Färbung und Konservierung

- Entfernung der Deckgläser
- Jeweils 10 minütiges Waschen der Schnitte in 4 X SSC+ 0,3 % Igepal , 2 X SSC und 1 X SSC, wobei die Lösungen im Wasserbad auf 50°C erwärmt wurden
- Kurzes Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
- Trocknen der Objektträger unter lichtgeschützten Bedingungen
- Aufbringen der Kernfärbung DAPI auf die Gewebestanzten
- Deckgläser auf die Objektträger aufbringen und mit Entellan fixieren.
- Nach einer Trockenzeit von ca. 30 Minuten sind die Schnitte auswertbar

2.5.3 Ergebnisevaluation der Hybridisierung

Es wurden mit wenigen Ausnahmen, in welchen die Auswertung erschwert oder die Zahl valider Tumorzellkerne sehr niedrig war, mindestens 25 Zellkerne pro Stanze untersucht, an denen die FISH-Signale ausgezählt wurden. Dabei wurden nur Zellkerne ausgewertet, die sich nicht überlappten und die in der DAPI-Färbung intakt aussahen. Große Zellkerne wurden bevorzugt untersucht. Signale wurden als einzeln gewertet, sofern Sie um einen Mindestabstand von einer Signalkpunktdicke voneinander getrennt waren. Das Parenchym

infiltrierende und klar als solche erkennbare Lymphozyten, stromale und endotheliale Zellen sowie solche ohne Signal oder mit Gen-, aber ohne Centromersignal im Falle der EGFR- und Her2-Sonden, wurden nicht gezählt. Jedoch wurde die Hybridisierung der Lymphozyten, der stromalen und endothelialen Zellen als interne Kontrolle einer jeden Stanze verwendet, um Artefakte auszuschließen. Zudem fand sich auf jedem Multiblock eine Referenzstanze mit Normalgewebe als Kontrolle. Zur Signalzählung wurden die oben beschriebenen Anregungsfilter verwendet.

Die Signale der Zellen wurden jeweils von zwei unabhängigen Beobachtern erfasst und dokumentiert.

2.5.4 Auswertungskriterien der MEC-Sonde

Ein Zellkern wurde als Translokation-positiv gewertet, sofern der Abstand der Signale der mit einem orange bzw. einem grün fluoreszierenden Fluorochrom gelabelten *break apart*-Sonden mindestens der Dicke eines Einzelsignals entsprach, so dass also zwei deutlich getrennte, unterschiedlich fluoreszierende Signale wahrgenommen werden konnten. Misch- oder "Ampelsignale" galten hingegen nicht als Nachweis einer Translokation.

Eine Tumorstanze wurde dann als positiv für die Translokation t(11;19) eingestuft, sobald mindestens 50 % der gezählten Kerne transloziert waren.

2.5.5 Auswertungskriterien der EGFR- und Her2-Sonden

Es wurde für jeden untersuchten Zellkern sowohl die Zahl der Centromer- als auch der Gensignale notiert. Außerdem wurde die *Ratio* der Gen- und Centromersignale aller gezählten Kerne pro Stanze gebildet.

Lagen in mindestens 50 % der Kerne drei Centromersignale vor, wurde dies als Trisomie eingestuft, bei vier oder mehr Centromersignalen entsprechend als hohe Polysomie.

Für die *Ratio* aus Gen- und Centromersignalen wurde ein *Cut-off*-Wert von 1,5 festgelegt, ab dem eine Tumorprobe als „genamplifiziert“ eingestuft wurde.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Prinzip der Immunhistochemie

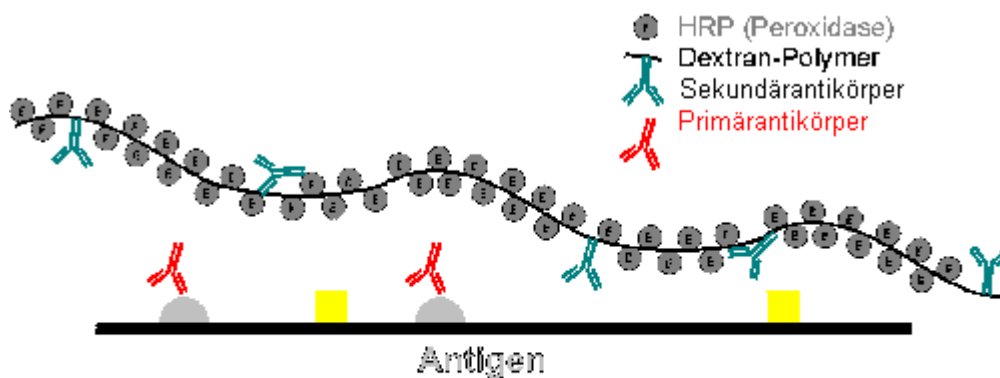
Die Immunhistochemie basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie nutzt einen gegen ein bestimmtes antigenes Epitop gerichteten Antikörper, der mit hoher Affinität an dieses bindet und an dessen Fc-Teil ein weiterer, sogenannter Sekundärantikörper, binden kann. Dieser ist mit für die Detektion relevanten Substanzen konjugiert, so dass letztlich über den Nachweis des Sekundärantikörpers auf das Vorhandensein des Antigens geschlossen wird, das von Interesse ist. Hierbei gibt es unterschiedliche, direkte und indirekte Verfahren und entsprechend auch verschiedene Detektionsreagenzien und –schritte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Antigene EGFR und Her2/neu untersucht.

Für die Immunhistochemie von EGFR kam das "EGFR pharmDX™-Kit"-System der Firma Dako GmbH, Hamburg, zum Einsatz. Hierbei wird nach Entparaffinierung des Gewebeschnittes dieses mit dem monoklonalen Antikörper, Klon 2-18C9, inkubiert, welcher an das EGFR-Protein bindet. Anschließend erfolgt die Visualisierung, indem ein an ein Dextran-Polymer gebundener Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. Zugleich weist das Dextran-Gerüst gebundene Meerrettichperoxidase auf. Durch Zugabe eines Chromogens (Neufuchsin) erfolgt mittels enzymatischer Umsetzung die eigentliche Färbereaktion an der Antigenseite. Anschließend kann die Gegenfärbung erfolgen, um histologische Strukturen zur Darstellung zu bringen.

Prinzipiell analog erfolgte die immunhistochemische Färbung von CK5 und CK7, bei welcher detektionstechnisch ebenso ein Polymer zum Einsatz kam. Hierbei waren mehrere Sekundärantikörper kovalent mit Enzymen (alkalische Phosphatase) ohne Dextrankette verbunden (siehe Abbildung 2.6.2).

Die immunhistochemische Färbung von Her2 unterschied sich im Detektionsverfahren, da die Avidin-Biotin-Methode zum Einsatz kam, bei welcher der Sekundärantikörper mit Biotin (Vitamin H) konjugiert ist. Biotin wird sehr spezifisch von dem Glykoprotein Avidin gebunden, das pro Molekül je vier Biotinmoleküle binden kann. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Komplex zugegeben, welcher freie Biotinbindungsstellen aufweist und somit an den Sekundärantikörper bindet und andererseits zudem mit Peroxidase konjugiert ist.

Wiederum durch Zugabe eines Chromogens (hier: Diaminobenzidintetrahydrochlorid, DAB) lässt sich letztlich das Antigen-tragende Gewebe nachweisen. Aufgrund der hohen Affinität von Avidin und Biotin sind die Ergebnisse sehr spezifisch. Abschließend erfolgt wiederum eine Gegenfärbung zur Darstellung histologischer Strukturen.



Dextran-Polymer-basiertes Nachweisverfahren

Abb. 2.6.1: Prinzip der Immunhistochemie für EGFR: aufgrund des Dextran-Gerüsts mit gebundenen Sekundärantikörpern und Enzym ist keine Zugabe von Zwischenantikörpern nötig, weshalb das Nachweisverfahren schneller erfolgt („*ready-to-use-visualization-Reagenz*“) bei hoher Signalverstärkung. (Quelle: modifiziert übernommen aus www.pathologie-online.de)

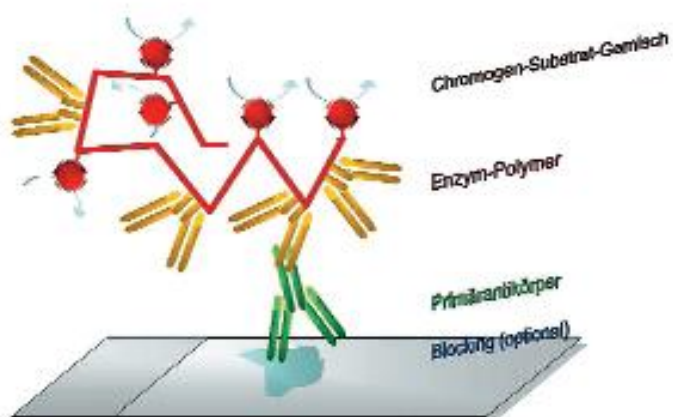
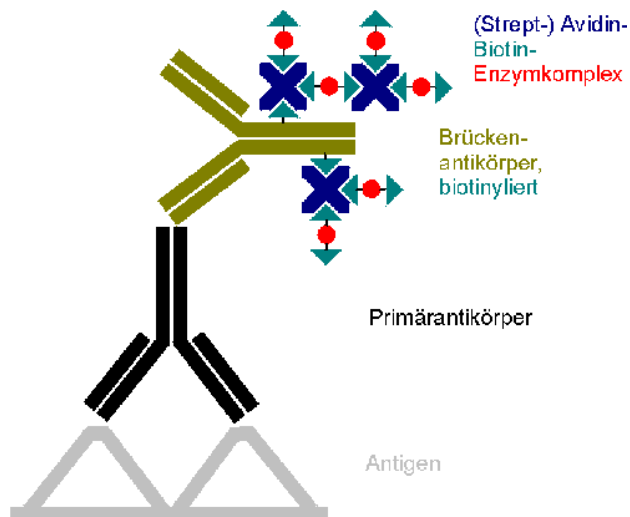


Abb. 2.6.2: Prinzip der immunhistochemischen Färbung von CK5 und CK7: analog zum Dextran-Polymer-basierten Verfahren werden die Primärantikörper von einem Sekundärantikörper-haltigen Polymer gebunden, an welches alkalische Phosphatase konjugiert ist. Bei Zugabe des Substrates erfolgt die katalysierte Färbung. (Quelle: aus dem Zytomed Systems GmbH Newsletter 01/2007)



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex ABC-Methode

Abb. 2.6.3: Illustration des Nachweises von Antigenen mittels der Avidin-Biotin-Complex-Methode, angewandt für die Her2-Darstellung. Im Gegensatz zu obiger Methode erfolgt hier die Zugabe eines Biotin-Enzym-Komplexes nach Zugabe des Sekundärantikörpers. Die Methode ist sehr spezifisch, allerdings zeitaufwändiger. (Quelle: www.pathologie-online.de)

2.6.2 Protokoll für die Immunhistochemie von EGFR

Entparaffinierung und Rehydrierung

- Waschen der Objektträger für zehn Minuten in frischer Xylol-Lösung.
- Waschen in Alkohollösungen absteigender Konzentration für je eine Minute: zweimal Ethanol 100 %, zweimal Ethanol 96 % und einmal Ethanol 70 %.
- Anschließend mehrmaliges Waschen in Aqua destillata

Färben der Gewebeprobe

- Gewebsschnitte 5 Minuten mit mindestens 100 µl Proteinase K bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend mit Aqua dest. spülen und 5 Minuten in ein Aqua dest.-Bad stellen

- Gewebsschnitte mit mindestens 100 µl Peroxidase-Block 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend mit Waschpuffer spülen und 5 Minuten in ein frisches Waschpufferbad stellen
- Die Objektträger in der feuchten Kammer mit Primärantikörper (mindestens 100 µl) 30 Minuten inkubieren, anschließend mit Waschpuffer spülen und 5 Minuten in Waschpufferbad stellen
- Auftragen des gelabelten Polymers (mind. 100 µl) und Inkubation in der feuchten Kammer 30 Minuten, anschließend Waschen wie in den vorherigen Schritten
- Auftragen der Substrat-Chromogen-Lösung (mindestens 100 µl) und Inkubation 10 Minuten in der feuchten Kammer, anschließend mit Aqua dest. spülen und 5 Minuten in ein Aqua dest.-Bad stellen

Gegenfärbung mit Hämatoxylin

- Inkubation in einem Hämatoxylin-Bad ("Dako's Hämatoxylin") 2-5 Minuten, anschließend Spülen mit Aqua dest. (wie oben beschrieben)

Konservieren mit Deckgläsern

- Konservieren der Präparate mittels Entellan und Deckgläsern

2.6.3 Protokoll für die Immunhistochemie von Her2

Demaskierung

- Die Objektträger zur Demaskierung der Primärantikörper-Bindungsstellen in Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 7,3 20 Minuten in einer Mikrowelle bei 300 W Leistung inkubieren

Entparaffinierung

- Waschen der Objektträger für 10 Minuten in frischer Xylol-Lösung
- Waschen in Alkohollösungen absteigender Konzentration für je eine Minute: zweimal Ethanol 100 %, zweimal Ethanol 96 % und einmal Ethanol 70 %
- Anschließend mehrmaliges Waschen in Aqua destillata

Färben der Gewebeproben

- Inkubation für 60 Minuten mit dem primären Antikörper gegen Her2/neu mit Diluent (Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:400
- Reinigen mit Waschpuffer (Ventana) 5 Minuten
- Inkubation für zehn Minuten mit biotinyliertem Sekundärantikörper
- Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels Peroxidase für 2 Minuten.
- Reinigen mit Waschpuffer für fünf Minuten
- Inkubation für 10 Minuten mit Enzymkonjugat HRP-Streptavidin
- Reinigen mit Waschpuffer für 5 Minuten
- Inkubation mit dem Chromogen DAB in einer Verdünnung von 1:50 für 5 Minuten

Gegenfärbung der Präparate

- Reinigen mit Aqua destillata für 5 Minuten
- Gegenfärbung mittels Hämalan für 1 Minute
- 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser reinigen
- Weiteres Waschen in absteigender Alkoholreihe von Xylol

Konservieren mit Deckgläsern

- Konservieren der Präparate mittels Entellan und Deckgläsern

2.6.4 Protokoll für die immunhistochemischen Färbungen von CK5 und CK7

Die Antigendemaskierung und Entparaffinierung der Gewebsschnitte erfolgte analog zur Färbung von Her2 (siehe oben).

Färben der Gewebeproben

- Inkubation für 60 Minuten mit dem Primärantikörper gegen CK5 bzw. CK7 in der jeweiligen Verdünnung (siehe oben)
- Waschen mit Waschpuffer 3 x 5 Minuten
- Auftragen eines Verstärkungsreagenz (PostBlock) für 20 Minuten
- Waschen mit Waschpuffer 3 x 5 Minuten
- Auftragen des AP-Polymers für 20 Minuten
- Waschen mit Waschpuffer 3 x 2 Minuten
- Auftragen des Substrates Neufuchsin
- Stoppen der Reaktion mit Aqua destillata bei gewünschter Färbeintensität

Gegenfärbung der Präparate

- Reinigen mit Aqua destillata für 5 Minuten
- Gegenfärbung mittels Hämalan für 1 Minute
- 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser reinigen
- Weiteres Waschen in absteigender Alkoholreihe von Xylol

Konservieren mit Deckgläsern

- Konservieren der Präparate mittels Entellan und Deckgläsern

2.6.5 Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien der Immunhistochemie

Die Gewebeproben wurden von drei Betrachtern, davon ein Pathologe, unabhängig von einander unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Färbung und Expressionsmuster ausgewertet. Es wurden sowohl die Intensität der Expression festgehalten, als auch das Ausmaß derselben als prozentualer Anteil Antigen-aufweisenden Gewebes der jeweiligen Gewebsstanze. Eine schwache Expression mit partieller Zellmembranfärbung wurde als "1+" klassifiziert, eine mittelstarke Expression mit schwacher bis mäßiggradiger Färbung der gesamten Zellmembran mit "2+". Eine starke Expression mit starker Anfärbung der gesamten Zellmembran wurde als "3+" eingestuft. Lag keine Expression bei einer Gewebeprobe vor, so dass sich die Zellmembran nicht anfärbte, wurde dies mit "0" bezeichnet.

Für die statistische Verwertung der Ergebnisse wurde das Produkt aus Färbeintensität und prozentualem Anteil betroffener Tumorzellen (Extensität der Färbung) gebildet. Für dieses Produkt wurde ein *Cut-off* festgelegt: bei einem Wert ≥ 80 wurde das entsprechende Tumorgewebe als "immunhistochemisch positiv" eingestuft. Ein Wert ≥ 120 wurde als starke Proteinexpression gewertet.

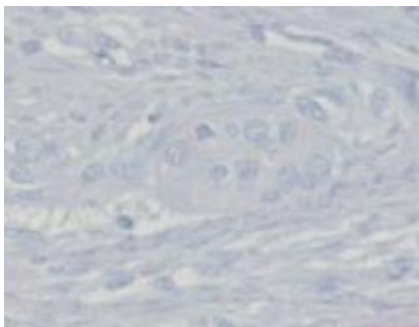


Abb. 2.6.4: Immunhistochemie zu CK5, Mukoepidermoidkarzinom, Färbeintensität "0".

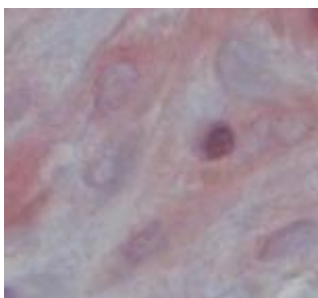


Abb. 2.6.5: Immunhistochemie zu EGFR, primär maligner Mischttumor, Färbeintensität "1+".

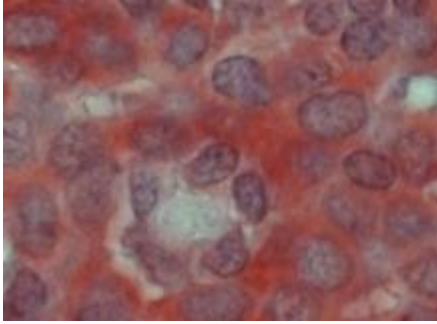


Abb. 2.6.6: Immunhistochemie zu EGFR, adenoid-zystisches Karzinom, Färbeintensität "2+", Zellen mit leichter bis mäßiger Anfärbung der gesamten Zellmembran.

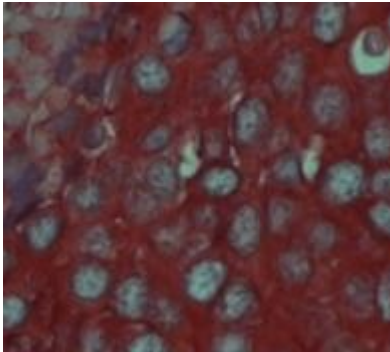


Abb. 2.6.7.: Immunhistochemie zu EGFR, duktales Adenokarzinom, Färbeintensität "3+", starke Anfärbung der gesamten Zellmembran.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS für Windows in der Version 12.0 (SPSS, Erkrath, Deutschland). Assoziationsanalysen dichotomisierter klinisch-pathologischer und zytogenetischer Faktoren wurden mit dem exakten Test nach Fisher durchgeführt und eine Signifikanz bei einem p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt. Ein p-Wert $\leq 0,001$ galt als hochsignifikant. Das Gesamtüberleben wurde als die Zeit vom Diagnosezeitpunkt an bis zum Tod des Patienten oder der letzten Lebensinformation definiert. Fälle inkompletten *Follow-up's* wurden als zensiert eingestuft unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der letzten Lebensinformation. Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse erstellt, wobei Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen mit Hilfe von log-rank-Tests untersucht wurden. Für multivariate Analysen wurde ein Cox-Regressionsmodell verwendet, in das Faktoren mit einem p-Wert $\leq 0,05$ in der univariaten Analyse eingeschlossen wurden. Nicht signifikante Faktoren in dieser multivariaten Betrachtung wurden schrittweise aus dem Modell bei einem p-Wert $>0,1$ eliminiert. Bei jedem Schritt erfolgte eine Neubewertung der einbezogenen Faktoren.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Tumormaterials

3.1.1 Klinische Daten zu den Tumoren der untersuchten Speicheldrüsenkarzinomsammlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 289 Speicheldrüsenkarzinome untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Entitäten unterscheiden. Tabelle 3.1.1 stellt die einzelnen Tumorentitäten der Sammlung mit ihrer jeweiligen Anzahl zusammen. Die häufigsten Tumortypen waren das Adenoid-zystische Karzinom (16,6%), das Mukoepidermoidkarzinom (14,9%) sowie das Azinuszellkarzinom (14,2%), gefolgt vom Adenokarzinom NOS (12,8%) und vom duktalem Adenokarzinom (10,7%).

138 Patienten waren männlich (47,8%), 151 weiblich (52,2%). Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 60,6 Jahren, wobei die Spannweite (*Range*) bei 88 Jahren lag, da die jüngste Patientin des Kollektivs bereits mit 11 Jahren an einem Mukoepidermoidkarzinom erkrankt ist.

In 202 (69,9%) Fällen war die *Glandula parotidea* betroffen, während die *Glandula submandibularis* und die kleinen Speicheldrüsen der Mundhöhle in 42 (14,5%) bzw. 44 (15,2%) Fällen betroffen waren, die *Glandula sublingualis* hingegen nur in einem Fall.

Jeweils mehr als zwei Drittel der Fälle von Azinuszellkarzinomen (68,3%) und von Mukoepidermoidkarzinomen (69,8%) sowie 58,6% aus der Gruppe sonstiger niedrigmaligner Karzinome (siehe Tabelle 3.1.1) lagen in einem frühen Stadium (Stadium I oder II) vor, während insbesondere beim duktalem Adenokarzinom 80,6%, beim Adenokarzinom NOS 78,4% und in der Gruppe sonstiger hochmaligner Speicheldrüsenkarzinome 82,4% fortgeschrittene Tumorstadien (Stadium III oder IV) aufwiesen. Ebenso verhält es sich mit dem *Grade*, das bei Azinuszellkarzinomen und Mukoepidermoidkarzinomen in deutlich über 60% G1 war. Andere, in einer Gruppe zusammengefasste Tumoren wie die epithelial-myoeptithelialen Karzinome, die polymorphen low grade Adenokarzinome oder die Basalzelladenokarzinome waren in 86,2% *low grade* (G1) im Gegensatz zu den Plattenepithelkarzinomen, duktalem Adenokarzinomen, Adenokarzinomen NOS und anderen

hochmalignen Tumoren wie dem undifferenzierten Karzinom, dem rhabdoiden Karzinom oder dem primär malignen Misch tumor, die alle überwiegend den Tumordifferenzierungsgrad G3 aufwiesen. Das Plattenepithelkarzinom hatte in 44% *Grade* G2. Auch das adenoid-zystische Karzinom wies in 72,9% G2 auf, so dass es ebenso überwiegend entdifferenzierter war als andere niedrigmaligne Tumoren.

Tumorentität	n
Adenoid-zystisches Karzinom	48
Azinuszellkarzinom	41
Mukoepidermoidkarzinom	43
Sonstige niedrigmaligne Tumoren: polymorphes low-grade Adenokarzinom, Basalzelladenokarzinom, epithelial- myoepitheliales Karzinom, sebaziöses Karzinom, Zystadenokarzinom	29
Adenokarzinom NOS	37
Duktales Adenokarzinom	31
Myoepitheliales Karzinom	18
Plattenepithelkarzinom	25
Sonstige hochmaligne Tumoren: undifferenziertes Karzinom, onkozytäres Karzinom, primär maligner Misch tumor, rhabdoides Karzinom, kleinzelliges Karzinom	17

Insgesamt verstarben 109 (37,7%) Patienten bei einem maximalen Beobachtungszeitraum (*Follow-Up*) von 8941 Tagen (298 Monate). Die mittlere Überlebenszeit betrug 156 Monate (Konfidenzintervall [CI] 134 Monate, 178 Monate). Am schlechtesten war das durchschnittliche Überleben beim Plattenepithelkarzinom mit 48,2 Monaten (CI 25,6 Monate, 70,8 Monate) und in der Gruppe der sonstigen hochmalignen Tumoren mit 58,4 Monaten (CI 31,1 Monate, 85,7 Monate), gefolgt vom duktalem Adenokarzinom mit 63,7 Monaten (CI 45,9 Monate, 81,5 Monate). Das beste durchschnittliche Überleben fand sich beim Azinuszellkarzinom mit 207,3 Monaten (CI 178,1 Monate, 236,5 Monate), gefolgt vom adenoid-zystischen Karzinom mit 179 Monaten (CI 137,1 Monate, 220,9 Monate).

Tabelle 3.1.1: untersuchtes Tumormaterial

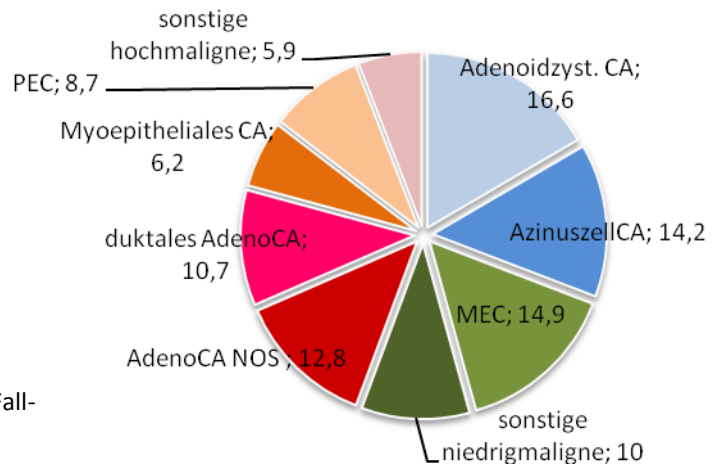


Diagramm 3.1.1: Verteilung der Tumoren der Fall-Sammlung in Prozent

3.1.2 Klinische Daten zu den untersuchten Mukoepidermoidkarzinomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von den insgesamt 43 Mukoepidermoidkarzinomen 40 zur genaueren Untersuchung ausgewählt. In den anderen Fällen war die Datenlage, zumindest hinsichtlich der Immunhistochemie bzw. der FISH-Untersuchung, nicht ausreichend gewesen. 24 (60%) Tumoren waren der *Glandula parotidea*, 4 (10%) Tumoren der *Glandula submandibularis* und 12 Karzinome den kleinen Speicheldrüsen der Mundhöhle zuzuordnen. 13 MECs (32,5%) waren bei Männern, 27 (67,5%) bei Frauen diagnostiziert worden. Das mittlere Alter zum Diagnosezeitpunkt lag bei 51 Jahren (11-94 Jahre). Unter Berücksichtigung der WHO-Kriterien³⁴ zum *Grading* waren 27 (67,5%) Karzinome *low grade* (G1), 3 (7,5%) *intermediate grade* (G2) und 10 (25%) Fälle *high grade* (G3). Das mittlere *Follow-up* betrug 64,5 Monate (1,6-224 Monate). 10 (25%) Patienten verstarben an ihrem Mukoepidermoidkarzinom nach einem durchschnittlichen Zeitraum von 25,2 Monaten (1,6-70,9 Monate).

Der klassische Subtyp des MEC war mit 23 Fällen (57,5%) die häufigste vorkommende Form, während das squamoide MEC mit 9 Fällen (22,5%), das eosinophile MEC mit 5 Fällen (12,5%) und das klarzellige MEC mit 3 Fällen (7,5%) vertreten waren. Die drei Subtypen werden als variante Formen des MEC bezeichnet. Ihre histologische Beschreibung folgt in Abschnitt 3.4.1.

Der häufigste Subtyp des MECs (siehe unten), der *klassische Typ*, war signifikant mit einem Alter ≤ 60 Jahren ($p = <0,001$), einem *Grade* G1 ($p = <0,001$) und der Translokation t(11;19) ($p = 0,003$) assoziiert ist.

3.2 Allgemeine Prognosefaktoren der Speicheldrüsenkarzinome bei univariater Betrachtung

Die Tumoren in der hier vorliegenden Tumorsammlung lassen sich in niedrig- und hochmaligne unterteilen, abgeleitet von den klinischen Erfahrungen, dem Tumorwachstum, dem Metastasierungspotential, der Beeinflussung des Gesamtüberlebens etc. Hierbei lassen sich das adenoid-zystische Karzinom, das Azinuszellkarzinom, das polymorphe *low-grade* Adenokarzinom, das Basalzelladenokarzinom, das epithelial-myoepitheliale Karzinom und das Zystadenokarzinom sowie das sebaziöse Karzinom ersterer, das Adenokarzinom NOS, das duktales Adenokarzinom, das myoepitheliale Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, das undifferenzierte Karzinom, das onkozytäre Karzinom, das rhabdoide Karzinom, das kleinzellige Karzinom und der primär maligne Misch tumor der zweiten Gruppe zuordnen. Entsprechend zeigen sich unterschiedliche Überlebenskurven bei einem mittleren Überleben von 95,4 Monate (CI 64,5 Monate, 126,3 Monate) in der hochmalignen Gruppe gegenüber einem durchschnittlichen Überleben von 196,6 Monaten (CI 168,3 Monate, 225,0 Monate) in der niedrigmalignen ($p < 0,001$). Hochmaligne Tumoren waren hochsignifikant mit einer Tumorgraduierung $> G1$ assoziiert ($p < 0,001$). 8 Tumoren (6,3%) der hochmalignen Karzinome waren G1-Tumoren. Von den niedrigmalignen Tumoren hatten 32 (19,9%) eine Tumorgraduierung G3. Wie bereits bekannt, gibt es bei den Mukoepidermoidkarzinomen hoch- und niedrigmaligne Formen.³⁴ Entsprechend fanden sich in der vorliegenden Untersuchung der 40 Mukoepidermoidkarzinome aus der Tumorsammlung in 10 Fällen (25%) schlechte Verlaufsformen mit letalem Ausgang.

Hinsichtlich des Geschlechtes zeigen Frauen einen hochsignifikanten Überlebensvorteil ($p = 0,004$) mit einem mittleren Überleben von 192,8 Monaten (CI 167,5 Monate, 218,1 Monate) gegenüber den Männern mit 113,6 Monaten (CI 91,3 Monate, 136,0 Monate). Frauen weisen hochsignifikant häufiger niedrigmaligne Tumorentitäten auf ($p = 0,001$). Am

deutlichsten wird der Geschlechterunterschied beim Plattenepithelkarzinom, bei welchem 84% der Patienten männlich und 16% weiblich waren (n=25).

Ein weiterer Unterschied ergibt sich bei Betrachtung der Tumorlokalisation. Bei den Tumoren der großen Speicheldrüsen zeigte sich ein mittleres Überleben von 140,6 Monaten (CI 115,2 Monate, 166,0 Monate), bei den Tumoren der kleinen Drüsen waren es hingegen 217,8 Monate (CI 173,3 Monate, 262,3 Monate; $p=0,005$).

Hochsignifikant schlechter stellt sich das Überleben für Patienten mit einem Alter über 60 Jahren bei Erstdiagnose dar ($p<0,001$). Dieses lag im Mittel bei 89,1 Monaten (CI 70,5 Monate, 107,8 Monate) im Gegensatz zu 218,3 Monaten (CI 187,2 Monate, 249,5 Monate) bei den unter 60-jährigen.

Bei Vorliegen von Tumorstadium III oder IV ist das mittlere Überleben mit 113,8 Monaten (CI 87,1 Monate, 140,5 Monate) gegenüber 204,7 Monaten (CI 175,1 Monate, 234,2 Monate) bei Stadium I und II hochsignifikant verkürzt ($p<0,001$).

Ebenso verkürzt sich das durchschnittliche Überleben bei einem *Grade* G2 oder G3 auf 125,7 Monate (CI 103,1 Monate, 148,2 Monate) gegenüber 234,5 Monate (CI 199,8 Monate, 269,1 Monate) bei G1 hochsignifikant ($p<0,001$).

Grafik 3.2.1 stellt die Überlebenskurven der untersuchten Faktoren zusammen. Diese werden in Abschnitt 3.2.6 multivariat untersucht.

Tumor	Geschlecht m vs. w	Mittleres Alter bei Diagnose in Jahren (Spannbreite)	Lokalisation große vs. kleine Drüsen	Tod, sicher tumor- bedingt	Mittleres Gesamt- überleben in Montaten (95%-CI)	Durchschnitt- liche Zeit von der Diagnose bis zum Tod in Monaten (95%-CI)
Adenoidzyst. Karzinom	16 (33,3%) 32 (66,7%)	60,0 (30;98)	34 (70,8%) 14 (29,2%)	9 (18,8%)	179 (137,1; 220,9)	28,9 (0; 105,8)
Azinuszell- karzinom	15 (36,6%) 26 (63,4%)	52,8 (29;89)	39 (95,1%) 2 (4,9%)	2 (4,9%)	207,3 (178,1; 236,5)	108,8 (37,9;179,6)
MEC*	15 (34,9%) 28 (65,1%)	51,4 (11;94)	29 (67,4%) 14 (32,6%)	10 (23,3%)	158,5 (127,3; 129,7)	25,2 (1,6;70,9)
Sonstige niedrigmaligne Tumoren (s.o.)	15 (34,9%) 28 (65,1%)	59,9 (31;99)	20 (69,0%) 9 (31,0%)	2 (6,9%)	132,9 (104,6; 161,3)	27,4 (13,2;41,6)
Adenokarzinom NOS	24 (64,9%) 13 (35,1%)	62,5 (21;86)	34 (91,9%) 3 (8,1%)	11 (29,7%)	143,2 (92,9; 193,4)	18,1 (10,5;31,3)
Duktales Adenokarzinom	15 (48,4%) 16 (51,6%)	68,3 (34;91)	30 (96,8%) 1 (3,2%)	7 (22,6%)	63,7 (45,9; 81,5)	25,2 (8,2;53,1)
Myoepitheliales Karzinom	8 (44,4%) 10 (55,6%)	62,6 (34;88)	17 (94,4%) 1 (5,6%)	5 /27,8%)	112,7 (70,4; 155,0)	12,7 (0,5;39,9)
Plattenepithel- karzinom	21 (84,0%) 4 (16,0%)	73,8 (15;94)	25 (100%) 0	6 (24%)	48,2 (25,6; 70,8)	15,4 (2,4;30,3)
Sonstige hochmaligne Tumoren (s.o.)	10 (58,8%) 7 (41,2%)	66,3 (39;88)	17 (100%) 0	6 (35,3%)	58,4 (31,1; 85,7)	24,0 (2,8;101,4)

* Die Zahlen bei den MEC sind auf die Fallzahl n=43 bezogen. Daher weichen die Daten von denjenigen der Untersuchung der 40 MECs ab.

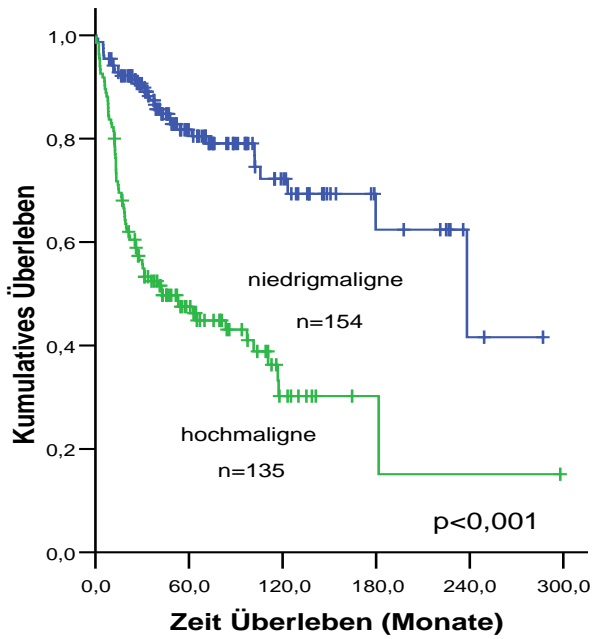
Tabelle 3.2.1: Dargestellung einiger klinischer Daten der untersuchten Tumoren. Die Aufschlüsselung der Gruppen der sonstigen hoch-/niedrigmalignen Tumoren ist Tabelle 3.1.1 zu entnehmen.

Tumor	Tumorgraduierung			Stadium			
	G1	G2	G3	I	II	III	IV
Adenoidzyst. Karzinom	3 (6,3%)	35 (72,9%)	10 (20,8%)	9 (19,1%)	12 (25,5%)	10 (21,3%)	16 (34,0%)
Azinuszellkarzinom	28 (68,3%)	6 (14,6%)	7 (17,1%)	19 (46,3%)	9 (22,0%)	9 (22,0%)	4 (9,8%)
MEC*	28 (65,1%)	4 (9,3%)	11 (25,6%)	17 (39,5%)	13 (30,2%)	7 (16,3%)	6 (14,0%)
Sonstige niedrigmaligne Tumoren (s.o.)	25 (86,2%)	0	4 (13,8%)	8 (27,6%)	9 (31,0%)	7 (24,1%)	5 (17,2%)
Adenokarzinom NOS	2 (5,4%)	5 (13,5%)	30 (81,1%)	5 (13,5%)	3 (8,1%)	8 (21,6%)	21 (56,8%)
Duktales Adenokarzinom	1 (3,3%)	1 (3,3%)	29 (93,5%)	3 (9,7%)	3 (9,7%)	4 (12,9%)	21 (67,7%)
Myoepitheliales Karzinom	4 (22,2%)	6 (33,3%)	8 (44,4%)	2 (11,1%)	5 (27,8%)	6 (33,3%)	5 (27,8%)
Plattenepithel- karzinom	1 (4,0%)	11 (44,0%)	13 (52,0%)	2 (8,3%)	7 (29,2%)	7 (29,2%)	8 (33,3%)
Sonstige hochmaligne Tumoren (s.o.)	0	0	17 (100,0 %)	2 (11,8%)	1 (5,9%)	5 (29,4%)	9 (52,9%)

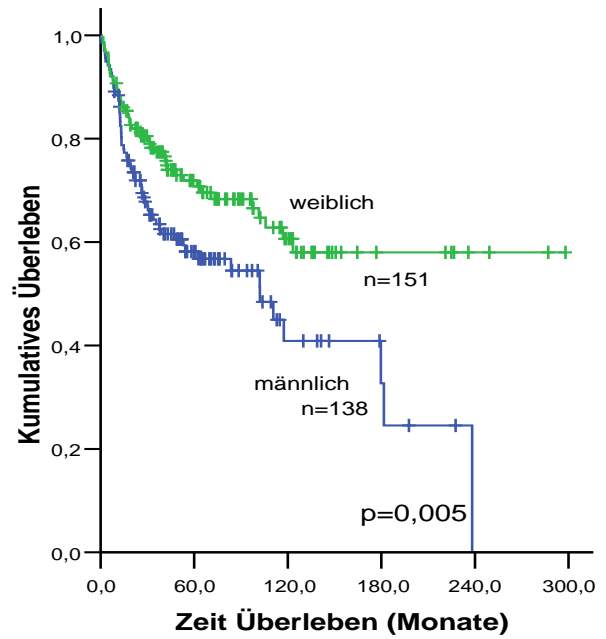
* Die Zahlen bei den MEC sind auf die Fallzahl n=43 bezogen. Daher weichen die Daten von denjenigen der Untersuchung der 40 MECs ab.

Tabelle 3.2.2: Tumordifferenzierungsgrad und UICC-Tumorstadium der jeweiligen Tumoren

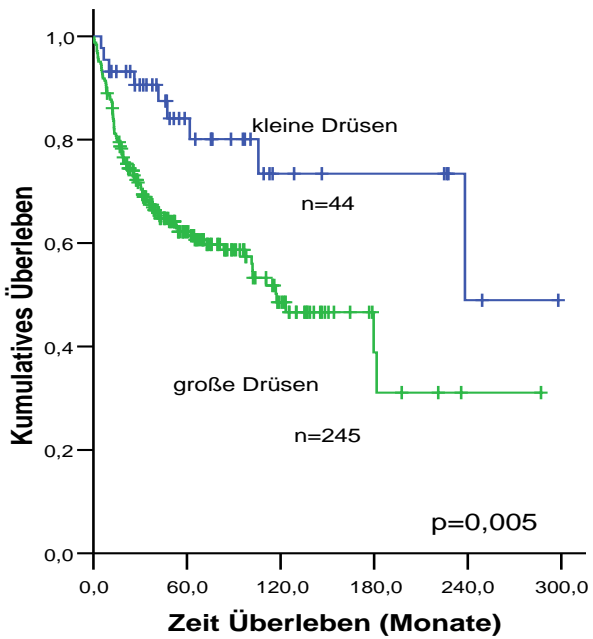
Hochmaligne vs. niedrigmaligne



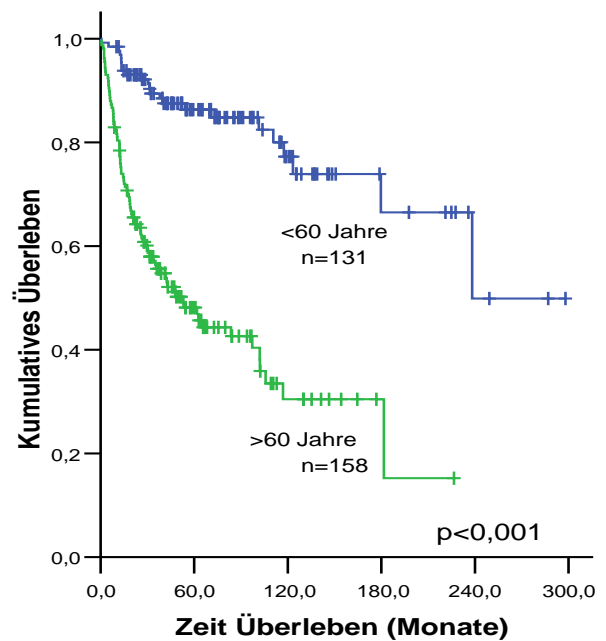
Geschlecht

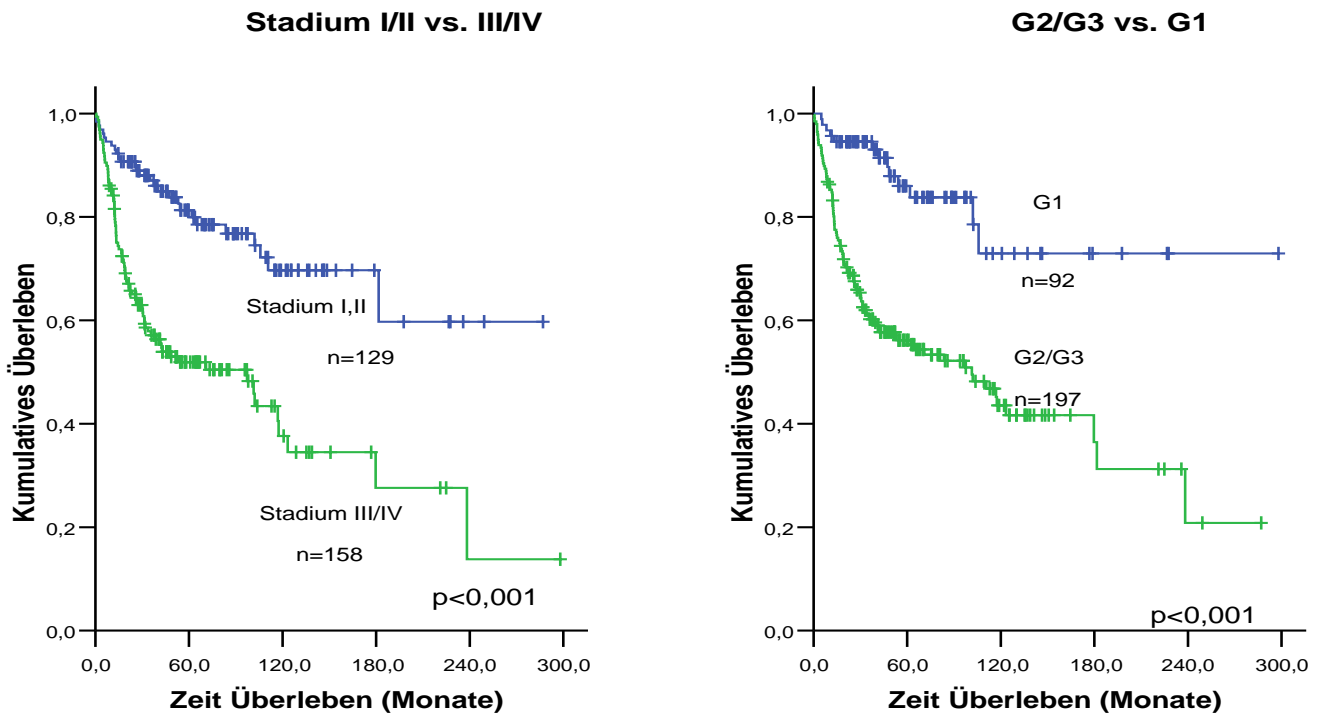


Lokalisation



Alter





Grafik 3.2.1: Kaplan-Meier-Diagramme zur Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit von den untersuchten Faktoren mit jeweiliger Angabe der Fallzahl (n) sowie der Signifikanzwerte (p)

3.3 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich EGFR und Her2

3.3.1 Beschreibung des mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie erhobenen EGFR- und Her2-Status der Speicheldrüsenkarzinome

a) EGFR

Von den 289 Speicheldrüsentumoren konnten 255 (88,2%) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bezüglich des EGFR-Status untersucht werden. In den anderen Fällen war dies entweder aufgrund fehlenden Tumormaterials in der Stanze, wegen mangelnder Hybridisierung mit der Gensonde oder aufgrund zu dichten Gewebes und konsekutiv nicht einwandfreier mikroskopischer Auswertbarkeit nicht möglich. In 51 der untersuchten Fälle (20,0%) zeigte sich ein positives Ergebnis im Sinne einer Trisomie oder hochgradigen Polysomie, d.h. mehr als 50% der Zellen der jeweiligen Tumoren waren entsprechend bezüglich des EGFR-Gen tragenden Chromosom 7 aberriert. 21 Fälle (8,2%) waren hierbei trisom. Bei insgesamt niedriger Fallzahl lag keine eindeutige Präferenz eines Tumortyps vor.

Tendenziell war das Plattenepithelkarzinom mit 12,5% (3/24 Fälle positiv) eher betroffen als andere Entitäten. Als hochgradige Polysomie wurde eine Vervielfachung des zugrundeliegenden Chromosoms auf mindestens das Vierfache der Norm angesehen. 30 Fälle waren hochgradig polysom (11,8%). Diagramm 3.3.2 veranschaulicht, dass dies beim Azinuszellkarzinom und dem adenoid-zystischen Karzinom nicht bzw. beim Mukoepidermoidkarzinom und bei anderen in einer Gruppe subsumierten niedrigmalignen Tumoren kaum der Fall ist, signifikant häufig ($p < 0,001$) hingegen bei den hochmalignen Tumoren insgesamt.

Trisomie Chromosom 7

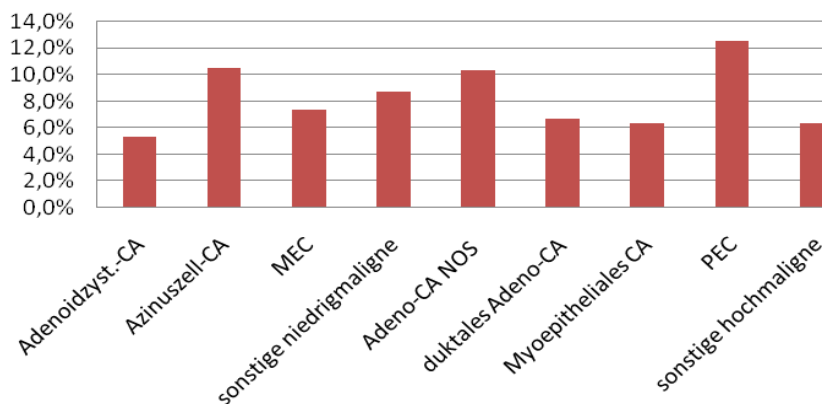


Diagramm 3.3.1: Prozentuale Anteile Chr.7-trisomer Fälle an den untersuchten Tumoren

hochgradige Polysomie Chr. 7

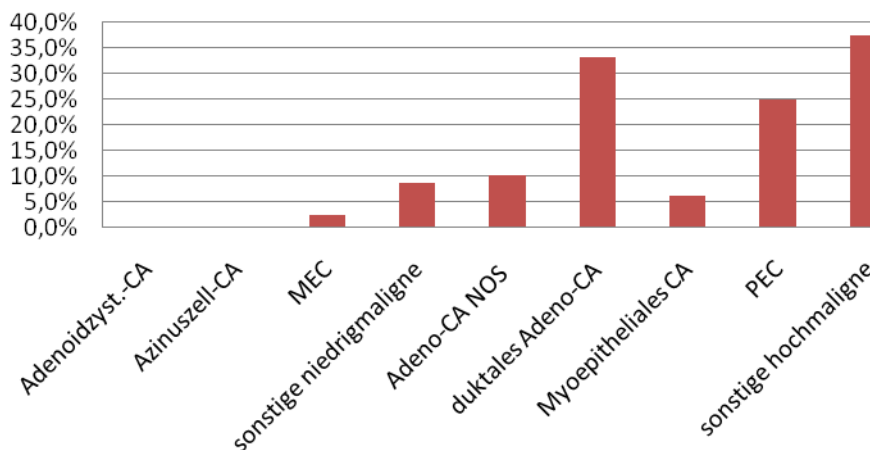


Diagramm 3.3.2: Prozentuale Anteile Chr.7-hochpolysomer Fälle an den untersuchten Tumoren

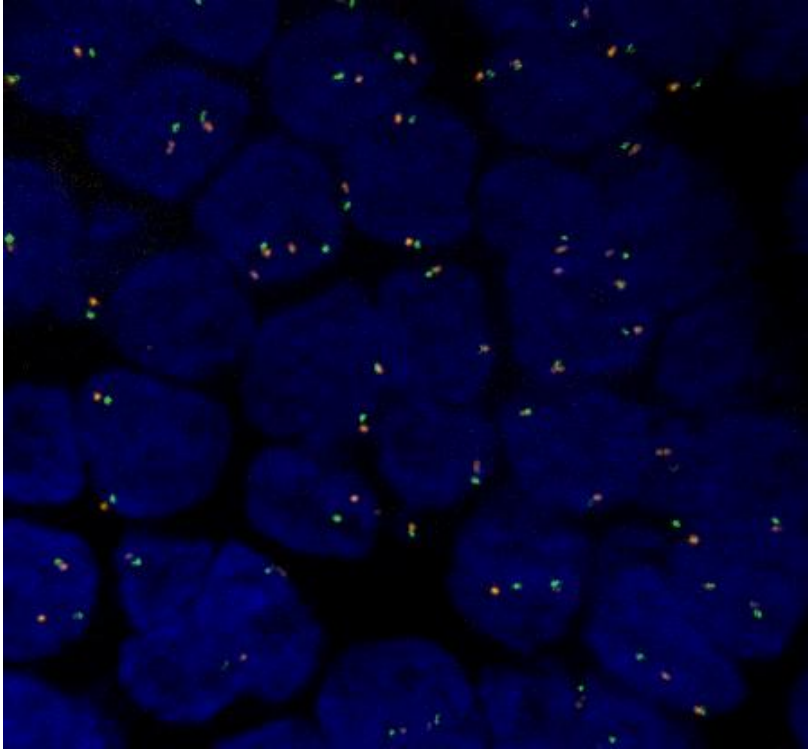


Abb.3.3.1: Normalbefund des EGFR-Genstatus mit Disomie von Chromosom 7.

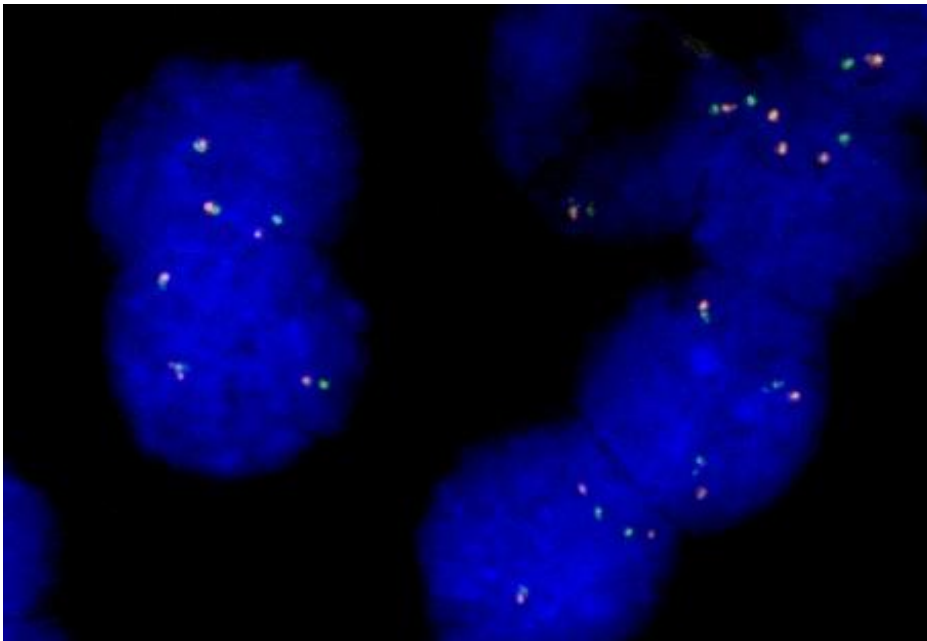


Abb.3.3.2: Trisomie von Chromosom 7 bei einem MEC.

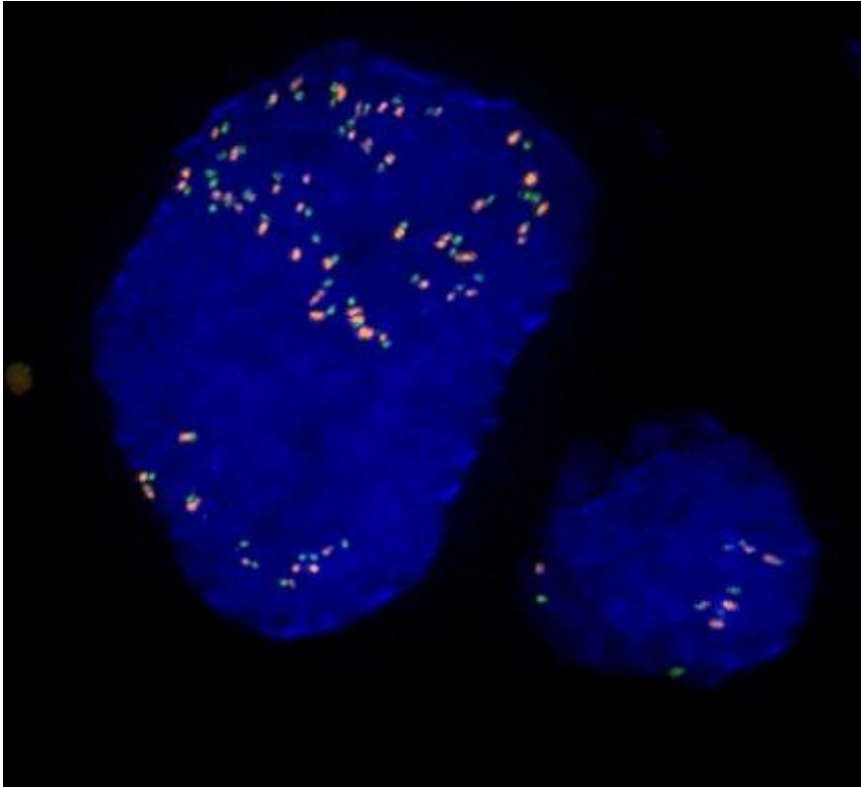


Abb. 3.3.3: Hochgradige Polysomie von Chromosom 7 bei einem duktalem Adenokarzinom.

Eine Amplifikation des EGFR-Genes ließ sich in 5 Fällen (1,9%) nachweisen. Hierbei waren ausschließlich hochmaligne Tumoren betroffen, darunter ein *high Grade* MEC (G3). Bei einem Tumor (duktales Adenokarzinom) lag eine Clusteramplifikation vor, der Tumordifferenzierungsgrad war dabei G3 bei einem Tumorstadium III.

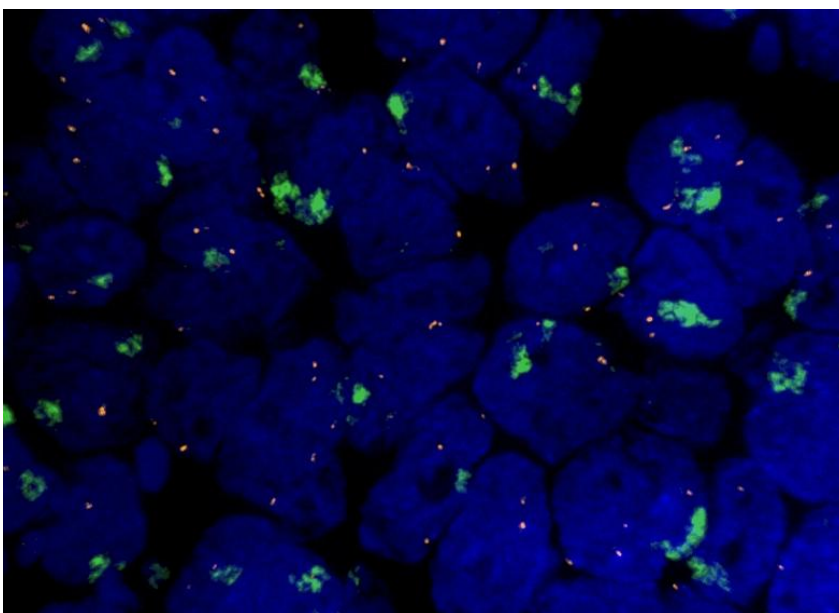


Abb.3.3.4: Duktales Adenokarzinom mit Clusteramplifikation des EGFR-Genes: die grünen Gensignale sind bei regelrechten Centromersignalen (orange) stark vervielfacht.

267 Tumoren (92,4%) konnten immunhistochemisch bezüglich EGFR untersucht werden, wobei 64 Fälle davon (24,0%) eine positive Immunhistochemie gemäß der oben aufgeführten Kriterien zeigten (siehe unter "Material und Methode", Abschnitt 2.6.5). Für 53 der immunhistochemisch positiven Fälle lagen auch FISH-Ergebnisse bezüglich EGFR vor. Hierbei konnte für 19 (35,8%) Fälle ein positiver Status bezüglich Trisomie oder höherer Polysomie von Chromosom 7 festgestellt werden. Zwei Fälle zeigten eine Amplifikation des EGFR-Genes. Diagramm 3.3.3 zeigt den Anteil positiver immunhistochemischer Befunde bei den unterschiedlichen Tumorentitäten. Von den Azinuszellkarzinomen lag keine positive Immunhistochemie vor, während Plattenepithelkarzinome mit 45,5% am häufigsten positiv waren. MECs zeigten in 36,8% Positivität. Insgesamt war eine EGFR-Epression in der Immunhistochemie bei den hochmalignen Tumoren signifikant häufiger ($p=0,021$) als bei Tumoren der niedrigen Malignitätsgruppe.

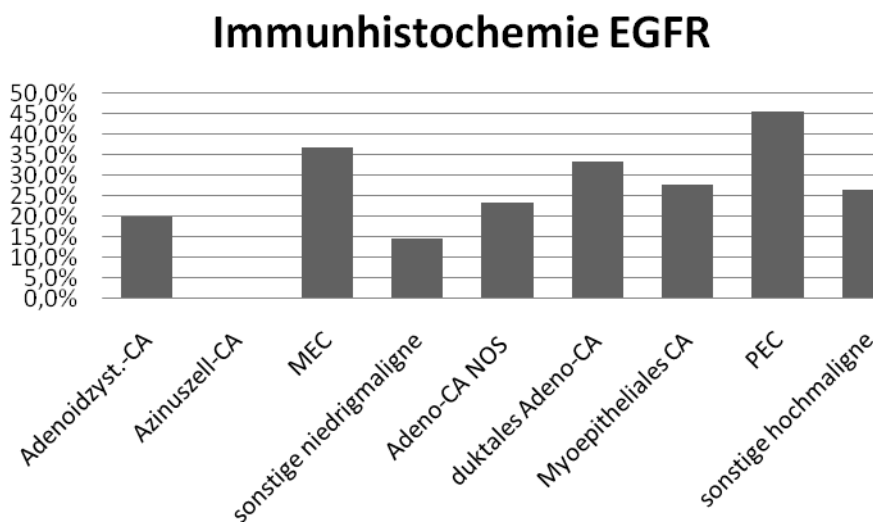


Diagramm 3.3.3: Prozentuale Anteile immunhistochemisch positiver Fälle an den untersuchten Tumoren

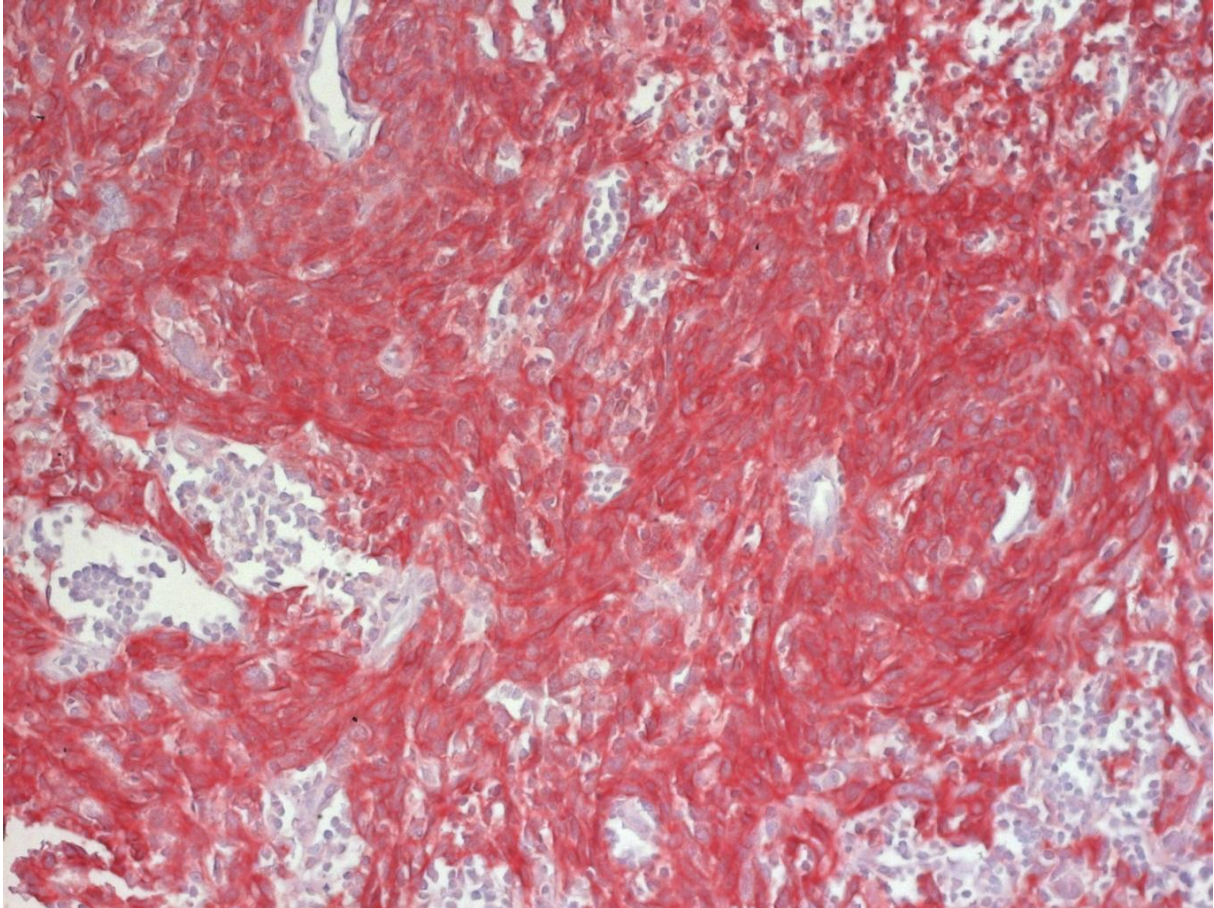


Abb. 3.3.5: Positive EGFR-Immunhistochemie eines myoepithelialen Karzinoms. Färbeintensität "2+".

b) Her2

In 265 Fällen (91,7%) konnten mittels FISH Ergebnisse bezüglich des Her2-Status erhoben werden. Hierbei fand sich in 30 Fällen (11,3%) eine numerisch Aberration bezüglich des Her2 zugrunde liegenden Chromosoms 17 im Sinne einer Tri- (13 Fälle, 4,9%) oder hochgradigen Polysomie (17 Fälle, 6,4%). Wie Diagramm 3.3.4 zu entnehmen ist, verteilten sich die trisomen Fälle nahezu ausschließlich auf Tumoren des hochmalignen Spektrums mit Ausnahme einiger Fälle in der niedrigmalignen Gruppe. Ebenso fanden sich höhere Polysomien nur bei hochmalignen Tumoren. Zudem zeigte sich bei einem Fall eines squamoiden Mukoepidermoidkarzinoms eine hochgradige Polysomie, doch war auch dieses mit Tumorstadium III und *Grade* G3 als hochmaligne einzustufen.

Trisomie Chromosom 17

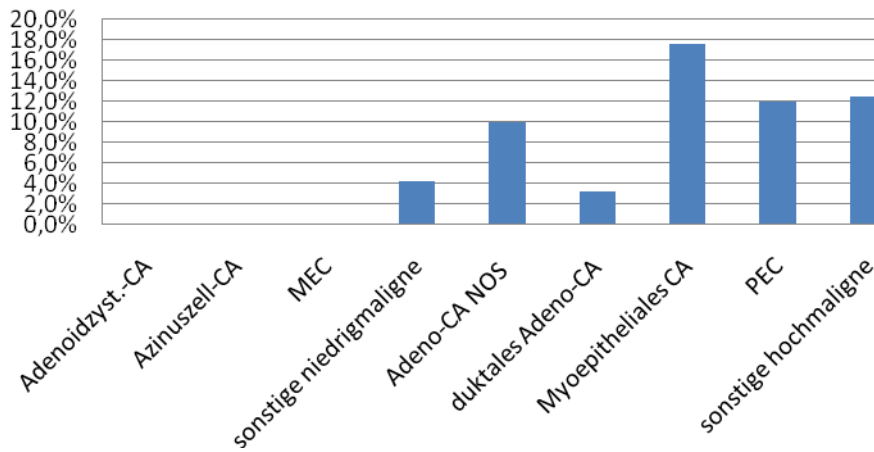


Diagramm 3.3.4: prozentuale Anteile Chr.17-trisomer Fälle an den untersuchten Tumoren

hochgradige Polysomie Chr. 17

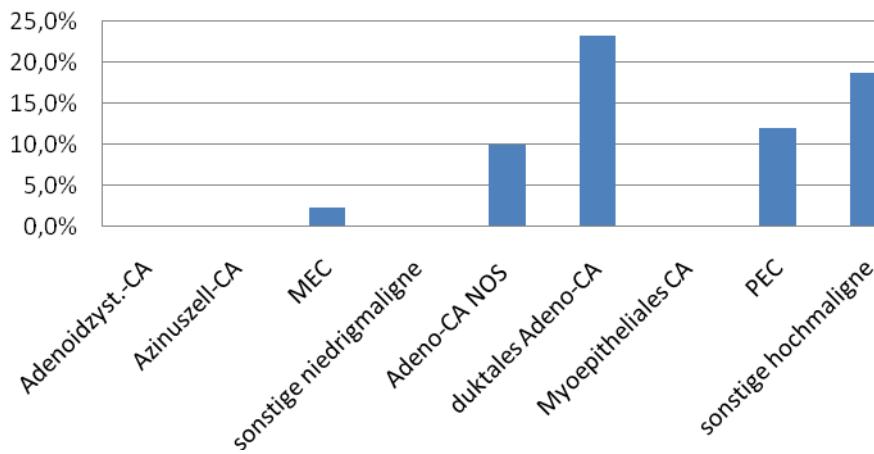


Diagramm 3.3.5: prozentuale Anteile Chr.17-hochpolysomer Fälle an den untersuchten Tumoren

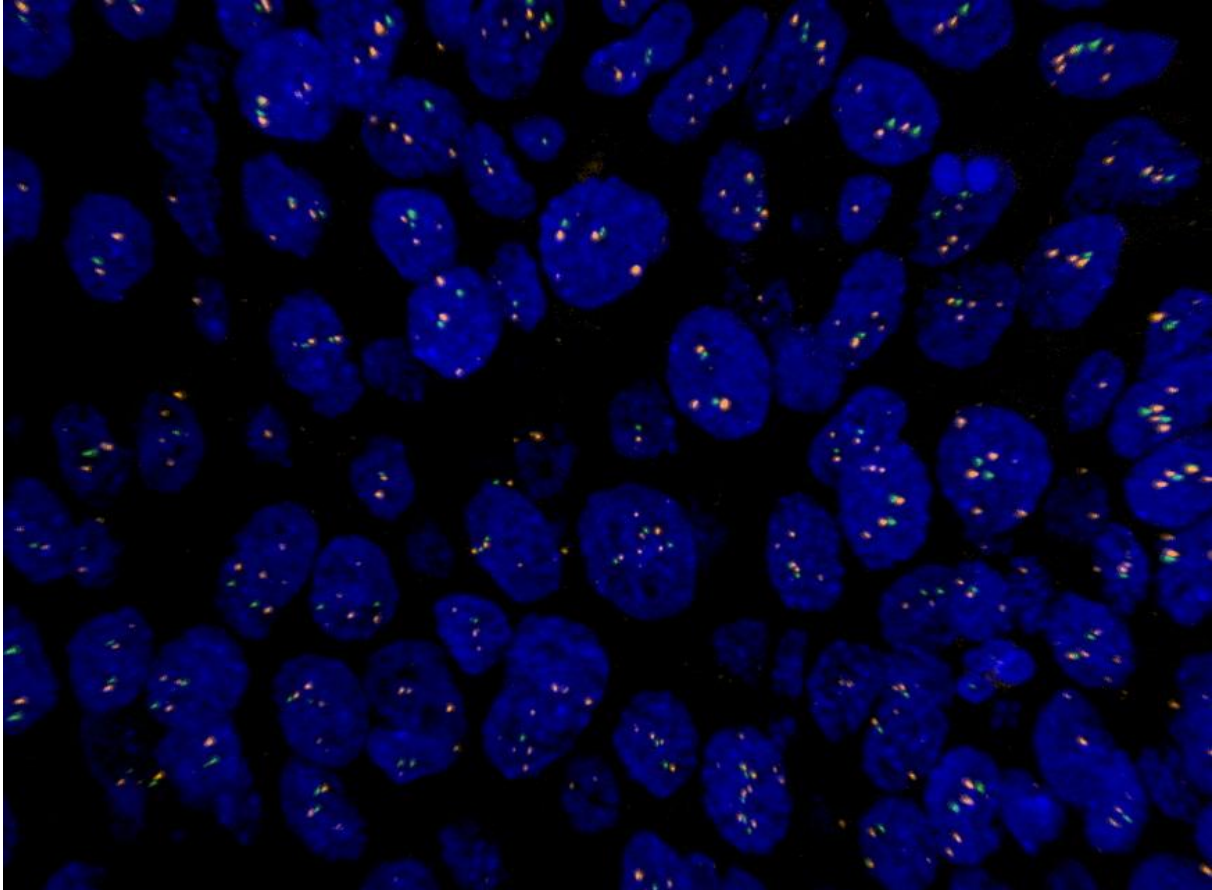


Abb. 3.3.6: Hochgradige Polysomie von Chromosom 17: die Centromersignale (orange) sind deutlich vervielfacht.

Für das Her2-Gen fand sich in 20 (7,5%) Fällen eine Amplifikation. 12 Fälle (4,5%) zeigten dabei eine Clusteramplifikation mit einer Gen/Centromer-*Ratio*, die in der Regel bei über 10 lag. 66,7% der Clusteramplifikationen betrafen duktale Adenokarzinome. Umgekehrt wiesen 36,7% der dukталen Adenokarzinome eine Genamplifikation auf. Ein Drittel der Tumoren mit Clusteramplifikation hatte zugleich eine numerische Aberration des Chromosom 17: davon zeigte ein Fall eines Adenokarzinoms NOS eine Trisomie, drei Fälle dukталer Adenokarzinome zugleich eine hochgradige Polysomie.

Amplifikation Her2

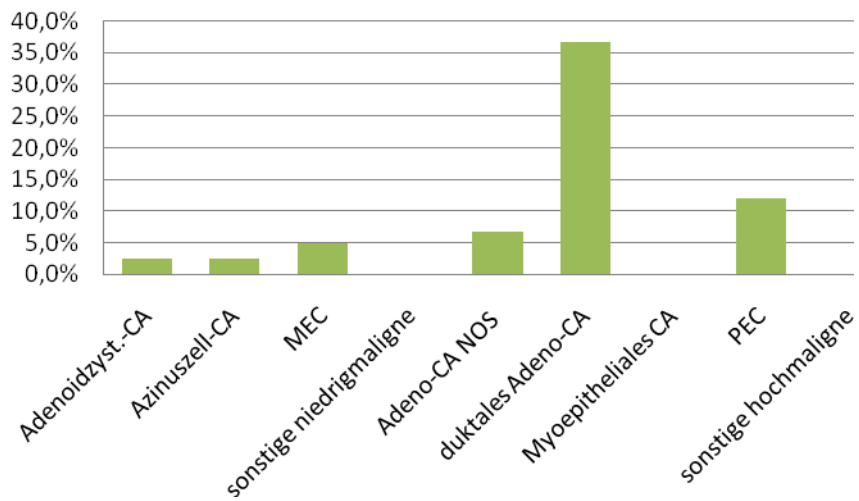


Diagramm 3.3.6: Prozentuale Anteile von Genamplifikationen von Her2 an den untersuchten Tumoren

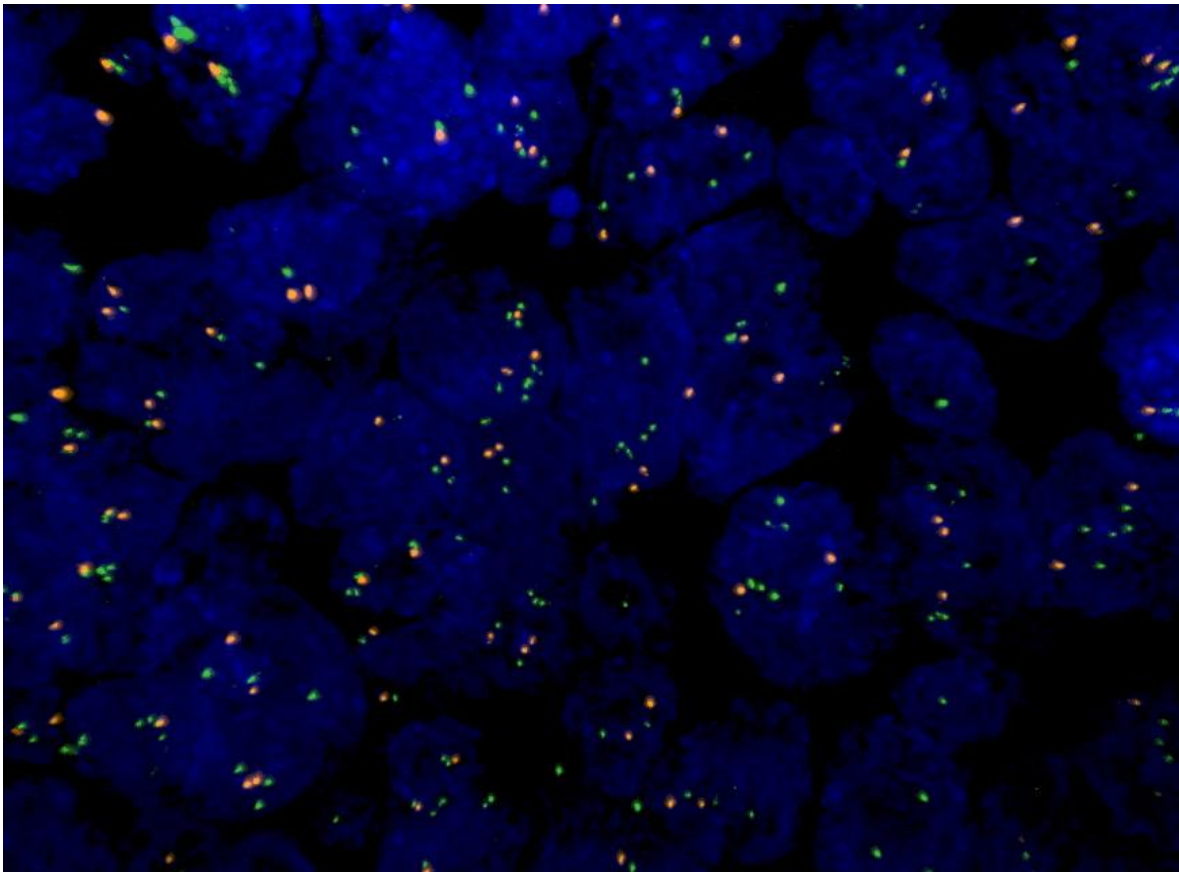


Abb.3.3.7: Genamplifikation von Her2 bei einem duktalem Adenokarzinom.

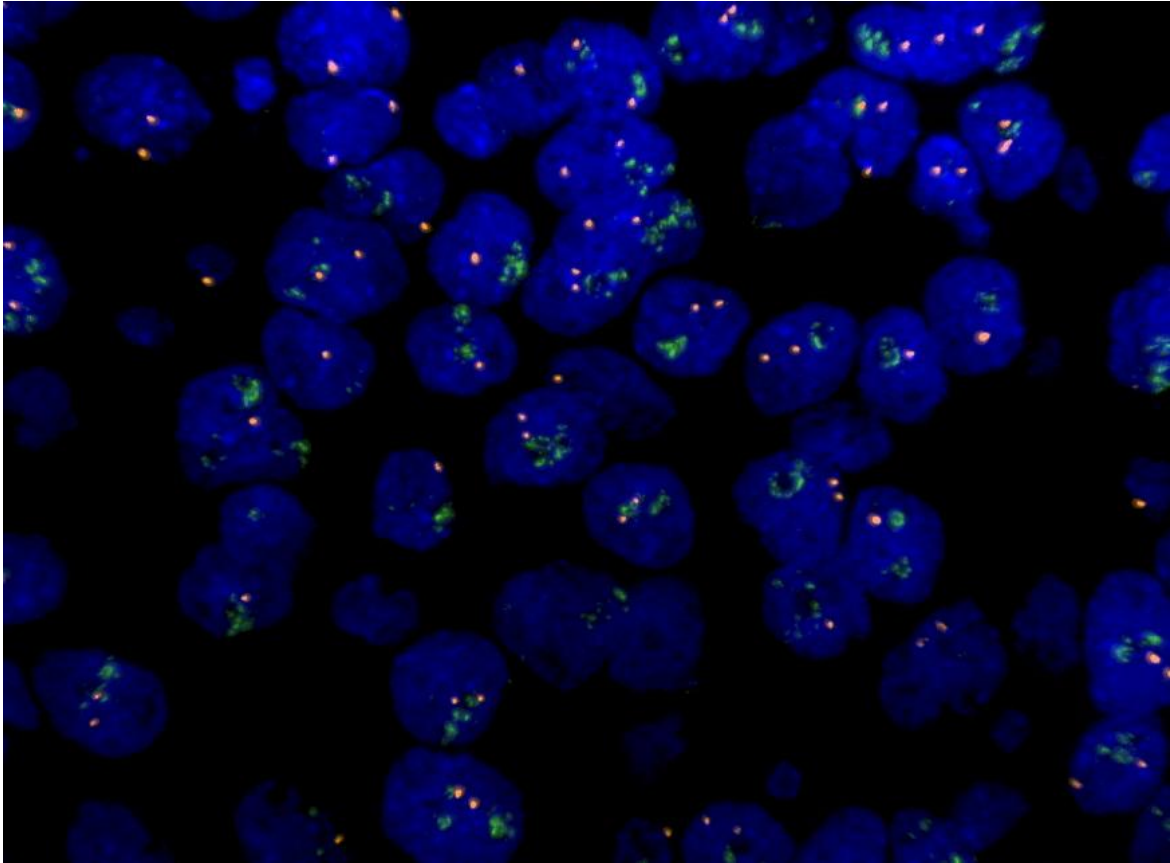


Abb. 3.3.8: Clusteramplifikation von Her2 bei einem duktalem Adenokarzinom.

Bei 266 Tumoren (92,0%) konnte eine Immunhistochemie bezüglich Her2 durchgeführt und ausgewertet werden. 46 (17,3%) Tumoren zeigten eine Her2-Expression. Diagramm 3.3.7 veranschaulicht die prozentualen Anteile immunhistochemisch positiver Fälle an den jeweiligen Tumoren. 63,3% der duktalem Adenokarzinome exprimierten hierbei vermehrt Her2. Für 43 der positiven Tumoren lag zudem der FISH-Her2-Status vor, der in 8 (18,6%) Fällen positiv im Sinne einer numerischen Chromosom-17-Aberration war (5 hohe Polysomien, 3 Trisomien). 12 (27,9%) der 43 Fälle wiesen eine Genamplifikation von Her2 auf und umgekehrt zeigten 12 (66,7%) von 18 Fällen mit Amplifikation von Her2, bei welchen Ergebnisse zur Immunhistochemie vorlagen, eine Expression von Her2 ($p < 0,001$). 32,6% der Tumoren mit positiver Her2-Immunhistochemie waren immunhistochemisch EGFR-positiv, wohingegen Her2-negative Tumoren in 21,7% EGFR-positiv waren.

Immunhistochemie Her2

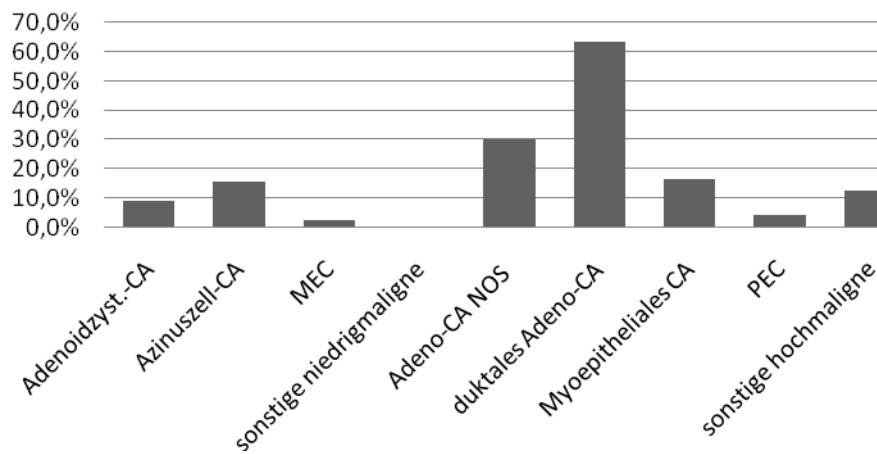


Diagramm 3.3.7: Prozentuale Anteile immunhistochemisch positiver Fälle an den untersuchten Tumoren

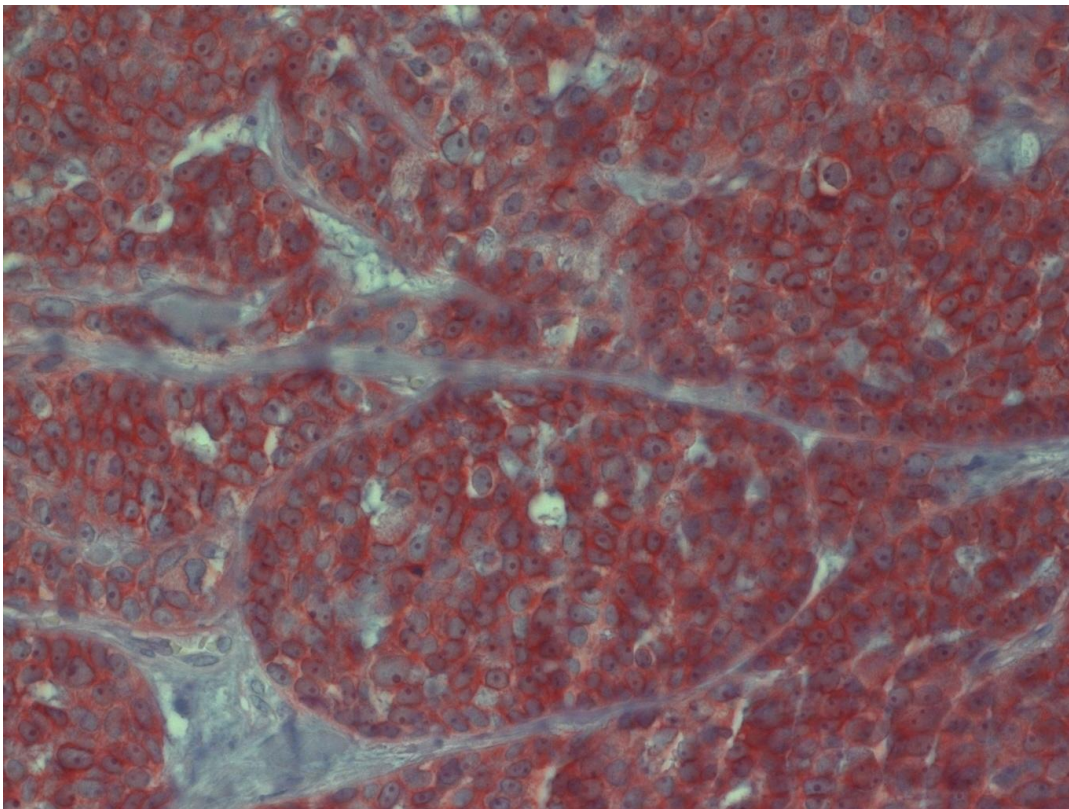


Abb. 3.3.9: Positive Immunhistochemie für Her2 bei einem adenoid-zystischen Karzinom. Färbeintensität "2+".

3.3.2 Assoziation zwischen den EGFR- und Her2-Befunden mit klinisch-pathologischen Parametern

a) EGFR

Es konnte bei geringer Zahl Chromosom 7-trisomer Fälle keine signifikante Assoziation mit dem Tumorstadium gefunden werden, wobei 65% der Fälle mit Trisomie 7 ein Stadium >II aufwiesen im Vergleich zu 49,2% bei den nicht-trisomen Fällen. Auch bezüglich des Tumorgrading wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden, doch wiesen bei den positiven Fällen 75% ein *Grade* >G1 auf im Vergleich zu 63,2% bei den negativen. Trisome Fälle neigten signifikant häufiger zu Tumorrezidiven als nicht-trisome ($p=0,030$). Es konnte kein Zusammenhang mit der Häufigkeit von Tumormetastasen gefunden werden. Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit einer positiven Immunhistochemie von EGFR, jedoch zeigten Fälle mit Trisomie 7 signifikant häufiger eine Trisomie von Chromosom 17, auf welchem das Gen Her2 lokalisiert ist ($p=0,026$).

Patienten mit einer hochgradigen Polysomie von Chromosom 7 waren häufiger über 60 Jahre alt ($p=0,016$). Zudem war diese signifikant vergesellschaftet mit einem höheren Tumorstadium (Stadien III oder IV) ($p=0,027$) und hochsignifikant mit einem hohen *Grade* (G3) ($p<0,001$). Ein eindeutiger Zusammenhang mit der Rezidiv- oder Metastasenhäufigkeit ließ sich nicht feststellen. Jedoch bestand ein hochsignifikanter Zusammenhang mit einer EGFR-Expression in der Immunhistochemie ($p=0,001$). Hochgradig Chr. 7-polysome Fälle zeigten signifikant häufiger eine Trisomie ($p=0,019$) bzw. hochsignifikant eine hochgradige Polysomie ($p<0,001$) von Chromosom 17.

Von 5 Fällen mit Amplifikation von EGFR wiesen 4 (80%) ein *Grade* G3 auf, ein Fall G2. 3 Tumoren hatten Stadium III, 2 Stadium IV. Bei einem Fall eines duktales Adenokarzinoms lag eine Clusteramplifikation von EGFR vor (siehe Abbildung 3.3.4 oben). Der Tumor hatte Stadium III und *Grade* G3. 2 (40%) der 5 Fälle mit Amplifikation zeigten auch eine positive Immunhistochemie für EGFR.

Insgesamt zeigten 38,5% von EGFR-positiven Fällen (Trisomie 7, hochgradige Polysomie 7, Genamplifikation) eine EGFR-Expression in der Immunhistochemie. Die positive Immunhistochemie für EGFR war signifikant ($p=0,002$) assoziiert mit einem Alter über 60 Jahren, einem Tumorstadium >II ($p=0,041$) und einem *Grade* G3 ($p=0,031$).

b) Her2

Patienten mit einer Trisomie von Chromosom 17 waren signifikant häufiger über 60 Jahre alt ($p=0,006$). Es fand sich kein Zusammenhang mit dem Stadium, das mit 66,7% bei den trisomen Fällen häufiger $>II$ war als bei den nicht-trisomen mit 51,2%. Bei Trisomie 17 lag in 91,7% ein *Grade* $>G1$ vor, in negativen Fällen in 61,6% ($p=0,060$). Ein Zusammenhang mit der Rezidivhäufigkeit oder mit einer positiven Immunhistochemie von Her2 wurde nicht gefunden.

Patienten mit einer starken numerischen Aberration von Chromosom 17 waren signifikant häufiger über 60 Jahre alt ($p=0,050$). Hochgradig polysome Tumoren waren signifikant mit einem höheren Tumorstadium ($p=0,013$) und hochsignifikant mit einem *Grade* G3 assoziiert ($p<0,001$) und neigten häufiger zu Rezidiven ($p=0,019$). Ein Zusammenhang mit der Metastasenhäufigkeit wurde nicht gefunden. Ebenso kein Zusammenhang mit einer positiven Immunhistochemie von Her2.

Es fanden sich 20 Fälle mit Amplifikation des Her2-Genes, wobei in 12 Fällen eine Clusteramplifikation vorlag (siehe Abb. 3.3.10). 14 Fälle (70%) mit Genamplifikation wiesen ein höheres Tumorstadium (Stadium III oder IV) auf. Alle 20 Fälle waren mit einem *Grade* >1 verbunden, wobei 80% G3-Tumoren waren ($p=0,001$). Zwei Drittel der Tumoren mit Clusteramplifikation von Her2 hatten ein Tumorstadium $>II$, 91,7% waren mit einem G3-*Grade* assoziiert ($p=0,001$), ein Fall war mäßiggradig differenziert (G2). Die Rezidivrate bei den Fällen mit Amplifikation war kaum höher als bei der negativen Kontrollgruppe (27,8% vs. 24,1%). In drei Vierteln der Fälle mit Amplifikation waren die Patienten über 60 Jahre alt. Dies war bei den negativen Fällen nur in 53,5% der Fall. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Genamplifikation und positiver Immunhistochemie für Her2 ($p<0,001$) bzw. ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genamplifikation und stark positiver Immunhistochemie mit einem Wert des Produkts aus Färbeintensität und prozentualem Anteil gefärbter Zellen ≥ 120 ($p=0,014$). Tumoren mit Amplifikation von Her2 wiesen in 38,9% eine positive EGFR-Immunhistochemie auf, Tumoren ohne Amplifikation in 23,0%.

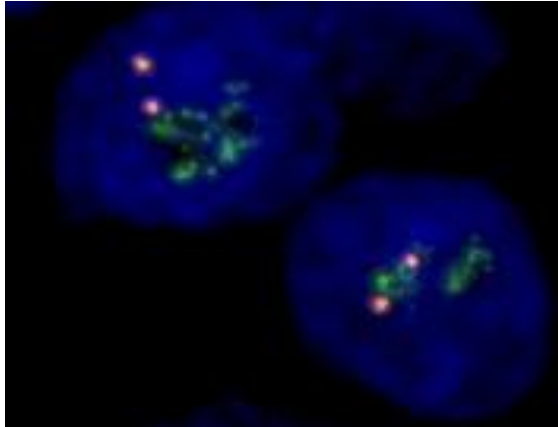


Abb 3.3.10: Clusteramplifikation des Her2-Genes: bei zwei regelrechten Centromersignalen (orange) finden sich in den Zellkernen zahlreiche Gensignale (grün).

Im Falle einer positiven Immunhistochemie für Her2 zeigte sich eine Assoziation mit einem Alter über 60 Jahren ($p=0,022$), einem Stadium $>II$ ($p=0,009$) und einem *Grade* G3 ($p=0,002$).

Klinisch-pathologische Parameter	Rezidiv	Alter>60Jahre	Stadium >II	Grading >G1	Immunhisto. EGFR pos.	Immunhisto. Her2 pos.
Chr.7/EGFR						
Trisomie¹	0,030	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Hochgradige Polysomie²	n.s.	0,016	0,027	G3: <0,001	0,001	
Immunhistochemie EGFR positiv	n.s.	0,002	0,041	G3: 0,031		n.s.
Chr.17/Her2						
Trisomie	n.s.	0,006	n.s.	n.s.		n.s.
Hochgradige Polysomie	0,019	0,050	0,013	G3: <0,001		
Amplifikation	n.s.	n.s.	n.s.	G3: 0,001		<0,001
Immunhistochemie Her2 positiv	n.s.	0,022	0,009	G3: 0,002	n.s.	

¹signifikant mit Trisomie Chr.17 assoziiert ($p=0,026$)

²signifikant mit Trisomie Chr.17 ($p=0,019$) und hochsignifikant mit hoher Polysomie Chr. 17 assoziiert ($p<0,001$)

Tabelle 3.3.1: Zusammenstellung von signifikanten Assoziationen (p-Werte) klinisch-pathologischer Parameter

3.3.3 Die prognostische Bedeutung der EGFR- und Her2-Befunde

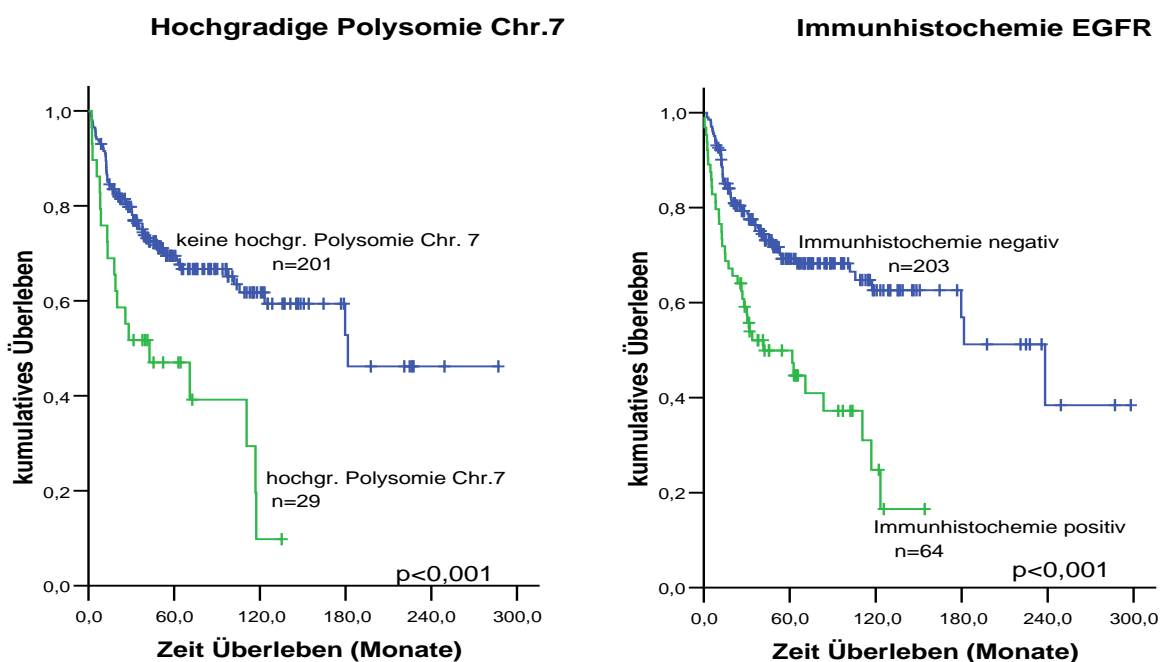
a) EGFR

Bei der Trisomie von Chromosom 7 konnte kein signifikanter Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben gefunden werden. Bei den negativen Fällen lag das mittlere Überleben bei 172,5 Monaten (CI 146,9 Monate, 198,1 Monate), während dies bei den trisomen Fällen 121,4 Monate (CI 65,3 Monate, 177,5 Monate) waren.

Im Falle einer hochgradigen Polysomie des EGFR-tragenden Chromosoms war das mittlere Überleben mit 60,7 Monaten (CI 41,0 Monate, 80,4 Monate) im Vergleich zu 172,5 Monaten (CI 146,9 Monate, 198,1 Monate) hochsignifikant ($p < 0,001$) verkürzt.

Aufgrund der geringen Fallzahl mit Genamplifikation von EGFR konnte diesbezüglich keine valente Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt werden. Das mittlere Gesamtüberleben der 5 Fälle mit Amplifikation betrug durchschnittlich 51,4 Monate (CI 21,1 Monate, 81,7 Monate), bei der Kontrollgruppe dahingegen 151,1 Monate (CI 128,5 Monate, 173,8 Monate).

Ein hochsignifikant kürzeres Überleben zeigte sich bei positiver Immunhistochemie für EGFR, ($p < 0,001$). Das mittlere Überleben betrug 66,4 Monate (CI 50,6 Monate, 82,3 Monate), in der negativen Vergleichsgruppe 179,2 Monate (CI 152,2 Monate, 206,1 Monate).



Grafik 3.3.1: Überleben bei hochgradiger Polysomie von Chromosom 7 bzw. bei EGFR-Expression in der Immunhistochemie im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe

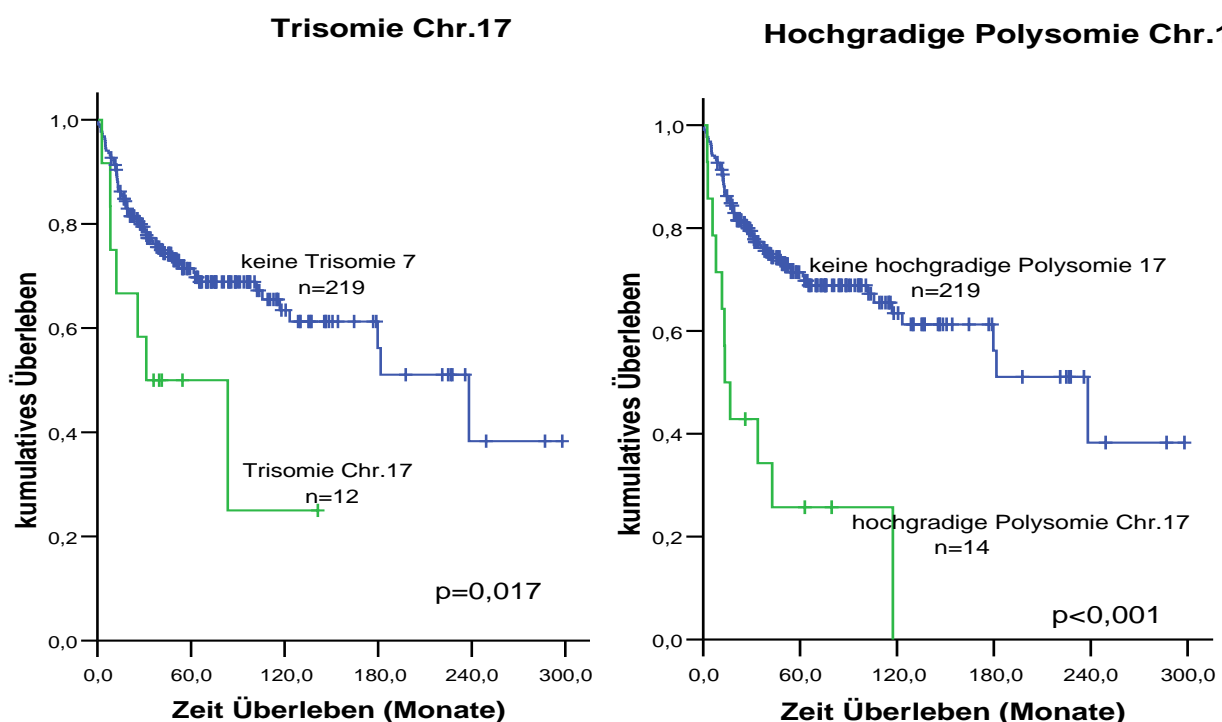
b) Her2

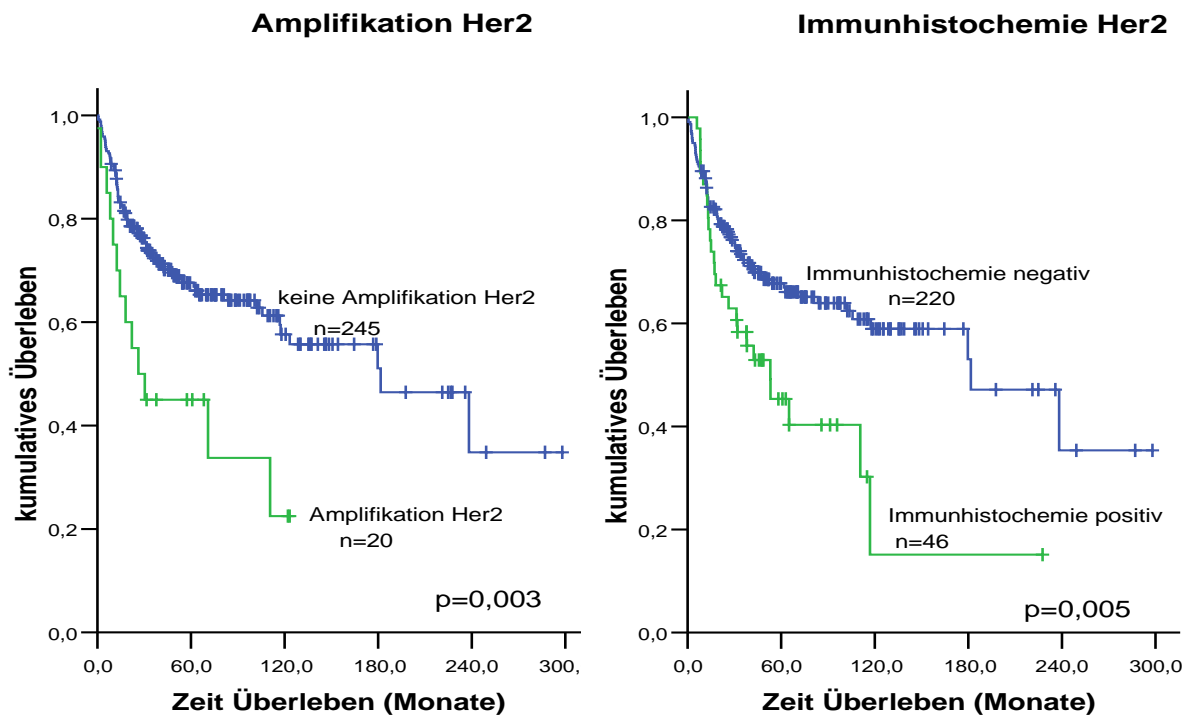
Im Falle einer Trisomie des Her2-Gen tragenden Chromosom 17 zeigte sich ein mit 63,6 Monaten (CI 29,2 Monate, 98,0 Monate) signifikant ($p=0,017$) schlechteres mittleres Gesamtüberleben als bei den nicht-trisomen Fällen mit 178,9 Monaten (CI 152,7 Monate, 205,2 Monate).

Ebenso verkürzte sich das durchschnittliche Überleben hochsignifikant bei hochgradiger Polysomie von Chromosom 17 ($p<0,001$) von 178,9 Monaten (CI 152,7 Monate, 205,2 Monate) auf 42,0 Monate (CI 60,1 Monate, 67,9 Monate).

Im Falle einer Amplifikation des Her2-Genes war das Überleben von durchschnittlich 166,5 Monaten (CI 141,8 Monate, 191,3 Monate) in der Kontrollgruppe auf 55,6 Monate (CI 33,0 Monate, 78,3 Monate) signifikant ($p=0,003$) verkürzt.

Bei positiver Immunhistochemie für Her2 zeigte sich ein mittleres Überleben von 79,2 Monaten (CI 46,1 Monate, 112,2 Monate), in der Kontrollgruppe waren es 168,9 Monate (CI 142,6 Monate, 195,2 Monate). Mit $p=0,005$ war somit auch bei positiver Immunhistochemie für Her2 ein signifikant kürzeres Überleben gegeben.





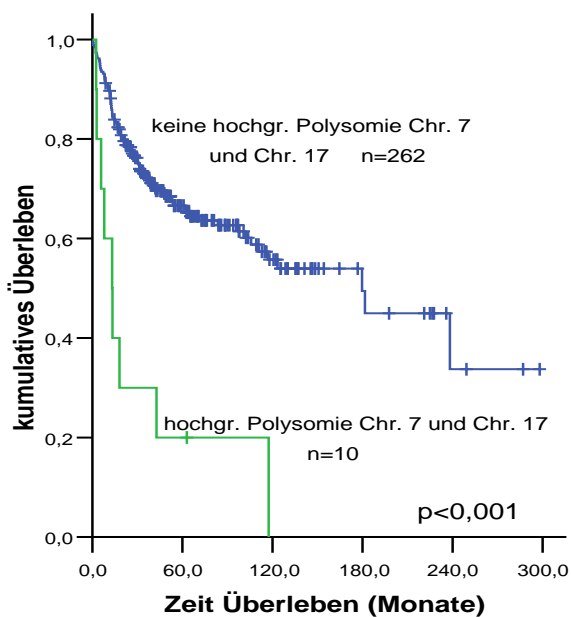
Gratik 3.3.2: Überleben bei Trisomie bzw. hochgradiger Polysomie von Chromosom 17, bei Genamplifikation von Her2 und bei positiver Immunhistochemie bzgl. Her2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe

c) EGFR und Her2

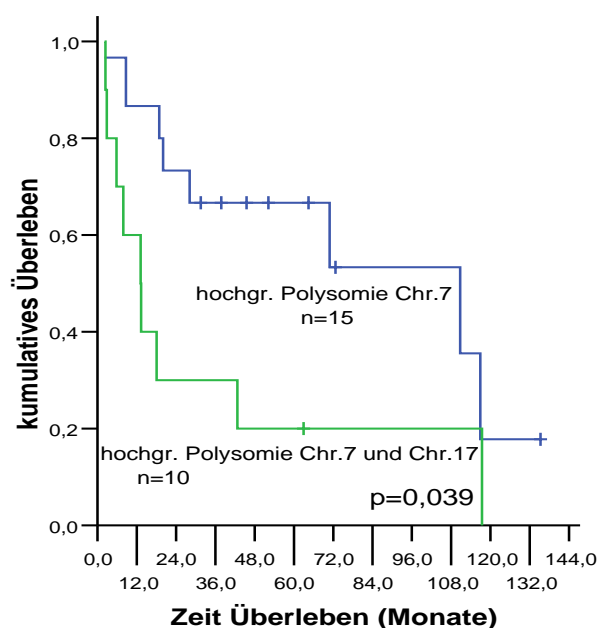
Es lagen 10 Fälle mit zugleich hochgradiger Polysomie sowohl von Chromosom 7 als auch von Chromosom 17 vor. Dabei entfielen 4 Fälle auf die duktaalen Adenokarzinome. Von dieser Tumorentität waren insgesamt 13,3% von hochgradigen Polysomien beider Chromosomen betroffen. Weitere 3 Fälle mit hochgradiger Polysomie sowohl des EGFR- als auch des Her2-Gen tragenden Chromosoms entfielen auf die Plattenepithelkarzinome, von welchen 12,0% hochgradig polysom bezüglich beider Chromosomen waren. In der zusammengefassten Gruppe der sonstigen hochmalignen Tumoren waren 12,5% der Tumoren betroffen. Es zeigte sich bei dualer (Chr. 7 und 17) hochgradiger Polysomie insgesamt ein hochsignifikant schlechteres Überleben als bei der Kontrollgruppe, die aus allen übrigen Fällen bestand, also beispielsweise aus Fällen mit allein hochgradiger Polysomie 7 oder 17, aber auch aus Fällen ohne hochgradige Polysomie oder mit Trisomien: das mittlere Überleben lag bei 34,1 Monaten (CI 5,8 Monate, 62,0 Monate) im Vergleich zu 162,7 Monaten (CI 138,8 Monate, 186,6 Monate) in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit nur hochgradiger Polysomie von Chromosom 7 und

einem mittleren Überleben von 76,0 Monaten (CI 51,7 Monate, 100,2 Monate) lag bei dualer hochgradiger Polysomie ebenfalls eine signifikant schlechtere Prognose vor ($p=0,039$). Gegenüber einer Kontrollgruppe, die nur eine hochgradige Polysomie 17 aufwies und ein mittleres Überleben von 47,7 Monaten (CI 17,8 Monate, 77,5 Monate), zeigte sich ein schlechteres Überleben, dessen Signifikanz sich aufgrund zu geringer Fallzahl (Kontrollgruppe aus 7 Fällen) nicht überprüfen ließ.

Hochgradige Polysomie Chr. 7 und Chr.17 vs. Rest



Hochgradige Polysomie Chr.7 und Chr.17 vs. hochgradige Polysomie Chr.7

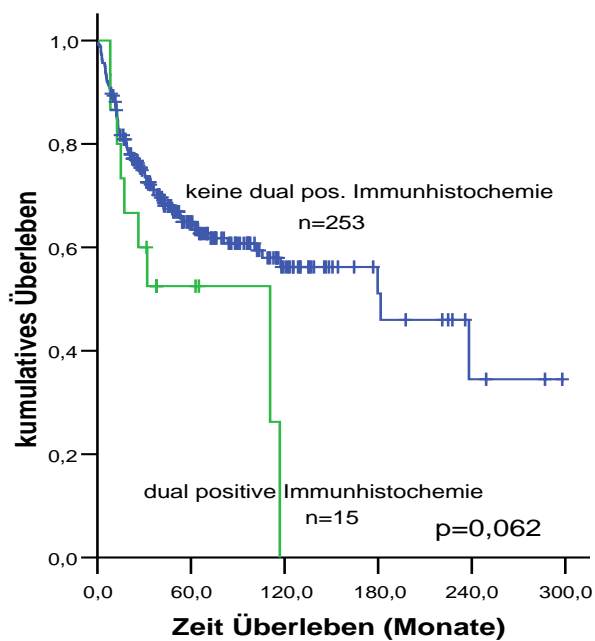


Grafik 3.3.3: Überleben bei hochgradigen Polysomien der EGFR-Gen- und Her2-Gen tragenden Chromosomen im Vergleich zum Gesamtrest bzw. zu einer Kontrollgruppe mit hochgradiger Polysomie nur von Chromosom 7 (EGFR-Gen-tragend)

Eine simultane EGFR- und Her2-Expression in der Immunhistochemie entfiel in 46,7% auf die duktaalen Adenokarzinome. Diese waren in 23,3% immunhistochemisch positiv in Bezug auf beide Rezeptoren, was ferner bei 11,1% der myoepithelialen Karzinome, bei 8,8% der Adenokarzinome NOS und bei 6,8% der adenoid-zystischen Karzinome der Fall war. Dabei verschlechterte sich das durchschnittliche Überleben mit 68,0 Monaten (CI 41,5 Monate, 94,4 Monate) gegenüber 69,5 Monaten (CI 49,5 Monate, 89,5 Monate) bei der Vergleichsgruppe mit nur positiver Immunhistochemie für EGFR bzw. gegenüber 100,6

Monaten (CI 61,0 Monate, 140,1 Monate) bei der Vergleichsgruppe mit nur positiver Immunhistochemie für Her2, wobei auf die niedrige Zahl von Fällen mit zweifach positiver Immunhistochemie verwiesen sei (15 Fälle, davon 6 zensiert). Im Vergleich zu allen anderen Fällen ohne simultan positive Immunhistochemie für beide Gene, die ein mittleres Überleben von 163,5 Monaten (CI 138,9 Monate, 188,0 Monate) hatten, zeigte eine deutlich schlechtere Prognose, jedoch keine Signifikanz ($p=0,062$).

Immunhistochemie EGFR und Her2 vs. Rest



Grafik 3.3.4: Positive Immunhistochemie bzgl. beider Genprodukte im Vergleich zur Kontrollgruppe

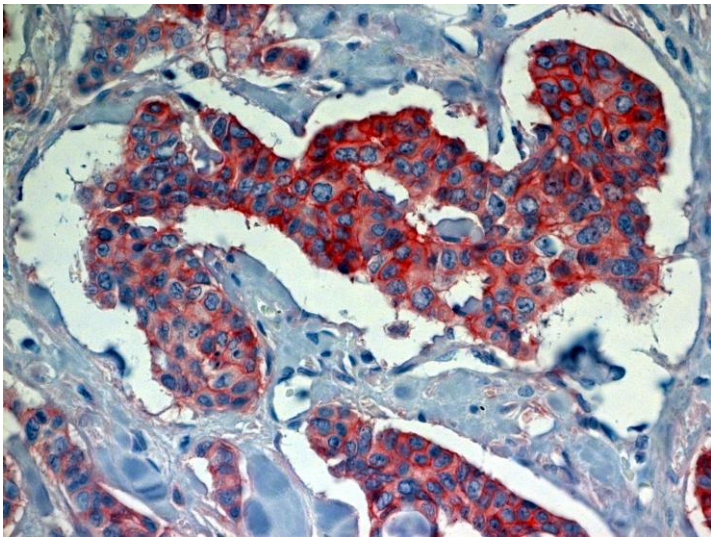
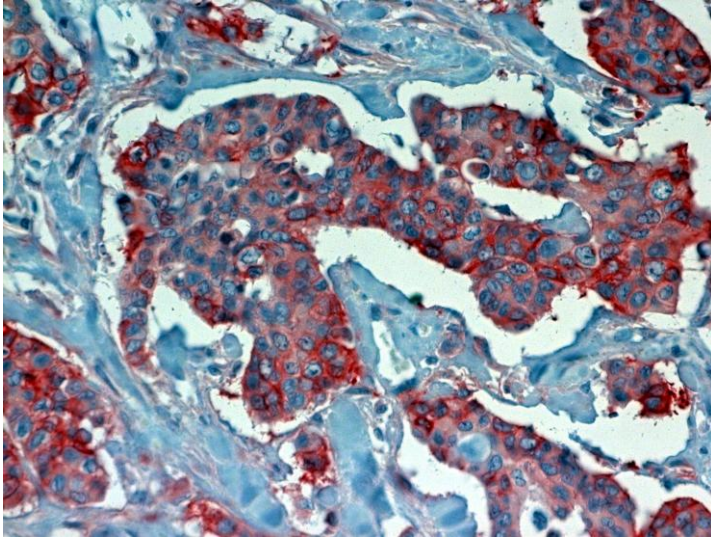


Abb. 3.3.11: Adenokarzinom NOS mit immunohistochemischer Färbung von EGFR (oben) und Her2 (unten). Der Tumor ist somit dual positiv.

3.3.4 Multivariate Analyse klinisch-pathologischer Faktoren in Bezug auf das Überleben

Um das Zusammenspiel der relevanten Prognosefaktoren zu überprüfen, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Die in das Regressionsmodell integrierten Parameter waren diejenigen, deren prognostische Signifikanz sich in der univariaten Kaplan-Meier Analyse gezeigt hatte: hoch- vs. niedrigmaligne Tumoren, *Grading*, Stadium, Lokalisation, Alter in Bezug auf 60 Jahre, hochgradige Polysomie von Chromosom 7, Trisomie von Chromosom 17, hochgradige Polysomie von Chromosom 17, hochgradige Polysomie sowohl von Chromosom 7 als auch von Chromosom 17, Genamplifikation von Her2, immunohistochemisch nachweisbare EGFR-Expression, immunohistochemisch nachweisbare Her2-Expression. Das Cox-Regressionsmodell wurde in 7 reversen Schritten adjustiert, um 7

nicht signifikante Parameter auszuschließen. Folgende Parameter verblieben in dem Modell mit Signifikanz und Werten der *Hazard-ratio* zwischen 1,9 und 3,7: Alter über 60 Jahre, hoch- vs. niedrigmaligne Tumoren, Tumorstadium, dual hohe Polysomie für Chromosom 7 und 17, positive Immunhistochemie EGFR. In einem weiteren Modell, in dem das Merkmal "hoch- vs. niedrigmaligne Tumoren" durch das *Grading* ersetzt wurde, verblieb dieses als signifikanter Parameter im Modell. Jedoch zeigte sich hier für die Immunhistochemie zu EGFR mit $p=0,067$ keine Signifikanz mehr. Die Werte der *Hazard-ratio* lagen zwischen 1,6 und 3,9. Das größte relative Risiko stellt demnach in beiden Modellen ein Alter über 60 Jahren dar, gefolgt von einer hochgradigen Polysomie für Chromosom 7 und 17 in Modell 1 bzw. einem fortgeschrittenen Tumorstadium in Modell 2.

Faktor	Hazard-Ratio	95%-CI	Signifikanz p
Alter über 60 Jahre	3,5	2,0-6,2	<0,001
Hoch- vs. niedrigmaligner Tumor	2,5	1,4-4,2	0,001
Tumorstadium >II	2,7	1,6-4,6	<0,001
Hochgradige Polysomie Chr. 7 und Chr. 17	3,7	1,4-9,9	0,011
Immunhistochemie EGFR	1,9	1,2-3,1	0,010

Tabelle 3.3.2: Regressionsmodell 1 nach 7 reversen Selektionsschritten: dargestellt sind die verbliebenen Parameter mit den Werten der *Hazard-ratio*, dem 95%-Konfidenzintervall und den Signifikanzwerten p

Faktor	Hazard-Ratio	95%-CI	Signifikanz p
Alter über 60 Jahre	3,9	2,2-6,9	<0,001
Grading >G1	2,0	1,0-3,9	0,037
Stadium >II	2,8	1,6-4,7	<0,001
Hohe Polysomie Chr.7 und 17	2,5	1,2-5,3	0,014
Immunhistochemie EGFR	1,6	1,0-2,5	0,067

Tabelle 3.3.3: Regressionsmodell 2 nach 7 reversen Selektionsschritten: anstelle des Parameters "hoch- vs. niedrigmaligner Tumor" wurde das *Grading* als Variable gewählt

3.4 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome

3.4.1 Histologische Merkmale der untersuchten MECs

a) Klassisches Mukoepidermoidkarzinom

23 (57,5%) Tumoren entsprachen histologisch der Kategorie "klassisches MEC", bei welchen alle drei Zelltypen, insbesondere die Mukuszellen, gut zu erkennen waren und variable zystische Areale vorhanden waren. In 7 (17,5%) Tumoren fanden sich deutlich zystische Abschnitte, die mehr als 20% einnahmen. Bereits bei schwacher Vergrößerung fanden sich prominente Mukuszellen und gut erkennbare Drüsen oder Aggregate derselben (siehe Abb. 3.4.1). Ungewöhnliche fokale Merkmale des klassischen MECs beinhalteten Zellen mit mikrovesikulärem Zytoplasma in 2 Fällen (siehe Abb. 3.4.2), was eine unvollkommene sebaziöse Differenzierung nahe legt, fokales synzytiales Wachstum spindelförmiger Intermediärzellen, die an eine myoepitheliale Differenzierung erinnerten, jedoch bei diffuser Expression von Zytokeratin 7 (CK7) keine Expression von p63 (myoepithelialer Marker) und Zytokeratin 5 (CK5) zeigten (siehe Abb. 3.4.3 und 3.4.4), sowie umschriebene Tumornester mit peripher lokalisierten, polygonal geformten, myoepithelial-ähnlichen klaren Tumorzellen und zentralen, mikrozystischen Drüsenstrukturen, was an das epithelial-myoepitheliale Karzinom (EMC) denken lässt. Jedoch waren die Lumina durch abgeflachte Epithelzellen begrenzt und zeigten auch nicht die gut erkennbaren Drüsenstrukturen des EMC. Ferner

zeigte die Immunhistochemie interessanterweise ein invertiertes EMC-Muster mit CK5-positiven luminalen Zellen und CK7-Positivität in der äußeren Schicht (siehe Abb. 3.4.5 und 3.4.6). Ein gemeinsamer Befund in mehreren Fällen war das Vorhandensein eines atypisch aussehenden vorexistenten Speicheldrüsendanges, der sowohl blande wirkendes Zilien-tragendes Epithel als auch Krypten-ähnliche Mukuszellhyperplasien zeigte, die zu einem atypischen Auswachsen Schleimzell-reicher *Ductuli* neben kleinen soliden Bezirken von Intermediärzellen führten (siehe Abb. 3.4.7 und 3.4.8). Diese Veränderungen waren oft mit avaskulärem papillärem Epithelwachstum assoziiert.

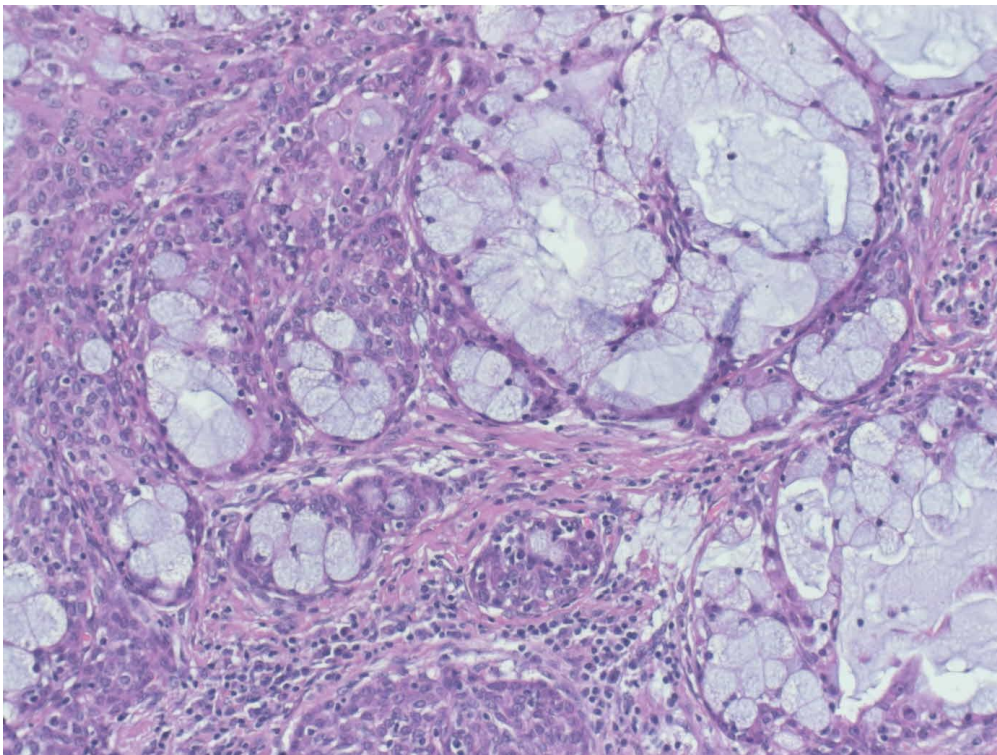


Abb. 3.4.1: H&E-Schnitt eines Mukoepidermoidkarzinoms. Gut zu erkennen sind die prominenten Mukusproduzierenden Zellen mit wabigem Zytoplasma und basal lokalisierten Zellkernen. Daneben finden sich solide Nester aus Epidermoidzellen.

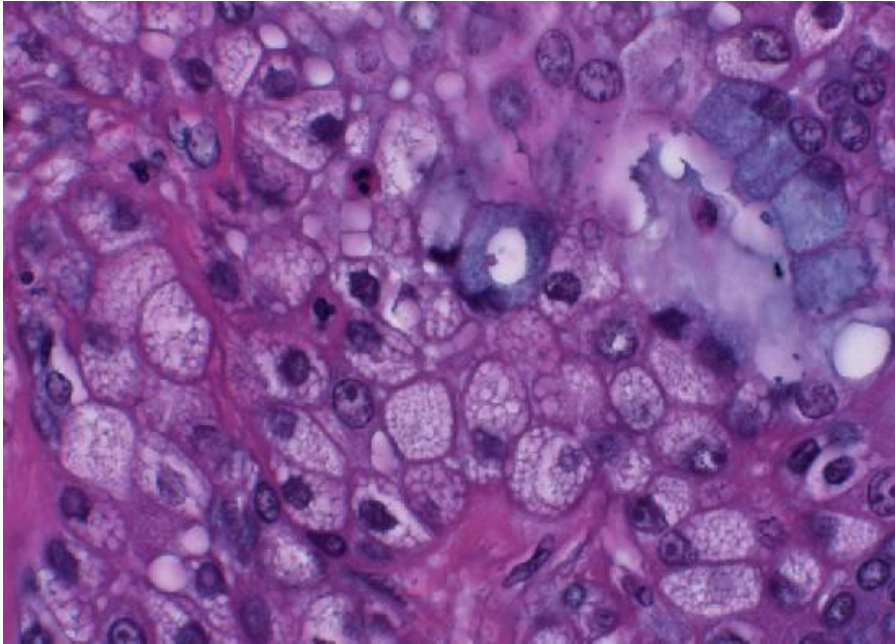


Abb. 3.4.2: MEC mit talgdrüsenähnlicher Differenzierung: zu erkennen sind die polyklonalen Zellen mit mikrovesikulärem Zytoplasma.

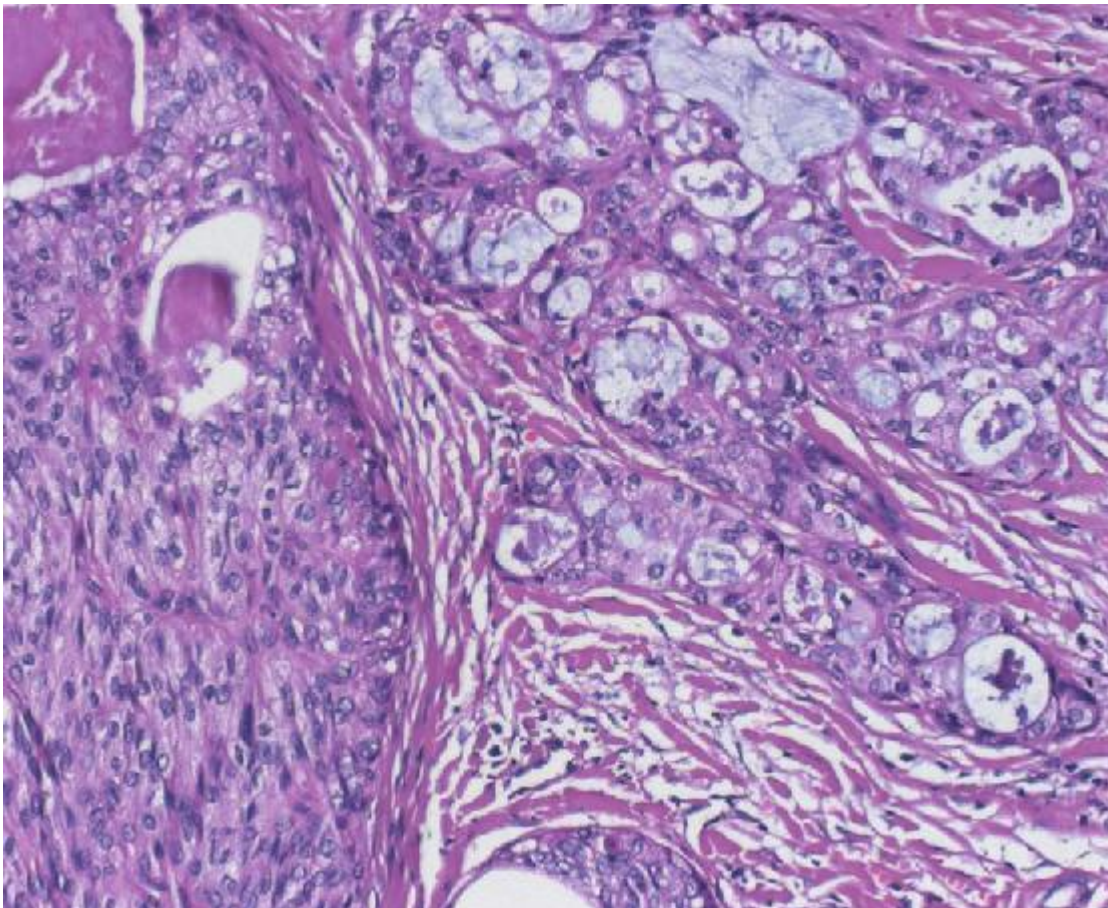


Abb. 3.4.3: MEC mit partiellem Wachstum spindelförmiger Intermediärzellen, was einer myoepithelialen Differenzierung ähnelt.

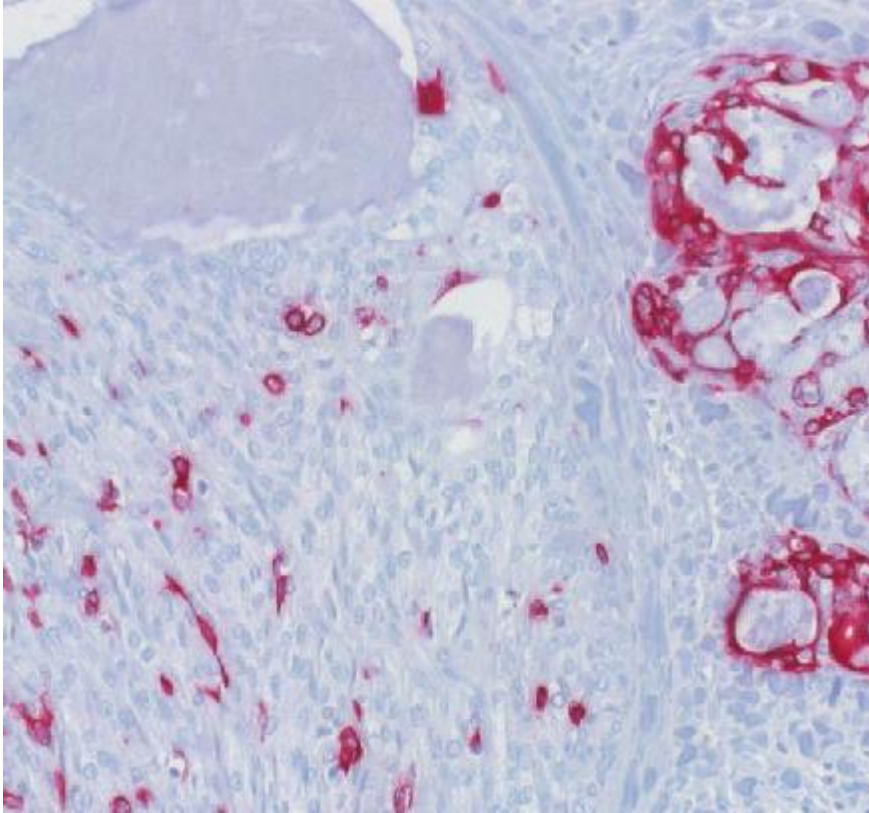


Abb.3.4.4: MEC aus obiger Abb. (3.4.3) mit negativer Immunhistochemie der Intermediärzellen bzgl. CK5.

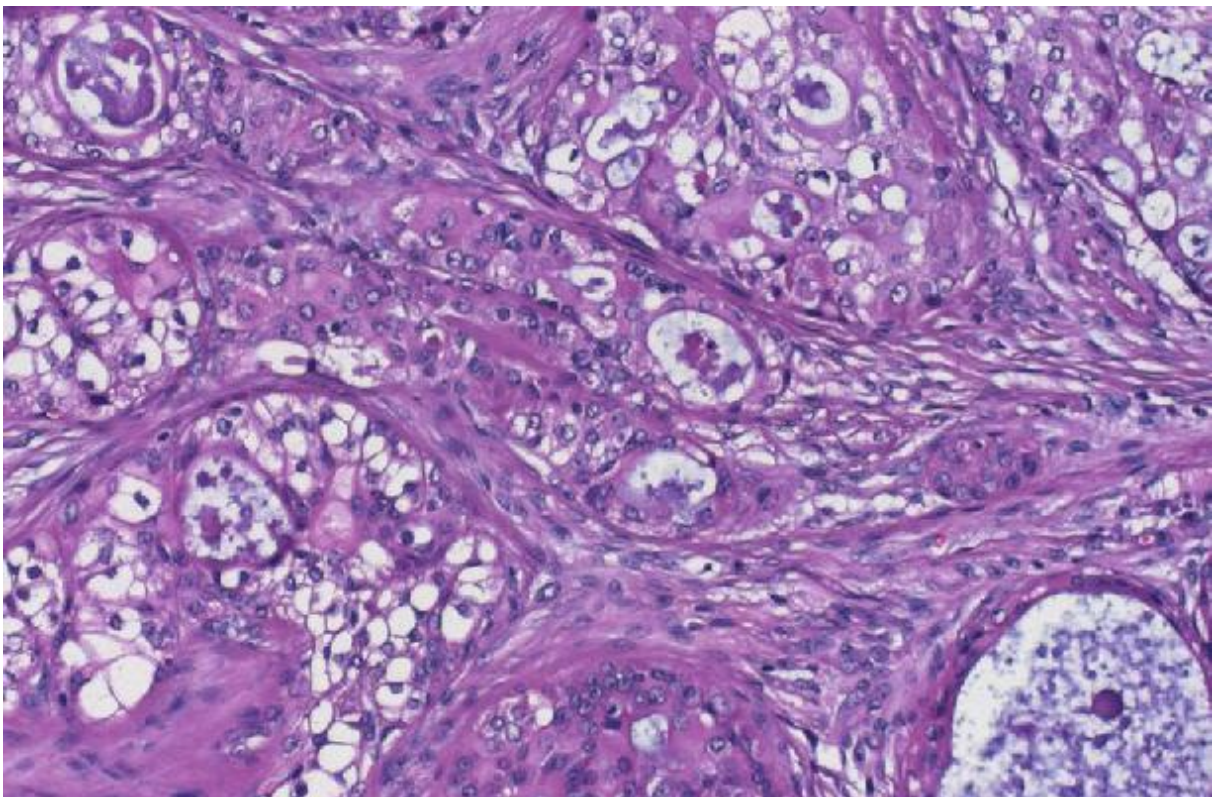


Abb. 3.4.5: Fokale myoepithelial-ähnliche, hellzellige Veränderungen von Intermediärzellen in einem MEC mit *Grade* G1.

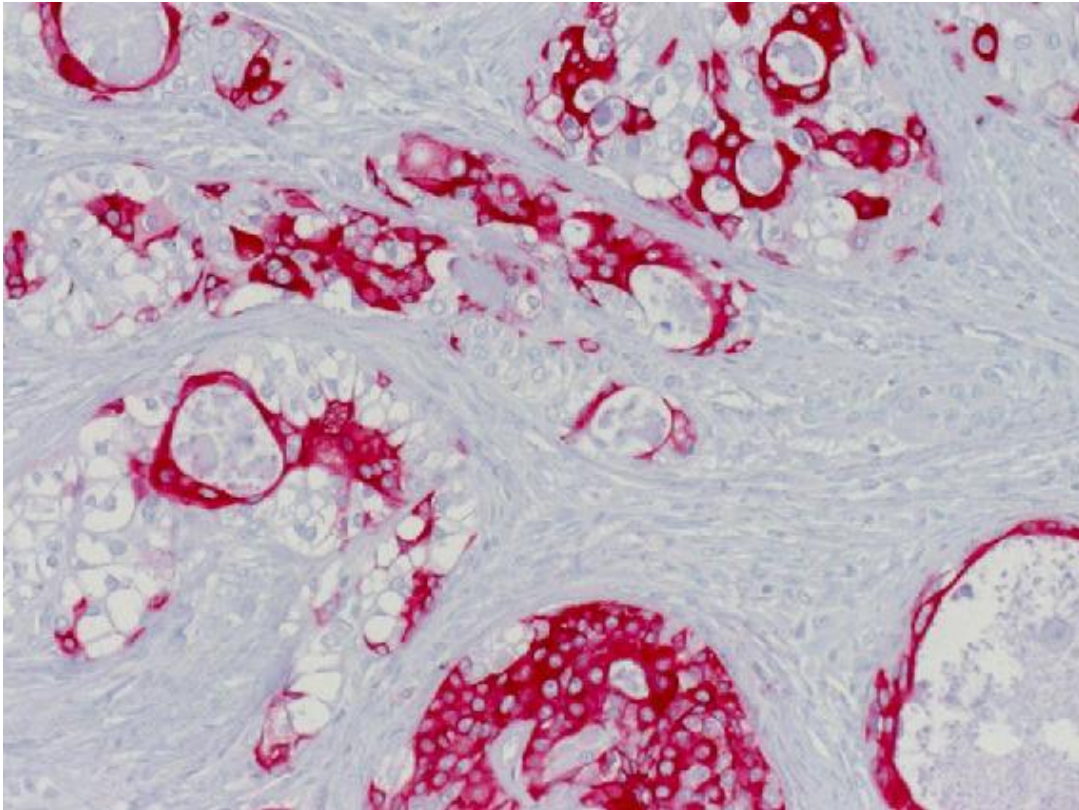


Abb. 3.4.6: MEC aus obiger Abb. (3.4.5). Die hellen Zellen sind immunhistochemisch negativ für CK5, jedoch für CK7 positiv (nicht gezeigt), so dass ein invertiertes epithelial-myoepitheliales Muster resultiert.

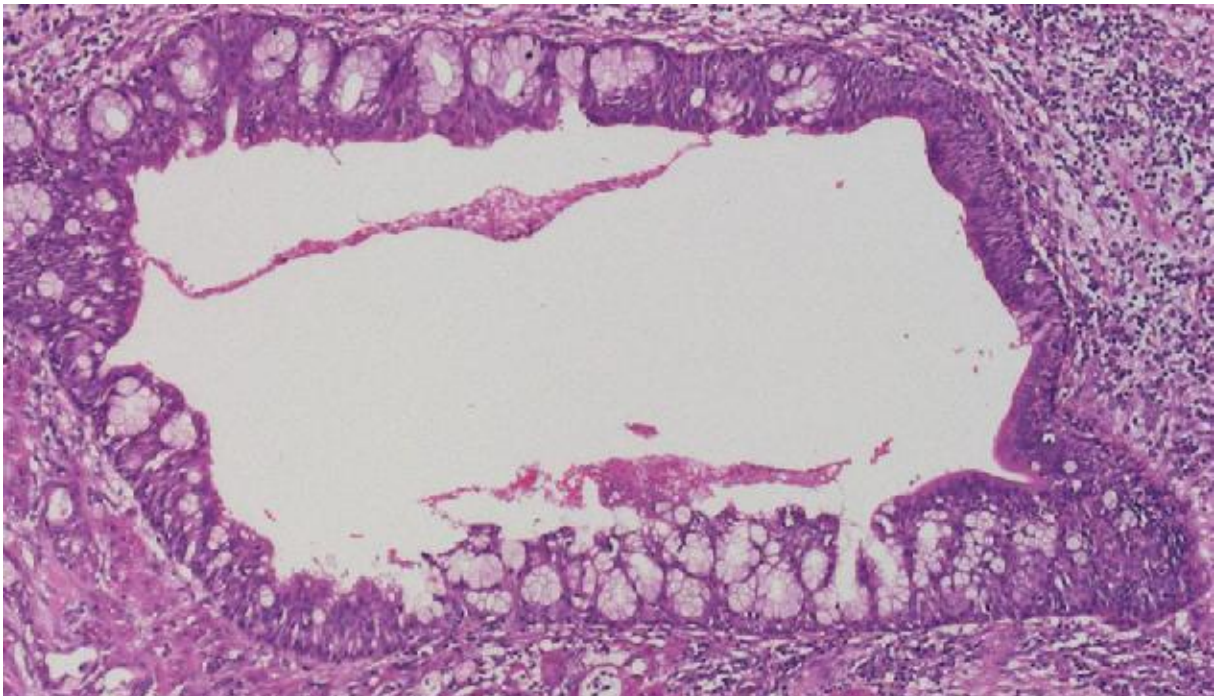


Abb. 3.4.7: Darstellung eines Speicheldrüsenganges mit Mukuszellhyperplasie bei einem klassischen MEC.

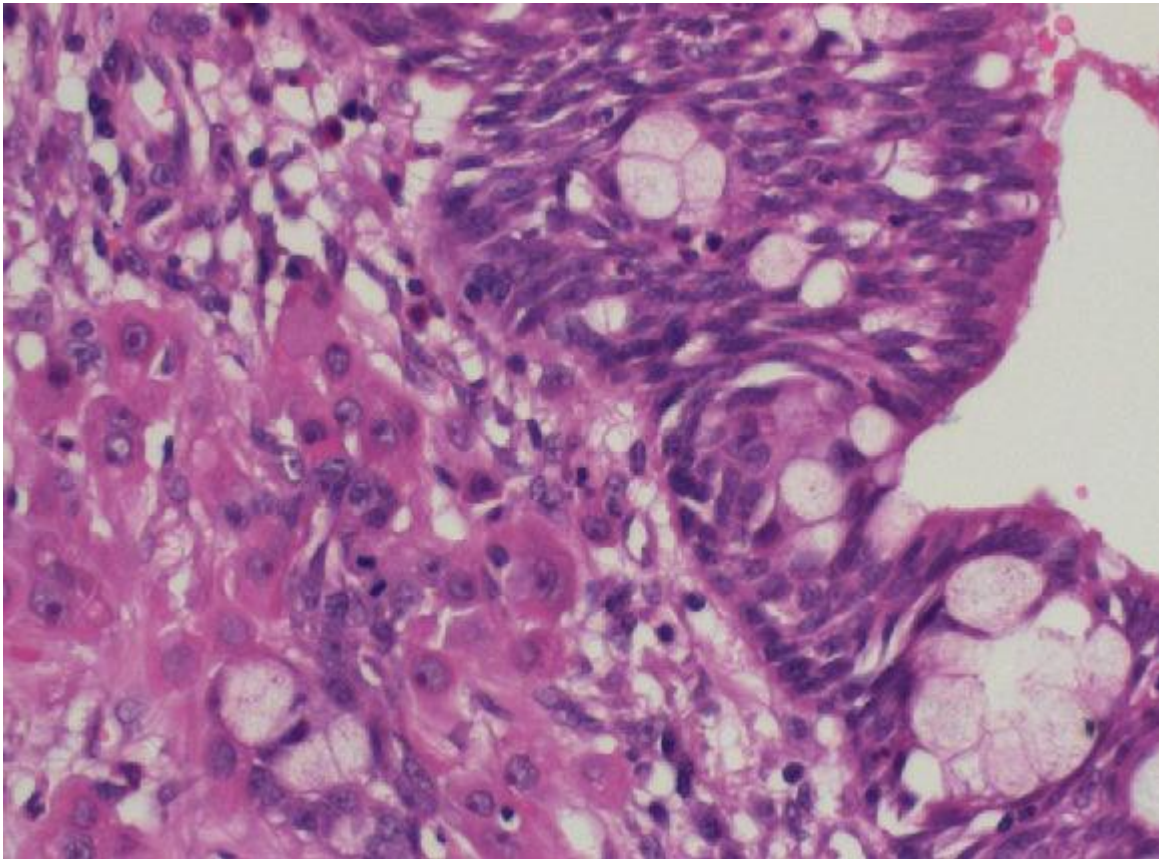


Abb. 3.4.8: Unter hoher Vergrößerung des obigen MEC (Abb. 3.4.7) zeigen sich eine Proliferation von Intermediärzellen im Ganglumen (rechts) und eine fokale Eosinophilie von squamoiden Tumorzellen (links).

b) Variante Mukoepidermoidkarzinome

Squamoides MEC

Das häufigste variante MEC stellte im Rahmen dieser Arbeit das squamoide MEC dar. Es kam in 9 Fällen (22,5%) vor. Das Bild des squamoiden Mukoepidermoidkarzinoms wird von epidermoid differenzierten Zellen in verschiedenem Ausmaß dominiert. Die squamoide Differenzierung zeigte sich in unterschiedlich stark ausgeprägten Hornzysten, wenngleich dies im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen für MECs nicht typisch ist. Ferner wurden scharfe Interzellulärverbindungen beobachtet. Prominente Interzellulärbrücken wie beim typischen Plattenepithelkarzinom waren jedoch ziemlich selten. Gelegentlich wurden zytoplasmatische Vakuolen gefunden, die möglicherweise eine abortive glanduläre Differenzierung bedeuten. Bei ein paar Tumoren zeigte sich ein fokales oder prominentes akantolytisches pseudoglanduläres oder pseudovaskuläres Muster. Ein anderes Muster stellten squamoid differenzierte Abschnitte mit zahlreichen mikrozystischen Lumina dar, die

mit sich blau anfärbendem Muzin gefüllt waren, was dem Tumor ein pseudocribriiformes Muster verlieh, das an das cribriforme Zystadenokarzinom erinnert (siehe Abb. 3.4.9 und 3.4.10). Die Differentialdiagnose zum Plattenepithelkarzinom kann mitunter schwierig sein.

Ein diesem Subtyp zugeordneter Fall zeigte neben einer kleinen Komponente mit Mukuszellen solide Zellverbände aus relativ kleinen basophilen Zellen, welche histologisch und immunhistologisch den Intermediärzellen entsprachen (siehe Abb. 3.4.11 und 3.4.12). Deshalb würde sich eher die Bezeichnung "MEC des intermediären Typs" anbieten, welcher jedoch nicht als eigenständiger Subtyp beschrieben ist. Deswegen war der Fall am ehesten der squamoiden Variante zuzuordnen.

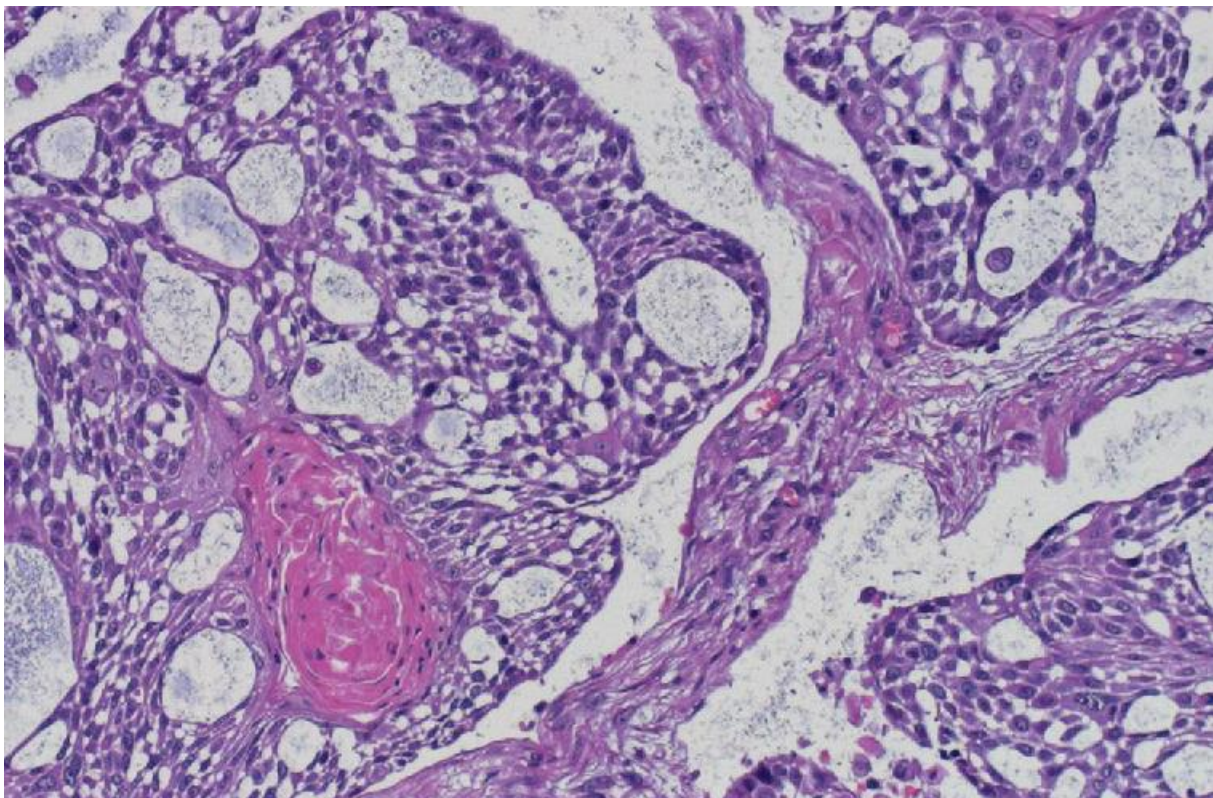


Abb. 3.4.9: MEC (*Grade* G3) mit zahlreichen Muzin-gefüllten Mikrozysten und Verbänden mit Intermediärzellen, die sich zu Plattenepithelien differenzieren und schließlich Hornperlen bilden.

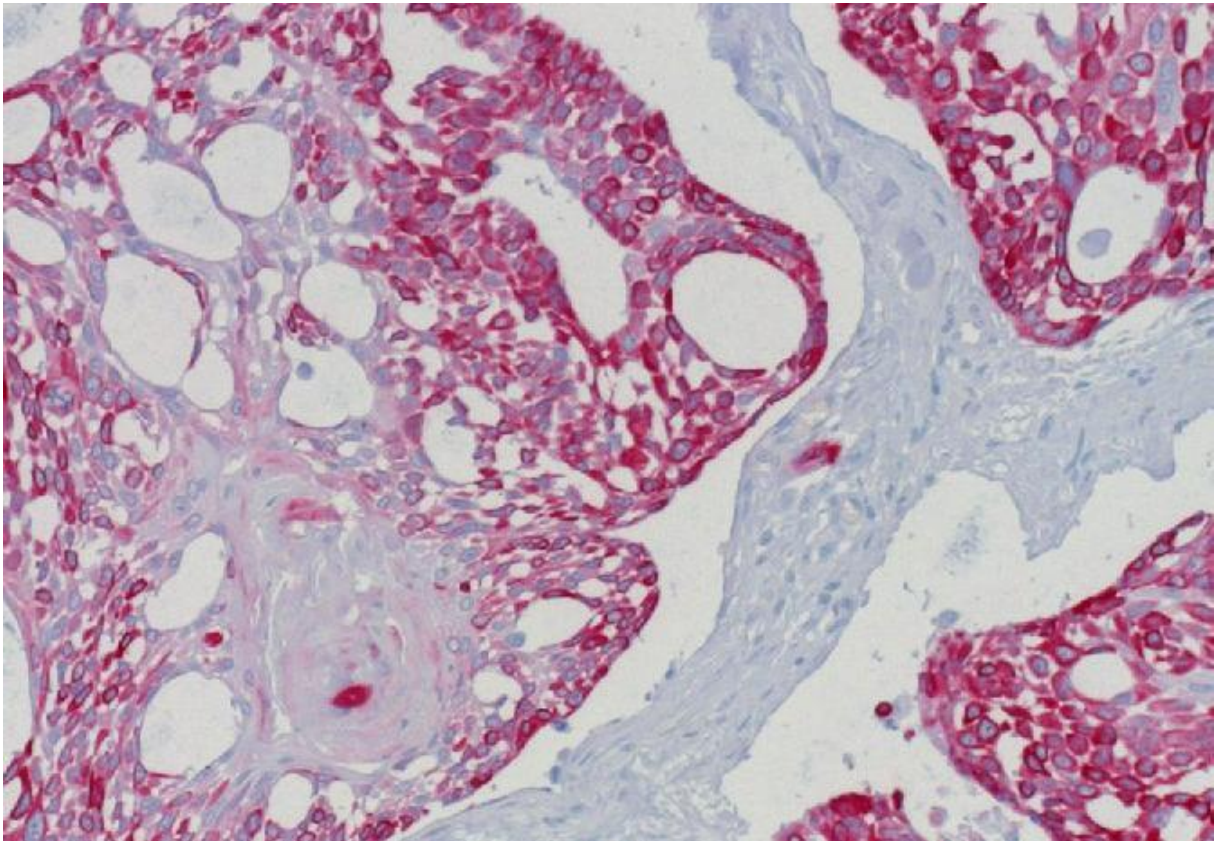


Abb. 3.4.10: Immunhistochemische Färbung für Zytokeratin 5 (CK5): die Intermediär- und plattenepithelial differenzierten Zellen färben sich stark an.

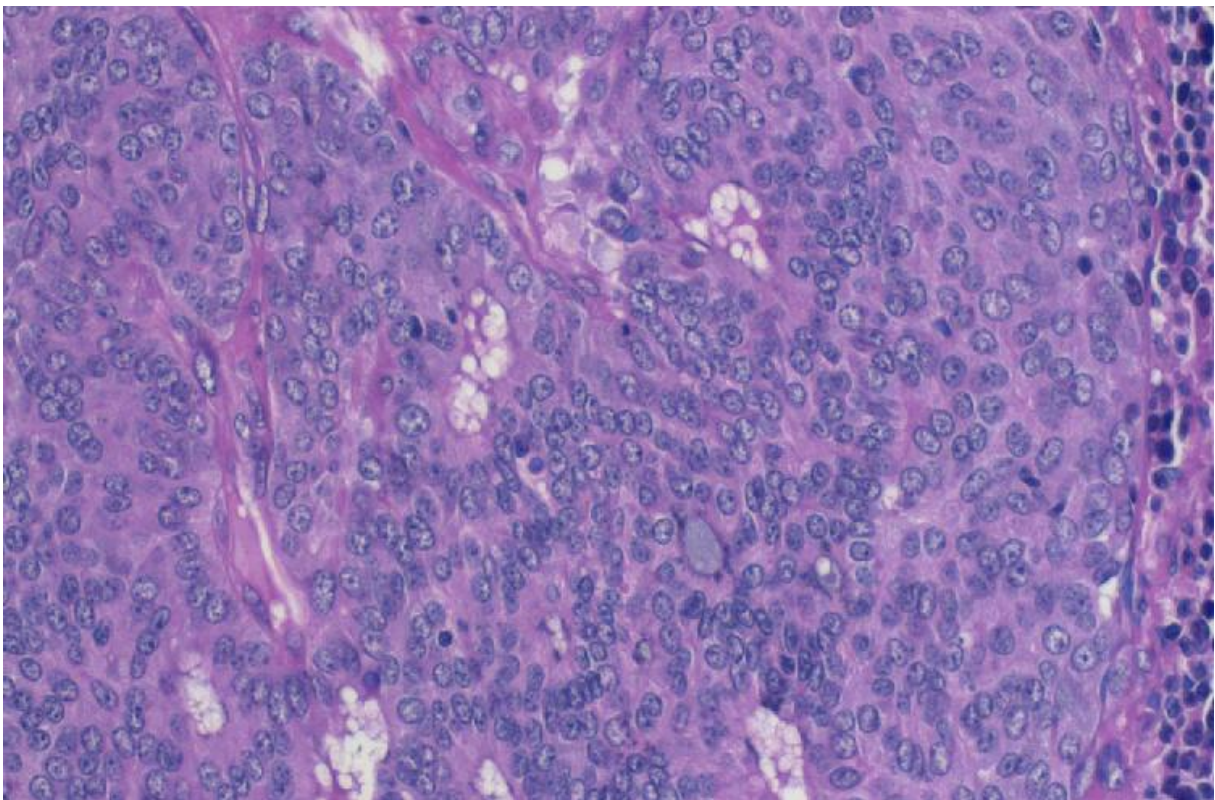


Abb. 3.4.11: *High grade* MEC mit soliden Intermediärzellabschnitten und eingestreuten Mukuszellen.

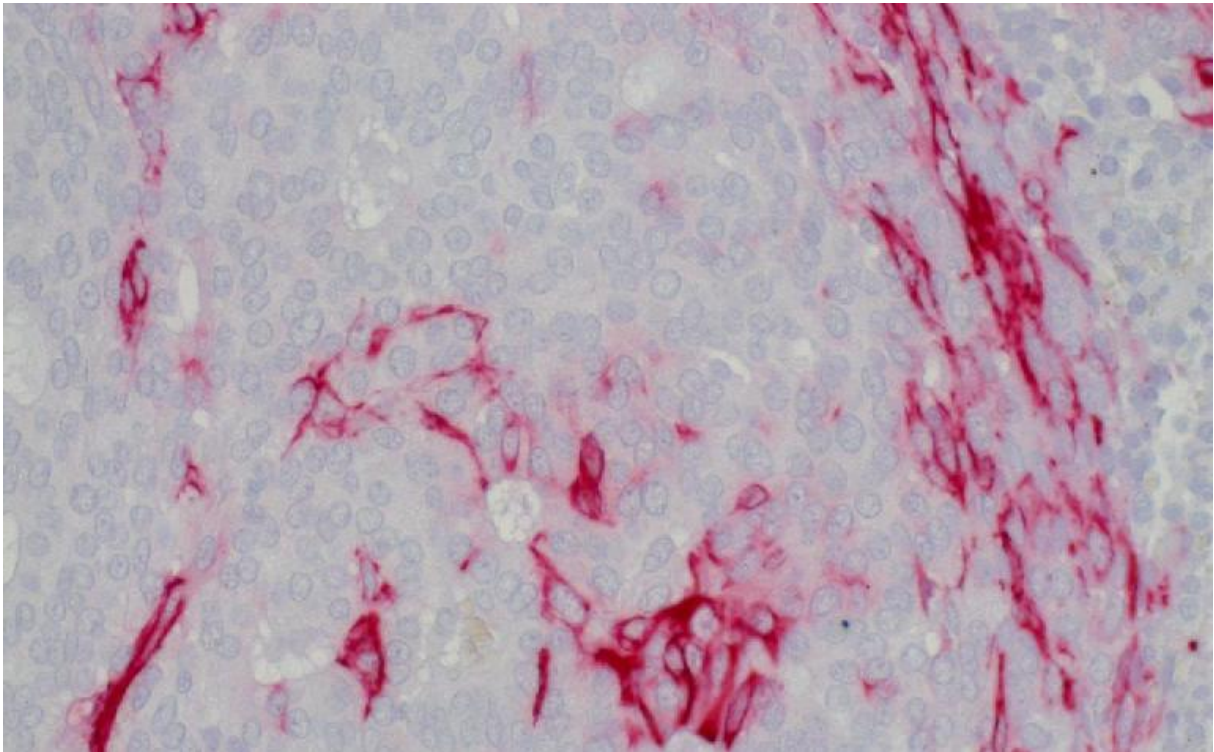


Abb. 3.4.12: Partielle immunhistochemische Positivität für Zytokeratin 5 (CK5). Derselbe Tumor ist negativ für Zytokeratin 7 (CK7) (nicht dargestellt). Dies spricht für unreife bzw. für Intermediärzellen.

Eosinophiles MEC

Das zweithäufigste variante MEC dieser Studie war das eosinophiles (onkozytoides) MEC, von dem 5 Fälle vorlagen. Dieser Subtyp zeichnet sich durch das Vorherrschen mittel- bis großer Zellen mit sich stark eosinophil anfärbendem Zytoplasma ohne squamoide Differenzierung aus (siehe Abb. 3.4.13). Die Tumorzellen zeigten entweder eine glanduläre Differenzierung, die stark reifen Streifenstücken ähnelten (siehe Abb. 3.4.14) oder sie waren solide organisiert und wiesen zentral lokalisierte Zellkerne auf, so dass das Bild eines onkozytären Karzinoms nachgeahmt wurde (siehe Abb. 3.4.15). Gelegentlich kamen beide Veränderungen nebeneinander vor. Alle Tumoren zeigten jedoch auch klassische MEC-Abschnitte, fokal epitheloide Differenzierung und verstreute Schleimzellen, so dass die Differenzierung zum onkozytischen Karzinom gelang (siehe Abb. 3.4.16).

Der Tumor, der in Abb. 3.4.13 dargestellt ist, war aus großen, zystischen Drüsenstrukturen, die von onkozytären, teils Zilien-tragenden Zellen begrenzt waren und teils papilläres Wachstumsmuster zeigten, zusammengesetzt. Dies erinnert an Warthin Tumoren. Im

Gegensatz zu diesen fanden sich abschnittsweise jedoch Schleimzellen und andere für das Mukoepidermoidkarzinom typische Histologien. Ferner fehlte das für Warthin Tumoren typische lymphoide Stroma. Im Gegenteil war das Stroma hypervaskularisiert.

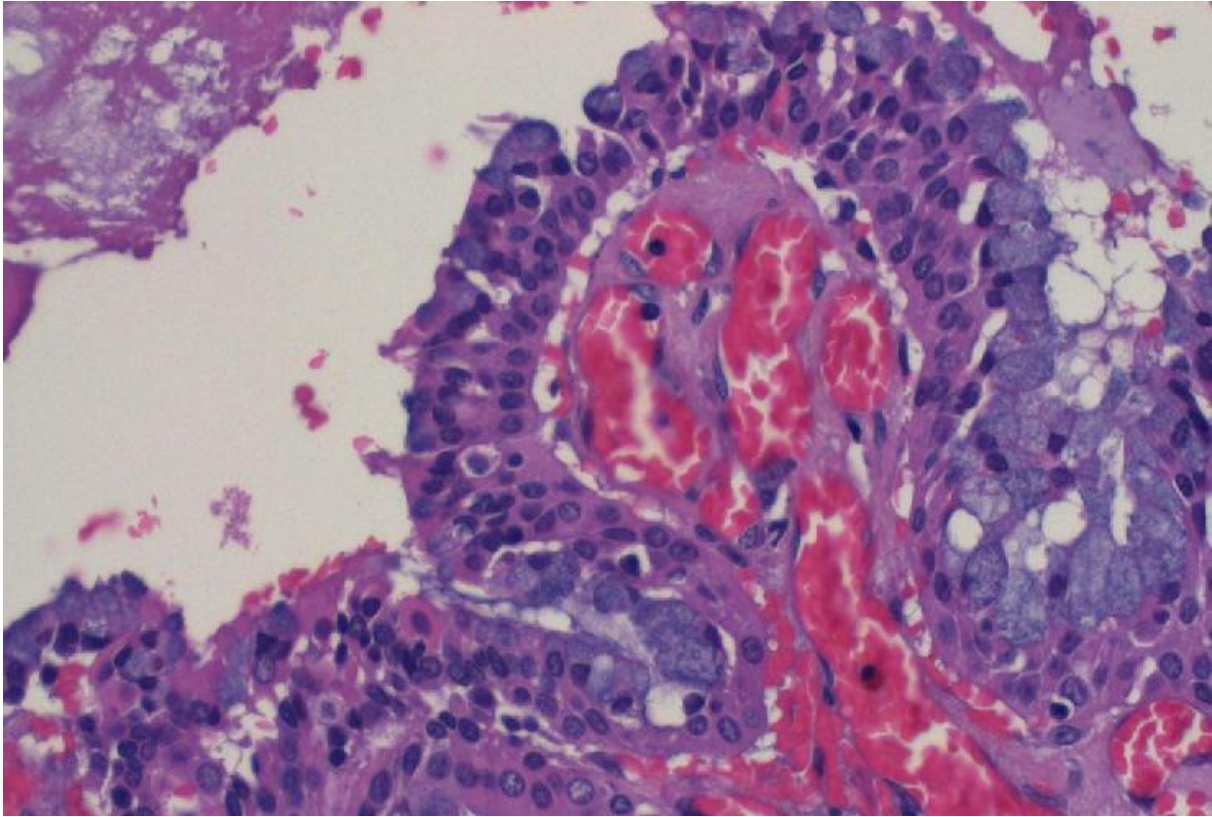


Abb. 3.4.13: Eosinophiles MEC (G1) mit zystischen Anteilen: onkozytäre Zellen begrenzen eine Zystenwand. Es entsteht der Eindruck eines Warthin Tumors mit Mukozellmetaplasie. Allerdings findet sich kein lymphoides Stroma, sondern eine stromale Hypervaskularisation.

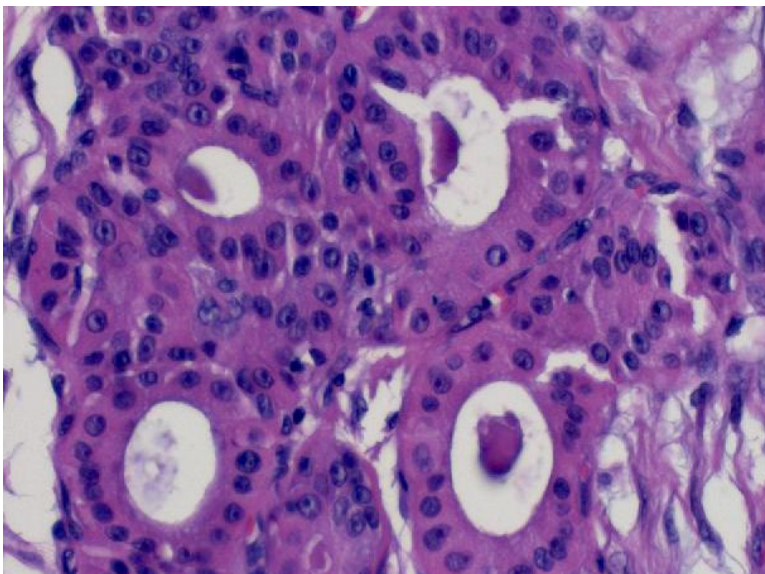


Abb. 3.4.14: MEC aus obiger Abb. (3.4.13): die neoplastischen Tubuli ähneln stark den Streifenstücken normaler Speicheldrüsen.

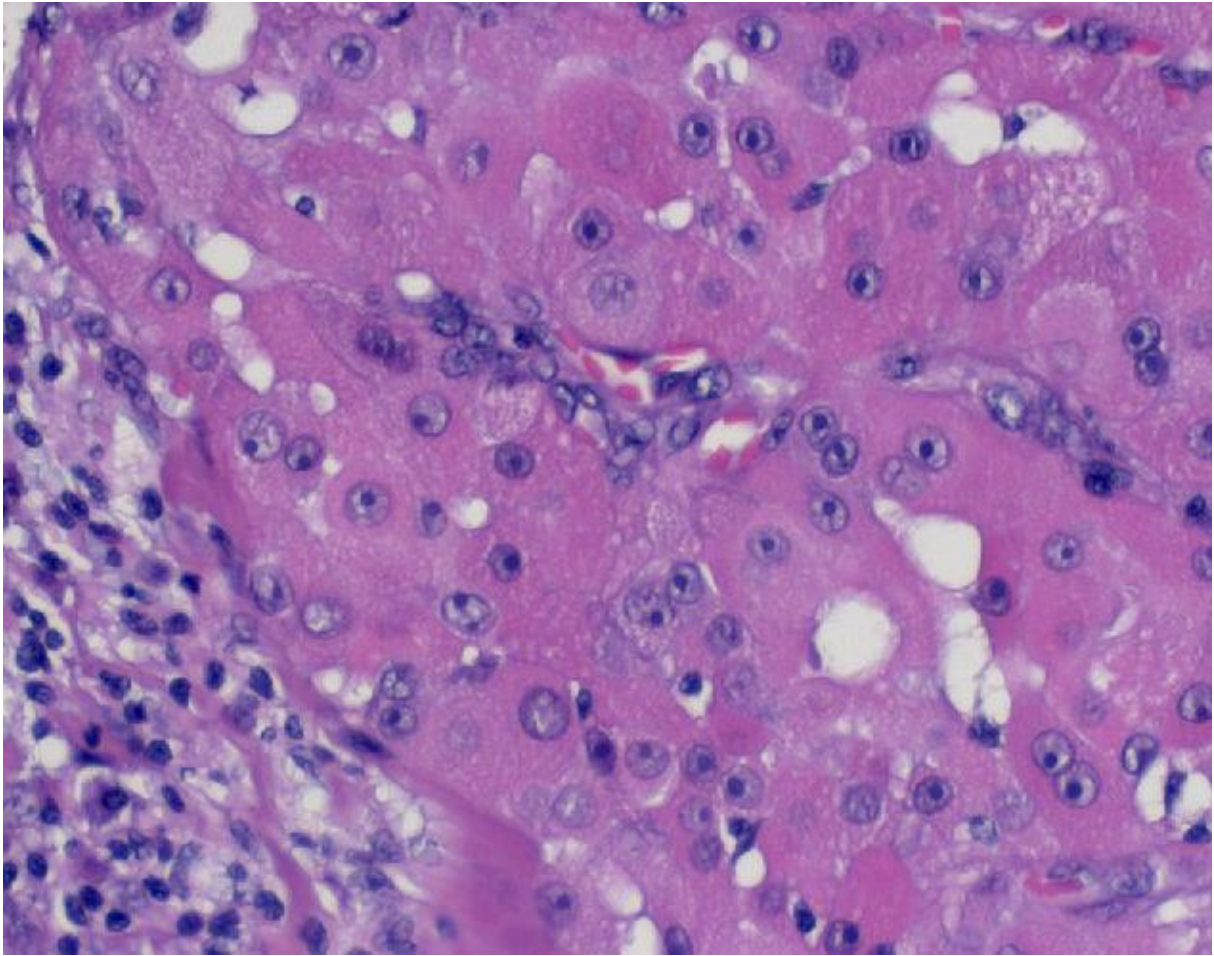


Abb. 3.4.15: Eosinophiles MEC mit soliden Abschnitten mit onkozytären Zellen.

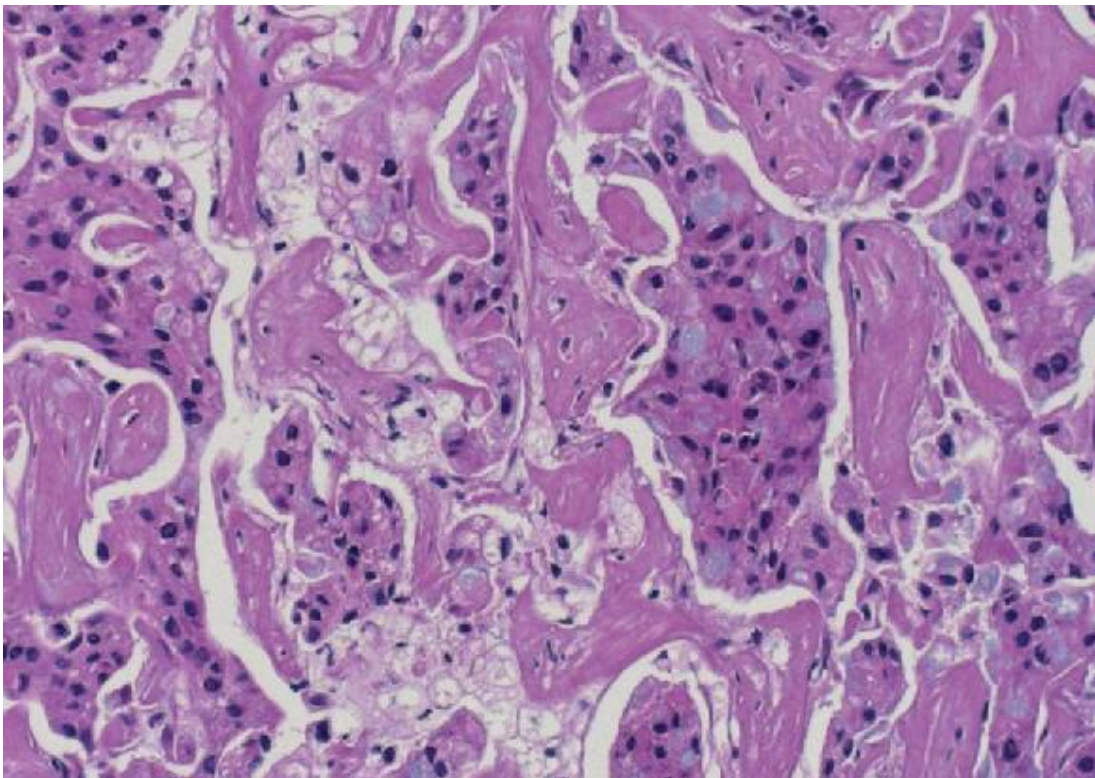


Abb. 3.4.16: Sklerosierende Form eines eosinophilen MEC mit eingestreuten Mukuszellen und soliden Intermediärzellabschnitten.

Klarzelliges MEC

Das klarzellige MEC zeigte sich mit einer Häufigkeit von 7,5% (n=3) und war damit die seltenste Unterart in dieser Sammlung. Es ist gekennzeichnet durch polygonale, mittelgroße Zellen mit hellem Zytoplasma in soliden Verbänden und gelegentlich schwach eosinophilen Tumorzellen (siehe Abb. 3.4.17 und 3.4.18). Das Bild des klarzelligen MEC ähnelte in manchen Fällen im Erscheinungsbild dem klarzelligen Nierenzellkarzinom. Im Gegensatz zum klarzelligen Karzinom NOS (nicht anders spezifiziert) fehlten allerdings die typische Zellanordnung in Nestern sowie auch hyalinen Banden aus Kollagen. Schließlich gelang die Differentialdiagnose durch Areale mit typischem MEC-Muster und Mukuszellen (siehe Abb. 3.4.18).

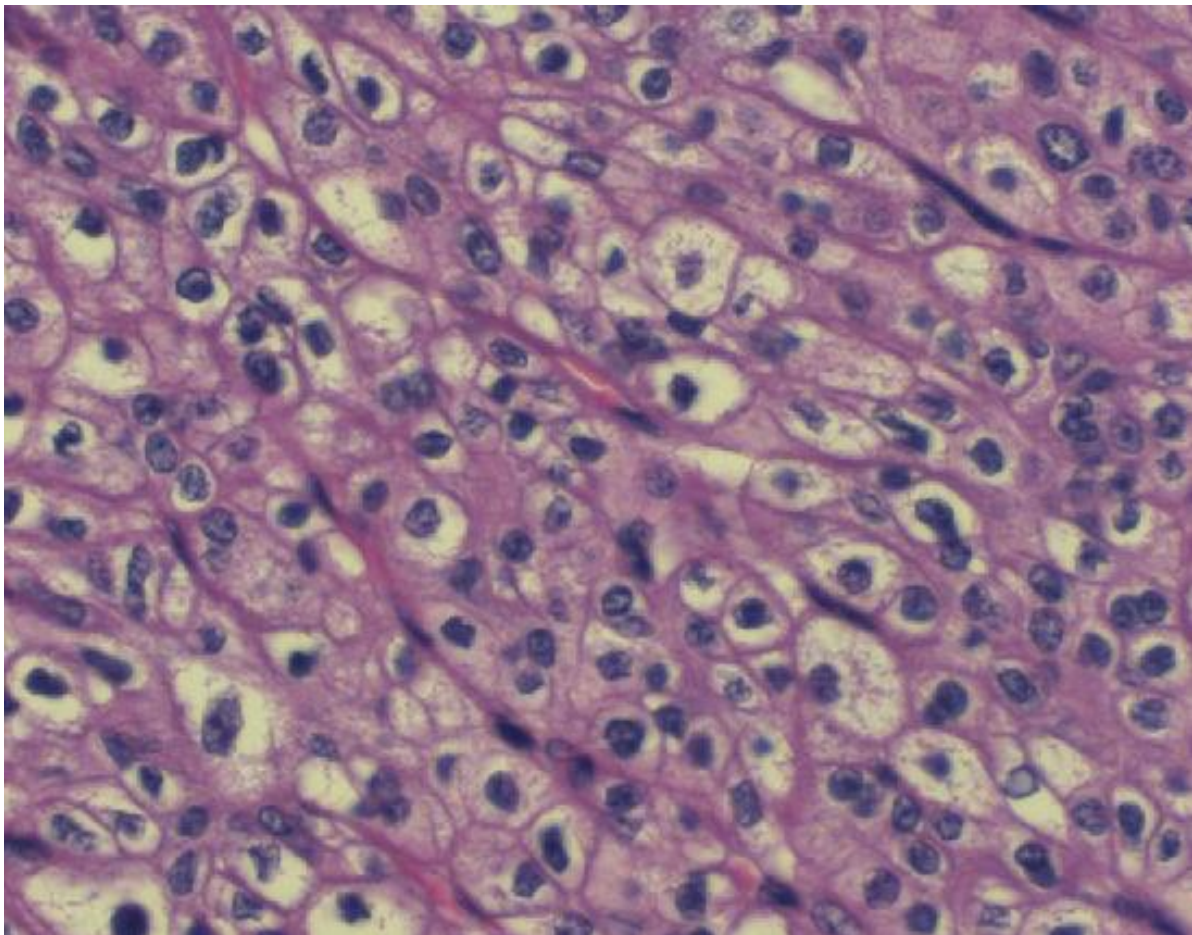


Abb. 3.4.17: Klarzelliges MEC mit schwach bis kaum eosinophil sich anfärbendem Zytoplasma der sich im Verband befindlichen Tumorzellen.

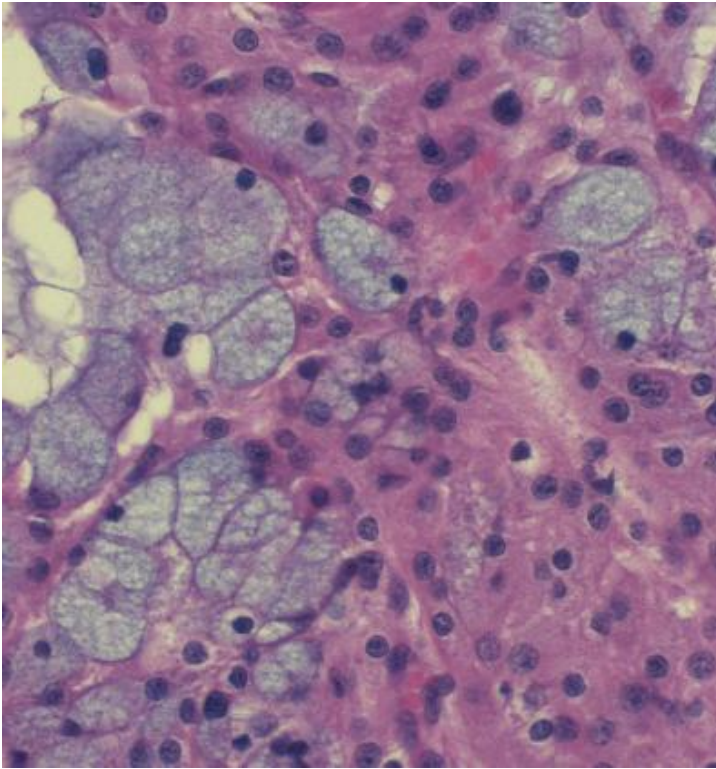


Abb. 3.4.18: Klarzelliges MEC: auch hier finden sich abschnittsweise die klassischen histologischen MEC-Muster.

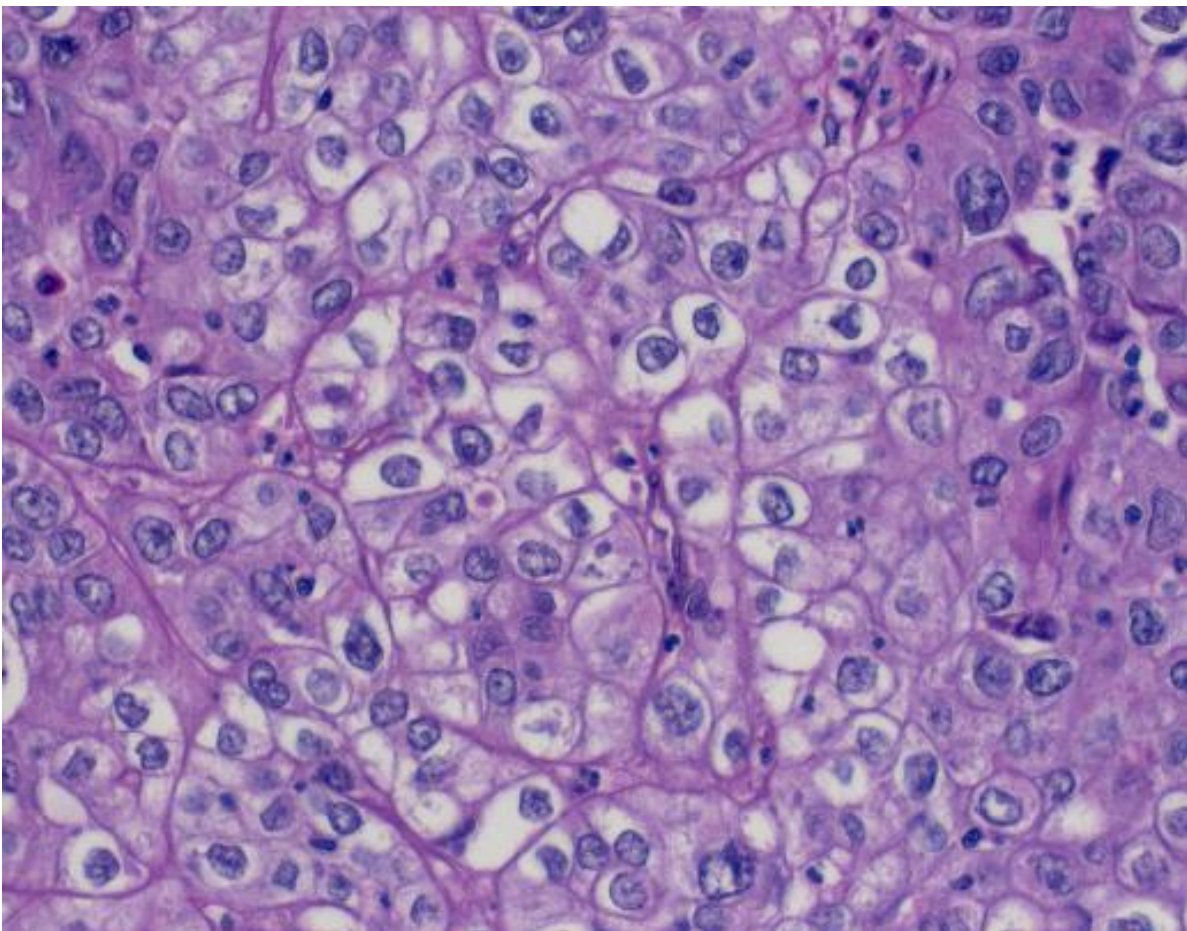


Abb. 3.4.19: Klarzelliges *high grade*-MEC mit hohem Kernpolymorphismus.

3.4.2 Auftreten der Translokation t(11;19) bei den Mukoepidermoidkarzinomen

Die Translokation t(11;19) trat in 25 von 40 untersuchten Fällen von Mukoepidermoidkarzinomen auf (62,5%). Hierunter waren unter den klassischen MEC 19 von 23 (82,6%) und unter den varianten Formen 6 von 17 (35%) Tumoren betroffen. Der klarzellige Typ war in 100% der Fälle betroffen, der squamoide Typ in 11%. Die eosinophile Form lag mit 40% in der Mitte.

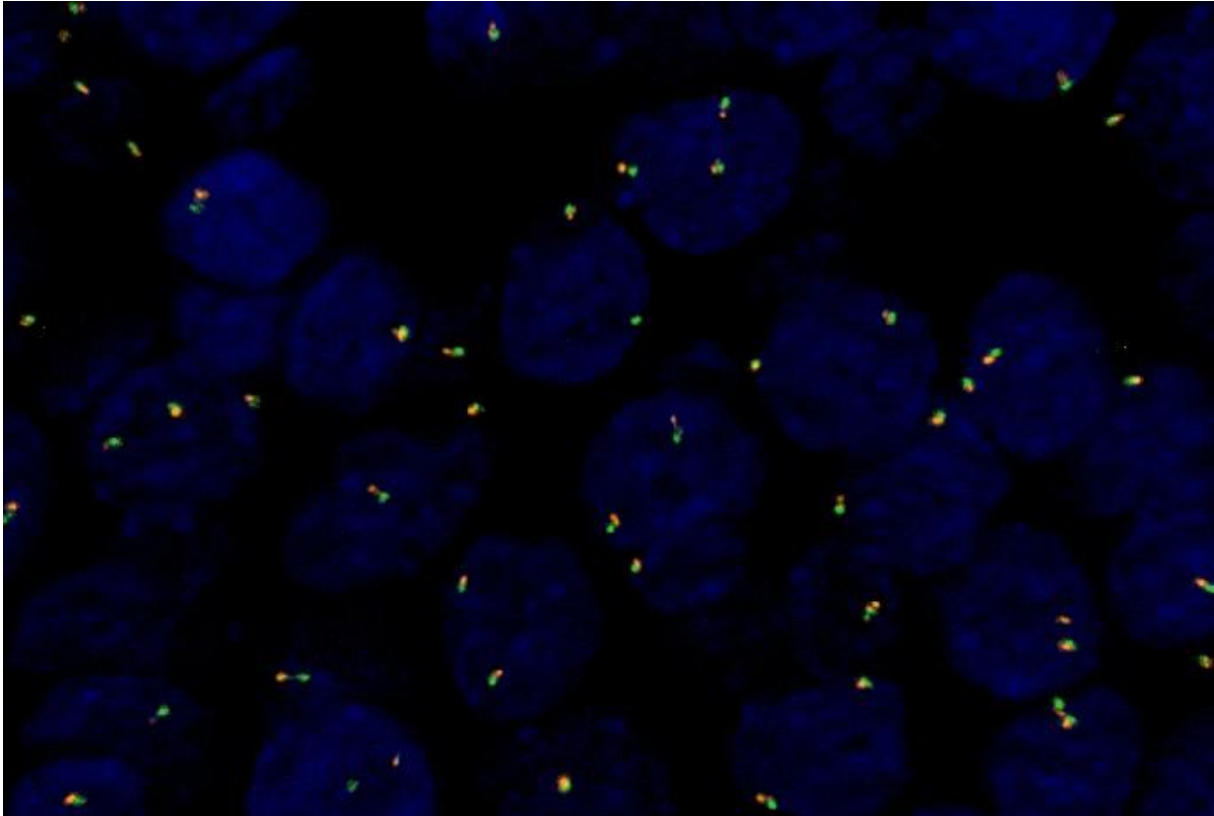


Abb. 3.4.20: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für die Translokation t(11;19) bei einem squamoiden MEC: Normalbefund (keine Translokation), da kein *break-apart* stattgefunden hat – die grünen und roten Signale liegen dicht nebeneinander.

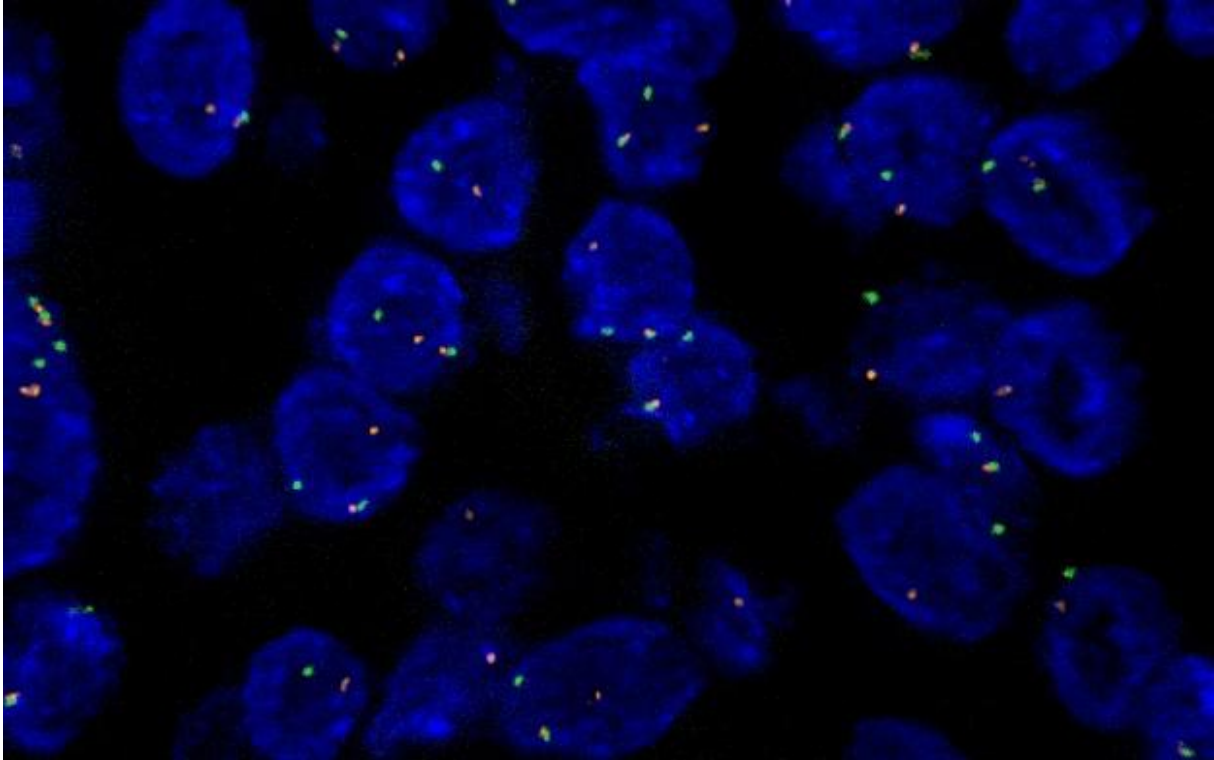


Abb. 3.4.21: Klarzelliges MEC mit Translokation: neben einem rot-grünem Signal (kein *brake-apart*) liegt je ein rotes und ein grünes Splitsignal vor (*brake apart*).

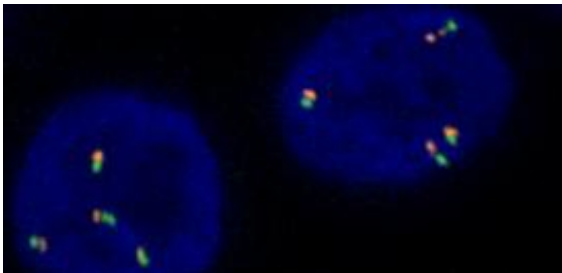


Abb. 3.4.22: MEC ohne Translokationsnachweis. Nebenbefundlich zeigt sich eine Polysomie von Chromosom 11.

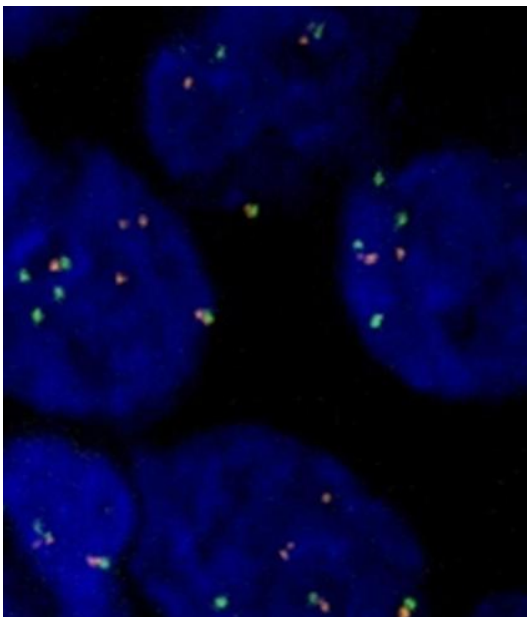


Abb. 3.4.23: Polysomie von Chromosom 11 bei bi- oder triallelicher Translokation.

3.4.3 Assoziationen zwischen den histologischen Subtypen und der Translokation t(11;19) mit klinisch-pathologischen Parametern

Die verschiedenen Subtypen des Mukoepidermoidkarzinoms wurden mit verschiedenen klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium, *Grading* und dem Vorkommen der Translokation t(11;19) korreliert, wie aus Tabelle 3.4.1 zu ersehen ist. Hierbei zeigte sich für den klassischen Typ, dass dieser eher bei jüngeren Patienten (mittleres Alter 42 Jahre, Spannweite 11-80 Jahre, $p < 0,001$) und mit einem niedrigeren Malignitätsgrad (G1, $p < 0,001$) auftrat als die anderen Subformen. Zudem wies er die Translokation t(11;19) in 82% auf, wobei diese Assoziation im Vergleich zu den anderen Unterformen signifikant war ($p = 0,003$).

Im Gegensatz dazu trat die squamoide Variante bevorzugt bei Älteren (mittleres Alter 68 Jahre, Spannweite 37-94 Jahre, $p = 0,03$) und als *high* oder *intermediate grade*-Tumor auf ($p < 0,001$). Zudem waren häufiger die großen Speicheldrüsen betroffen (*Glandula parotidea* und *Glandula submandibularis*) ($p = 0,055$). Diese Präferenz zeigte sich nicht beim klassischen Typ. Die Translokation lag beim squamoiden MEC in 11,1% vor und insgesamt bei allen nicht-klassischen Subtypen in 35%. Hierbei war die negative Assoziation des squamoiden MEC mit der Translokation hochsignifikant ($p = 0,001$).

Eine Assoziation der verschiedenen Varianten mit dem Geschlecht oder dem Tumorstadium konnte nicht gefunden werden.

Es zeigte sich, dass die Translokation t(11;19) signifikant mit *low grade*-Tumoren assoziiert war, nicht jedoch mit dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorlokalisation oder dem Stadium (siehe Tabelle 3.4.2).

		Klas- sischer Typ	Klarzelliger Typ	Eosino- philer Typ	Squamoider Typ	Fisher's exakter Test	Fisher's exakter Test
						klassisch vs. variant	squamoid vs. variant
Alter	≤60 Jahre (n=24)	19	1	2	2	p<0.001	p=0.03
	>60 Jahre (n=16)	4	2	3	7		
Geschlecht	männlich (n=13)	7	0	2	4	n.s.	n.s.
	weiblich (n=27)	16	3	3	5		
Ursprung	Gl. parotidea (n=24)	10	2	4	8	p=0.125 ^a	p=0.055 ^a
	Gl. submandibularis (n=4)	2	1	0	1		
	Mundhöhle (n=12)	11	0	1	0		
Stadium	I (n=16)	12	1	2	1	p=0.107 ^b	p=0.061 ^b
	II (n=12)	5	1	2	4		
	III (n=6)	2	0	1	3		
	IV (n=6)	4	1	0	1		
Grade	1 (n=27)	22	2	3	0	p<0.001 ^c	p<0.001 ^c
	2 (n=3)	1	0	1	1		
	3 (n=10)	0	1	1	8		
t(11;19)	negativ	4	0	3	8	p=0.003	p=0.001
	positiv	19	3	2	1		
Fallzahl		23	3	5	9		

^a Große vs. kleine Drüsen

^b Stadium I vs. II, III und IV

^c Grade G1 vs. G2 und G3

Tabelle 3.4.1: Verteilung klinisch-pathologischer Parameter auf die verschiedenen Subtypen des MEC

		t(11;19)	t(11;19)	Fisher's Exakter Test
		negativ	positiv	
Alter	≤60 Jahre (n=24)	6	18	p=0.094
	>60 Jahre (n=16)	9	7	
Geschlecht	Männlich (n=13)	6	7	n.s.
	Weiblich (n=27)	9	18	
Ursprung	Gl. Parotis (n=24)	9	15	n.s. ^a
	Gl. submandibularis (n=4)	2	2	
	Mundhöhle (n=12)	4	8	
Stadium	I (n=16)	5	11	n.s. ^b
	II (n=12)	5	7	
	III (n=6)	3	3	
	IV (n=6)	2	3	
Grade	1 (n=27)	5	22	p=0.001 ^c
	2 (n=3)	3	0	
	3 (n=10)	7	3	
Fallzahl		15	25	

^a Große vs. kleine Drüsen

^b Stadium I vs. II, III und IV

^c Grade 1 vs. G2 and G3

Tabelle 3.4.2: Untersuchung der Translokation t(11;19) hin auf Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern

3.4.4 Die prognostische Bedeutung von klinisch-pathologischen Parametern bei MECs

Die prognostische Bedeutung verschiedener klinisch-pathologischer Parameter wurde mittels Kaplan-Meier Analyse überprüft (siehe Diagramm 3.4.1). Hierbei zeigte sich, dass ein kurzes Gesamtüberleben signifikant assoziiert war mit einem Alter über 60 Jahren ($p=0,001$), einem hohen UICC Tumorstadium (II, III, IV versus I; $p=0,031$), einem Tumorresiduum nach Operation ($p<0,001$) und einem höheren Grade (G2 und G3 versus G1; $p=0,001$). Hingegen beeinflussten das Geschlecht und die Lokalisation das Überleben nicht signifikant. Die Translokation t(11;19) war mit besserem Überleben assoziiert, allerdings nicht signifikant

($p=0,098$). Unter den verschiedenen Subtypen zeigte das klassisch MEC die beste Prognose, während die anderen Unterformen signifikant negative Prognosefaktoren darstellten ($p=0,002$).

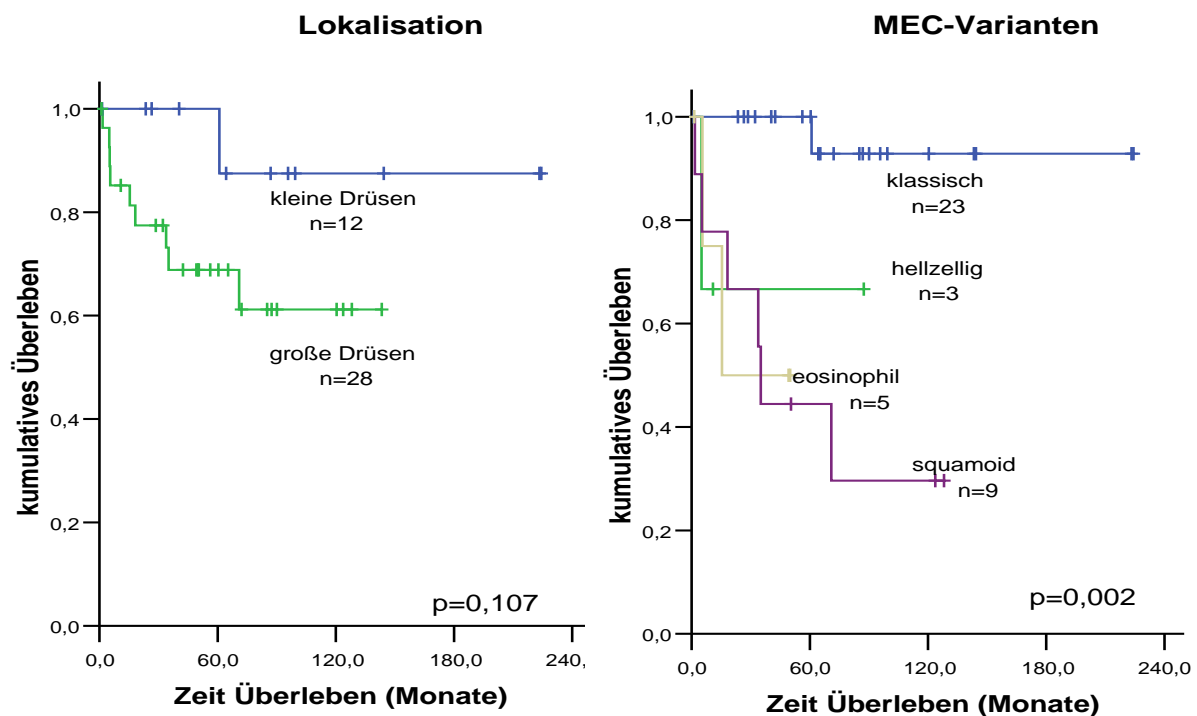
Um das Verhalten der relevanten Prognosefaktoren im Zusammenspiel zu überprüfen, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass der Subtyp des MEC stark mit dem *Grade* assoziiert war, wurden zwei Analysen durchgeführt: eine mit dem *Grade* (G1 versus die anderen) und eine mit dem Subtyp (squamoid versus die anderen). Die anderen, in das Regressionsmodell integrierten Parameter waren die Nämlichen, deren prognostische Signifikanz sich in der univariaten Kaplan-Meier Analyse gezeigt hatte: Alter, höheres *Grade*, Tumorstadium und Tumorresiduum. Das Cox-Regressionsmodell wurde in zwei reversen Schritten adjustiert, um einen nicht signifikanten Parameter auszuschließen, das Tumorstadium (*Stage*). Hohes Alter, höheres *Grade*, Residualtumor und die squamoide Subform bestätigten sich als signifikante Prognosefaktoren, wobei die Werte der *Hazard ratio* zwischen 4,7 und 18,0 lagen.

		Univariate Analyse	Multivariate Analyse	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall
Alter	≤60 Jahre (n=24) vs. >60 Jahre (n=16)	p=0.001	p=0.05	5.1	1.0-26.9
Stadium	Stadium I (n=16) vs. II-IV (n=24)	p=0.031			
Grade	Grade G1 (n=27) vs. G2 und G3 (n=13)	p=0.001	p=0.04	5.4	1.1-28.4
Resttumor	R0 (n=37) vs. R1-2 (n=3)	p<0.001	p=0.10	4.7	0.74-30.0

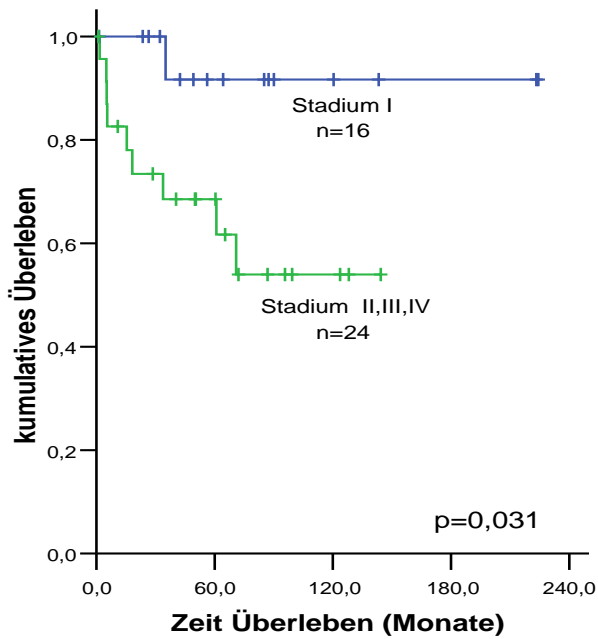
Tabelle 3.4.3: Univariate und multivariate Analyse mit Cox-Regression unter stufenweiser Selektion (2 reverse Schritte, Angabe der jeweiligen p-Werte)

		Univariate Analyse	Multivariate Analyse	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall
Alter	≤60 Jahre (n=24) vs. >60 Jahre (n=16)	p=0.001	p=0.10	4.3	0.8-24.0
Stadium	Stadium I (n=16) vs. II - IV (n=24)	p=0.031			
Subtyp	squamoid (n=9) vs. andere (n=31)	p=0.007	p=0.05	4.7	1.0-20.7
Resttumor	R0 (n=37) vs. R1-2 (n=3)	p<0.001	p=0.01	18.0	2.1-152.8

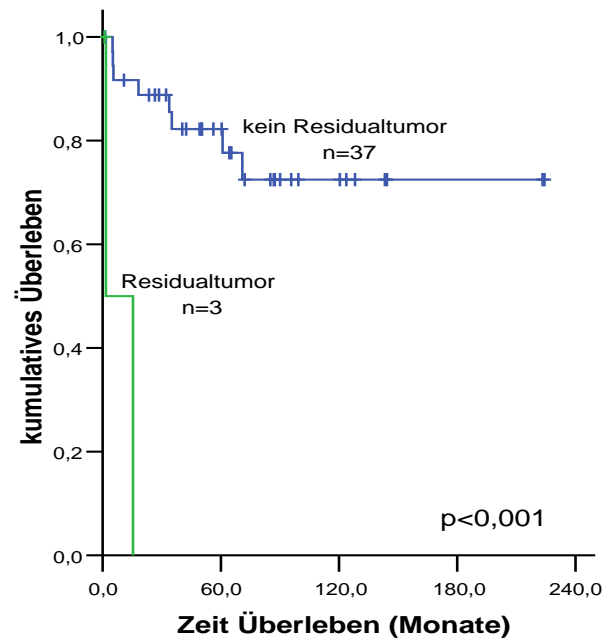
Tabelle 3.4.4: Univariate und multivariate Analyse mit Cox-Regression unter stufenweiser Selektion (2 reverse Schritte): anstatt des *Gradings* ging der histologische Subtyp in das Modell ein.



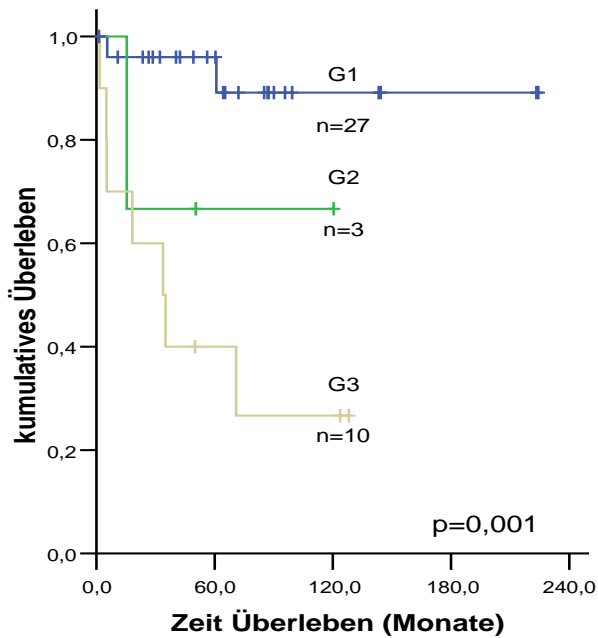
Stadium I vs. II, III, IV



Residualtumor



Grading



Translokation t(11;19)

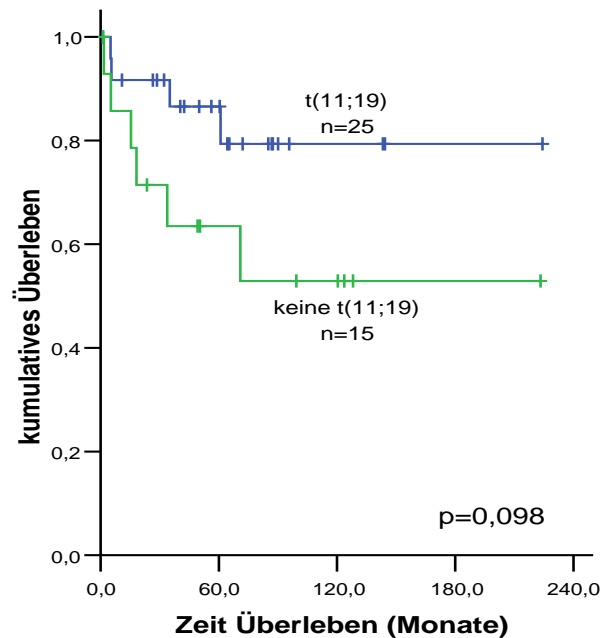


Diagramm 3.4.1: Darstellung der untersuchten prognostischen Faktoren mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse mit Angabe der Signifikanzwerte p

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich allgemeiner klinisch-pathologischer Faktoren und der Wachstumsfaktorrezeptoren

4.1.1 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich allgemeiner klinisch-pathologischer Faktoren

Speicheldrüsenkarzinome weisen ein breites Spektrum verschiedener Tumorentitäten auf. Hierbei lassen sich zwei Gruppen bilden: diejenige der niedrigmalignen Karzinome und diejenige der hochmalignen. Entsprechend resultieren unterschiedliche Überlebenskurven mit einem hochsignifikant schlechteren Überleben bei den hochmalignen Tumoren sowohl bei uni- als auch multivariater Betrachtung. Dies, sowie die Assoziation der Einordnung der jeweiligen Tumoren in die Malignitätsgruppen (hoch- bzw. niedrigmaligne Tumoren) mit dem *Grading* deutet zum Einen auf die Relevanz des etablierten Gradingystems im Allgemeinen hin, zum Anderen zeigt sich hieran die Richtigkeit der Eingruppierung der Tumoren in dieser Arbeit, was als positive interne Kontrolle eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der weiteren Parameter darstellt. Jedoch wird, aufgrund der hohen Diversität verschiedener Speicheldrüsenmalignome mit unterschiedlichen strukturellen und zytologischen Mustern und aufgrund der Tatsache, dass bei einigen Entitäten, wie etwa den MEC, weitere histologische Subtypisierungen möglich sind, bei einigen Karzinomen die Tumormalignität durch den Tumortyp bzw. -subtyp definiert. Deshalb ist die konkrete Einordnung einer Entität in die Gruppe der niedrig- bzw. hochmalignen Tumoren, was letztlich aus der klinischen Erfahrung abgeleitet ist, nicht unüblich. Vielmehr ist eine generelle Anwendung eines differenzierten drei- oder viergliedrigen Tumorgraduierungssystems (G1-G3 oder G1-G4) umstritten.⁴⁴

Die von der UICC zugrunde gelegte Stadieneinteilung der Speicheldrüsenkarzinome konnte in ihrer prognostischen Relevanz bestätigt werden. Sowohl bei uni- als auch multivariater Betrachtung stellt das Tumorstadium einen hochsignifikanten Prognosefaktor für das

Überleben dar. Daraus ergibt sich die Bedeutung eines korrekten Tumorstaging als wesentlicher Schritt zur korrekten Einschätzung der jeweiligen Situation des Patienten. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten wie etwa von Lima et al., Bell et al., Frankenthaler et al. oder Schramm et al. konnte gezeigt werden, dass sowohl korrektes *Staging* als auch *Grading* als sehr wichtige Prognostika dienen.^{49,10,82,30}

Manche Autoren, wie beispielsweise Renehan et al., messen dem Tumorstadium, insbesondere der Tumorgröße, unter den klinischen Parametern die größte Bedeutung hinsichtlich der Prognose bei.⁷⁶ In Arbeiten wie von Armstrong et al. wird von *high grade* Tumoren berichtet, die im Stadium I und II ebenso günstige Prognosen aufwiesen wie *low grade* Tumoren, da es sich um kleine Tumoren handelte.¹ Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Cox-Regressionsmodell weist jedoch beide Variablen auf. Sicherlich können das *Grading* oder der Tumortyp nicht ausschließlich betrachtet werden, sondern nur im Kontext mit der Tumorausdehnung. Umgekehrt jedoch würde eine ausschließliche Betrachtung des TNM-Status der biologischen Natur der jeweiligen Tumoren nicht gerecht. Diesen Zusammenhang bestätigt das Regressionsmodell.

Eine gebräuchliche prognostische Orientierungshilfe stellt die sogenannte "4 cm Regel" dar, der zufolge Tumoren mit einem Durchmesser unter 4 cm prognostisch relativ günstig sind und ein besseres Überleben bei geringerem Risiko für lokoregionäre Rezidive oder Fernmetastasen aufweisen. Entsprechend verhält es sich umgekehrt mit Tumoren über 4 cm Durchmesser. Ferner wurde gezeigt, dass eine adjuvante Strahlentherapie nur bei letzteren eine Verbesserung des Überlebens, bei kleineren Tumoren jedoch keinen Nutzen bringt.^{1,85} Die prognostischen Unterschiede in Abhängigkeit von der Tumorgröße bei einem Grenzwert von 4 cm spiegeln sich im TNM-System und der Stadieneinteilung wider. Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden: die Überlebenskurven zeigen einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Stadien III und IV gegenüber den Stadien I und II.

In dieser Arbeit zeigte sich ein hochsignifikant schlechteres Überleben für das männliche Geschlecht in der univariaten Analyse. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in anderen Studien erhoben, wenngleich diese in der Literatur kontrovers diskutiert werden.^{30,44,93} Besseres Überleben bei weiblichem Geschlecht stellt dabei wohl keinen eigenständigen prognostischen Faktor dar, da Frauen hochsignifikant eher niedrigmaligne Tumorentitäten aufwiesen (p=0,001). So waren beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom nur 16 % der

Patienten dieser Tumorsammlung weiblich. Aus diesem Grund wurde die Variable „Geschlecht“ aus dem Regressionsmodell eliminiert. Auch Terhaard et al. fanden bei Frauen gehäuft Azinuszellkarzinome, Mukoepidermoidkarzinome oder adenoid-zystische Karzinome.⁹³ Der Grund für die Präferenz niedrigmaligner Tumoren bei Frauen bzw. hochmaligner Tumoren bei Männern bleibt unklar. Jedoch wurde in Speicheldrüsenangkarzinomen, Karzinomen aus pleomorphen Adenomen sowie Adenokarzinomen NOS immunhistochemisch eine vermehrte Expression von Androgenrezeptoren nachgewiesen, nicht jedoch bei niedrigmalignen Tumoren wie etwa dem Azinuszellkarzinom.⁹⁰ Androgene könnten womöglich eine Rolle bei der Tumorprogression und der Ausbildung höhermaligner Karzinome spielen, analog zu Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen. Tatsächlich konnte in einem Fall eines Androgenrezeptor-positiven Adenokarzinoms der *Glandula parotidea* eine komplette Remission durch Therapie mit LHRH-Agonisten, also einer Androgendeprivationstherapie, erreicht werden.⁵⁰ Dies stützt die These von der Bedeutung von Sexualsteroiden bei Speicheldrüsenkarzinomen, die an den intersexuellen Unterschieden bezüglich des Malignitätsgrades der Tumoren ursächlich beteiligt sein könnten. Dieser Zusammenhang müsste in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Ein Erkrankungsalter über 60 Jahren stellte eine wesentliche prognostische Variable dar und spricht für hochsignifikant schlechteres Überleben. Dieses Ergebnis dürfte nicht allein auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass ältere Menschen an sich eine geringere verbleibende Lebenserwartung haben, wenn man sich die Überlebenskurve genauer ansieht: der stärkste Abfall lebender Patienten im Vergleich zu unter 60 Jährigen liegt in den ersten 50 Monaten nach Diagnosestellung. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass höheres Alter auf ein schlechteres Überleben hinweist.^{10,30,44,93}

In Bezug auf die Tumorlokalisation konnte in der univariaten Analyse ein signifikanter Unterschied im Überleben gefunden werden, abhängig davon, ob die großen oder die kleinen Speicheldrüsen betroffen waren. Allerdings zeigte sich hierbei eine hochsignifikante Assoziation zwischen Lokalisation und Tumorgrade: in den großen Speicheldrüsen fanden sich häufiger Tumoren höheren Malignitätsgrades (*Grade* >G1). Dies mag ein Grund sein, weshalb die Tumorlokalisation als Variable aus dem Regressionsmodell mangels Signifikanz

eliminiert wurde. Sie wird auch in anderen Arbeiten kontrovers diskutiert bzw. als nicht signifikant eingestuft.^{10,44}

4.1.2 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich des EGFR-Status

Das EGFR-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert. Neben der Untersuchung auf Genamplifikation hin wurde entsprechend auch auf eine mögliche Vervielfachung des Chromosoms 7 geachtet unter der Prämisse, dass eine mittels FISH nachweisbare Centromervervielfachung einer Chromosomenvervielfachung entspricht und kein Phänomen ausschließlich der Centromerregion darstellt. Dies lag bei 20,0% der Speicheldrüsenkarzinome vor, in 8,2% in Form einer Trisomie, in 11,8% im Sinne einer hochgradigen Polysomie. Hierbei zeigte sich für die Trisomie eine relativ gleichmäßige Verteilung sowohl auf Tumoren niedriger als auch hoher Malignität. Es wurde hierbei keine signifikante Assoziation mit, sondern lediglich eine Tendenz zu höherem Tumorstadium oder höherem *Grade* gefunden. Auch in der Überlebensanalyse zeigte sich eine Tendenz zu schlechterem Überleben, jedoch keine Signifikanz. Jedoch fanden sich signifikant häufiger Tumorrezidive bei trisomen Fällen. Darüber hinaus zeigten Tumoren mit Trisomie 7 signifikant häufiger zugleich eine Trisomie 17 ($p=0,003$). In einem Fall eines squamösen Mukoepidermoidkarzinoms fand sich neben der Trisomie 7 auch eine Genamplifikation von EGFR. Der Tumor hatte einen Differenzierungsgrad G3 und lag im Stadium III vor. Ein Zusammenhang zwischen Trisomie 7 und positiver Immunhistochemie zu EGFR wurde nicht gefunden.

Fälle mit hochgradiger Polysomie von Chromosom 7 verteilten sich dahingegen ausnahmslos auf das hochmaligne Spektrum. Zwar lag auch in einem Fall eines Mukoepidermoidkarzinoms eine hohe Polysomie 7 vor, doch lässt sich dieses mit einem *Grade* G3 ebenso zu den *high grade* Tumoren rechnen.

Eine hochgradige Polysomie 7 war signifikant mit einem höheren Tumorstadium (III oder IV) und hochsignifikant mit einem *Grade* G3 assoziiert. Zudem waren die Patienten signifikant häufig über 60 Jahre alt. Ferner zeigte sich hochsignifikant häufig zugleich eine hochgradige Polysomie von Chromosom 17 und signifikant häufig eine Trisomie von Chromosom 17. Eine hochgradige Polysomie 7 ist somit womöglich kein singuläres Phänomen, sondern tritt häufig

zusammen mit anderen chromosomalen Aberrationen auf und deutet auf genetische Instabilität hin. Dies mag der Grund dafür sein, dass diese aus dem Regressionsmodell eliminiert worden ist. Zwar zeigte sich bei univariater Betrachtung ein hochsignifikant schlechteres Überleben in der Kaplan-Meier-Analyse, doch bestätigte sich keine Signifikanz in Zusammenschau mit den anderen Faktoren im Regressionsmodell.

In nur 1,9 % (5 Fälle) zeigte sich eine Genamplifikation von EGFR. Eine Genamplifikation von EGFR ohne Polysomie 7 ist somit ein eher seltenes Phänomen. Dennoch ist bemerkenswert, dass 80% G3-Tumoren waren und alle Tumoren ein fortgeschrittenes Stadium (>II) aufwiesen. Auch war das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe stark herabgesetzt.

In einer anderen Arbeit mit FISH-Untersuchungen speziell von Speicheldrüsenangkarzinomen zeigte sich in einem Viertel der Fälle eine Trisomie/Polysomie von Chromosom 7 (>2,5 Chromosomen 7 pro Zelle), die mit signifikant schlechterem Überleben einherging. Hierbei wurde keine signifikante Assoziation zwischen EGFR und Her2 Befunden gefunden, wenngleich manche Tumoren numerische Veränderungen beider Chromosomen, Chromosom 7 und 17, zeigten. Eine Koexpression von EGFR und Her2 in der Immunhistochemie trat dabei in 20% der Fälle auf.¹⁰² Die Autoren schließen, dass es sich um unabhängige Marker handeln müsse, was den hier vorliegenden Ergebnissen widersprechen dürfte. Allerdings bleibt zu bedenken, dass in der vorliegenden Arbeit eine wesentlich höhere Fallzahl und im Gegensatz zu der erwähnten Untersuchung zu EGFR und Her2 von Williams et al. eine Vielzahl unterschiedlicher Speicheldrüsenkarzinome untersucht wurden und somit keine Restriktion auf duktale Adenokarzinome vorlag.

In Untersuchungen, in welchen Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich hinsichtlich Chromosom 7 und EGFR mit FISH betrachtet wurden, resultierten vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Überlebens.^{18,63} Polysomie von Chromosom 7 und/oder Amplifikation von EGFR stellten signifikante Einflussgrößen auf das Überleben auch in der multivariaten Betrachtung dar. Dabei zeigte sich bei Chung et al. eine schwache, nicht mehr signifikante Assoziation zwischen FISH-Status (Polysomie und Amplifikation) und dem Differenzierungsgrad des Tumors, und, anders als in dieser Arbeit, keine Assoziation mit dem Tumorstadium oder dem Alter.¹⁸ Dies könnte an den unterschiedlichen Definitionen des FISH-positiven Status liegen: während bei Chung et al. neben Amplifikationen Polysomien mit $\geq 40\%$ Zellen mit ≥ 4 Centromersignale pro Zelle gezählt wurden, wurde in dieser Arbeit

zwischen Trisomie und hochgradiger Polysomie, letztere gegeben bei $\geq 50\%$ Zellen mit ≥ 4 Centromersignale pro Zelle, unterschieden.

Es wird diskutiert, dass eine höhere Chromosomenzahl zu einer konsekutiv höheren Gendosis von EGFR führt und damit die Prognose verschlechtert. Jedoch muss bedacht werden, dass mit einer Vervielfältigung des Chromosom 7 oder Teilen davon auch andere Gene, zumindest in unmittelbarer Nachbarschaft, in ihrer Zahl vermehrt sind und somit EGFR wahrscheinlich nicht alleine für die Prognoseverschlechterung verantwortlich gemacht werden kann. Solch ein Gen stellt zum Beispiel ECoP (*EGFR-coamplified and overexpressed protein*) dar, welches als Regulator im NF-kappaB-Signalweg fungiert und bei Überexpression womöglich zur Apoptoseresistenz der Zellen führt. Es zeigte sich, dass ECoP bei Polysomie 7 vermehrt exprimiert wird.^{18,72} Entsprechend können auch weitere Gene betroffen sein.

In der hier vorliegenden Speicheldrüsenserie fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hochgradiger Polysomie 7 und positiver Immunhistochemie für EGFR. Dies konnte für die Trisomie nicht nachgewiesen werden. In einer Arbeit, in der kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome hinsichtlich EGFR-Genstatus (FISH) und EGFR-Expression (Immunhistochemie) untersucht wurden, wurde ebenfalls eine Assoziation zwischen Genkopiezahl und positiver Immunhistochemie für EGFR gefunden: Fälle mit hoher Polysomie 7 oder Genamplifikation zeigten eine stärkere Proteinexpression in der Immunhistochemie, während Trisomie 7 oder Disomie niedrigere Immunhistochemiescores aufwiesen.³⁷ Vermutlich stellt die Gendosis von EGFR erst ab einem bestimmten Niveau einen möglichen Mechanismus für vermehrte Genexpression dar. Andererseits könnten diverse weitere Einflüsse „zwischen Gen und Protein“ interkurrieren und einfache Rückschlüsse mit linearer Kausalität verbieten. Denn insgesamt fand sich in der hier vorliegenden Arbeit nur bei 38,5% der Fälle mit positivem Chromosom 7/EGFR-Befund in der FISH (Trisomie, höhere Polysomie, Genamplifikation) eine positive Immunhistochemie zu EGFR und umgekehrt zeigten nur 35,8% der immunhistochemisch positiven Tumoren, bei welchen zugleich der FISH-Status erhoben werden konnte, eine Trisomie oder hochgradige Polysomie 7. Zwei der fünf Fälle mit Genamplifikation von EGFR hatten eine positive Immunhistochemie. Bei der überwiegenden Zahl an Tumoren mit vermehrter EGFR-Expression fand sich also kein Korrelat in der Gen- oder Chromosomenanzahl und diese selbst führte häufig nicht zu vermehrter phänotypischer Nachweisbarkeit von EGFR. In der

Literatur finden sich diesbezüglich widersprüchliche Angaben: entgegen der bereits erwähnten Arbeit zu den Bronchialkarzinomen konnte in anderen Studien kein Zusammenhang zwischen Ploidiegrad/Genamplifikation und Proteinexpression mittels Immunhistochemie oder RT-PCR nachgewiesen werden.^{18,102}

Verschiedene biologische Mechanismen können für die fehlende Proteinexpression trotz erhöhter Gendosis ursächlich sein. Zum Einen könnten überzählige Genkopien epigenetisch durch Methylierung stillgelegt werden und deshalb nicht zum Ausdruck gelangen. Zum Anderen könnten eine erhöhte RNA-Degradation oder aberrantes Splicing vorliegen.^{18,108} Genmutationen oder posttranslationale Veränderungen mögen bedingen, dass die in der Immunhistochemie zur Anwendung kommenden präfomierten Antikörper nicht oder nur vermindert binden, zumal Mutationen im EGFR-Gen durchaus nicht selten sind.¹⁰⁹ Zudem spielen technische Faktoren bei der Immunhistochemie eine große Rolle. Atkins et al. zeigten, dass abhängig von der zur Anwendung kommenden Gewebefixierung und der Dauer der Präparatelagerung die Zahl positiver Immunhistochemiefunde für EGFR in demselben Gewebe mitunter stark variierte, wohl durch Zerstörung exprimierter Rezeptoren bei falscher Behandlung oder zu langer Lagerung.⁴

Umgekehrt lassen sich verschiedene Möglichkeiten nennen, die eine vermehrte Genexpression bei normaler Gendosis verursachen könnten. So wurde für den EGFR-Promotor gezeigt, dass er eine spezielle p53-Bindungsstelle aufweist. Sowohl Wildtyp-p53 als auch mutiertes p53 können so die Promotoraktivität steigern.⁸⁴ Da etwa die Hälfte aller menschlichen Tumoren Mutationen im p53-Gen aufweisen, könnte dieser Mechanismus eine bedeutende Rolle bei der Überexpression von EGFR spielen.¹⁵ Aber auch eine defekte Down-Regulierung der EGFR-Rezeptoren aufgrund fehlender Internalisierung oder mangels lysosomalen Abbaus dürfte bei fortlaufender Bildung neuer Rezeptoren zur Erhöhung deren Dichte in der Zytoplasmamembran führen und eine konsekutiv prolongierte Aktivität der Signalkaskade zur Folge haben. Neben oxidativem Stress kommen hierfür ursächlich Mutationen von EGFR, etwa der zytosolischen Rezeptordomäne, oder anderer Proteine im Abbauweg der Rezeptoren, beispielsweise c-Cbl, in Frage.^{48,101} Schließlich ist an methodologische Gründe für falsch-positive Ergebnisse bezüglich der Proteinexpression zu denken, beispielsweise verursacht durch eine mögliche Kreuzreaktivität der in der Immunhistochemie verwandten Antikörper, was die Spezifität des Nachweisverfahrens beeinträchtigen könnte.

Fälle mit positiver Immunhistochemie von EGFR wiesen in der vorliegenden Arbeit signifikant häufig höheres Tumorstadium und Tumorgrading sowie höheres Patientenalter bei Diagnose auf. In das Cox-Regressionsmodell, das auch die Variable „hoch- vs. niedrigmaligne Tumoren“ enthielt, fand diese Eingang und zeigte eine signifikant schlechtere Prognose mit einer Risikoerhöhung von durchschnittlich 1,9 an. Wurde jedoch das *Grading* im Modell berücksichtigt und nicht die Einordnung in Malignitätsgruppen, fand sich keine Signifikanz der Immunhistochemiefunde mehr – möglicherweise aufgrund der Assoziation eines hohen *Grades* mit derselben. Jedoch wird auch die Prognose bei immunhistochemisch nachweisbarer EGFR-Expression in der Literatur widersprüchlich diskutiert. So konnte in der Arbeit von Monteiro et al., in der 88 Speicheldrüsenkarzinome unterschiedlicher Entitäten untersucht wurden, zwar eine Assoziation zwischen schlechtem Tumordifferenzierungsgrad und hoher EGFR-Expression gefunden werden, jedoch nicht mit dem Gesamtüberleben.⁶¹ In einer Untersuchung von Maiorano et al. wurde sogar notiert, dass eine erhöhte EGFR-Expression mit einer Verlängerung des Überlebens bei oralen Plattenepithelkarzinomen einherging.⁵⁴ Die Bedingungen für positiven EGFR-Status wurden dort allerdings nur schwach formuliert, da nur >10% der Zellen eine immunhistochemische Anfärbbarkeit aufweisen mussten und die Färbeintensität nicht berücksichtigt wurde. In anderen Studien dagegen stellte eine EGFR-Expression in der Immunhistochemie auch in der multivariaten Analyse eine signifikante Einflussgröße für eine schlechtere Prognose dar.^{27,79} Diese unterschiedlichen Ergebnisse resultieren vermutlich unter anderem aus den verschiedenen Kriterien, die der Einordnung der jeweiligen Tumoren als „immunhistochemisch EGFR-positiv“ zugrunde gelegt wurden. So wurde von Monteiro et al. als Bedingung festgelegt, dass >10% Zellen mit moderater (2+) oder intensiver immunhistochemischer Anfärbbarkeit (3+) vorliegen mussten, während bei Ettl et al. nur Tumoren mit starker Färbung (3+) Berücksichtigung fanden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dahingegen ein Score gebildet als Produkt aus Intensität und Extensivität der Färbung und ein Cut-off von 80 festgelegt, um Tumoren als „immunhistochemisch EGFR-positiv“ zu werten. Die unterschiedlichen Kriterien erschweren die Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten.

Unter den Azinuszellkarzinomen fand sich kein Fall mit EGFR-Expression in der Immunhistochemie. Diese lag im Vergleich zu den niedrigmalignen Tumoren signifikant häufiger bei hochmalignen Tumoren und am häufigsten beim Plattenepithelkarzinom vor. Doch auch ein nicht unerheblicher Anteil von Mukoepidermoidkarzinomen war

immunhistochemisch positiv für EGFR. Dieses Ergebnis bestätigt diejenigen anderer Arbeiten, in denen sich EGFR in Azinuszellkarzinomen gering, in Mukoepidermoidkarzinomen jedoch signifikant höher exprimiert fand.^{31,61} Womöglich spielt EGFR bei der Pathogenese von Azinuszellkarzinomen eine geringere Rolle.

Die Bedeutung der Befunde bezüglich EGFR liegt neben dem prognostischen Nutzen in der Möglichkeit, diese Rezeptoren mit Tyrosinkinaseinhibitoren oder Antikörper zu blockieren. So werden Cetuximab oder der vollständig humanisierte monoklonale Antikörper Panitumumab, die gegen die extrazelluläre Domäne von EGFR gerichtet sind, bereits beim metastasierten kolorektalen Karzinom eingesetzt. Tatsächlich sprechen diejenigen Patienten auf diese Therapie besser an, bei denen eine Genvervielfachung von EGFR nachgewiesen werden konnte, was dafür spricht, dass in diesen Fällen der EGFR-Signalweg eine zentrale Rolle spielen dürfte.^{56,62}

Bei Speicheldrüsenkarzinomen liegen zum Einen noch nicht genügend Erfahrungen mit solch molekularen Therapiestrategien vor, zum anderen sind bereits vorhandene Ergebnisse teils enttäuschend.⁷⁵ Um Patienten zu identifizieren, die von derartigen Therapieansätzen profitieren könnten und um eine unnötige Belastung mit auftretenden Nebenwirkungen zu vermeiden, sind deshalb weitere Studien mit großer Fallzahl vonnöten. Als supplementäres Diagnostikum für die Aufdeckung von Tumoren mit möglicher Ansprechbarkeit auf eine anti-EGFR-Therapie könnte sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung etablieren, da sie ein DNA-abhängiges Verfahren darstellt und angesprochene Einschränkungen des EGFR-Nachweises mittels Immunhistochemie nicht aufweist. Dennoch sollte auf letztere wegen der diversen Möglichkeiten vermehrter Proteinexpression ohne Genvervielfachung nicht verzichtet werden, um die Zahl falsch-negativer Befunde zu reduzieren, zumal die Immunhistochemie von prognostischer Bedeutung ist, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Großangelegte Studien ohne Restriktion auf bestimmte Tumorentitäten könnten mit zusätzlichem Einsatz einer RT-PCR für den Nachweis von EGFR-RNA helfen, solche Fehler weiter einzugrenzen und Tumorkandidaten für eine effektive Antikörpertherapie aufzuspüren.

Auf die Bedeutung des Her2-Status neben EGFR wird unter anderem im Folgenden eingegangen.

4.1.3 Untersuchung der Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich des Her2-Status in Abhängigkeit von den EGFR-Befunden

Anders als bei EGFR fand sich bei Her2 sowohl bezüglich der Trisomie als auch der hochgradigen Polysomie 17 eine Präferenz hochmaligner Tumoren. Das einzige MEC, das von der hochgradigen Polysomie 17 betroffen war, war auch hier, analog zu jenem anderen Fall eines MECs bei hochgradiger Polysomie von Chromosom 7, squamoiden Subtyps und wies ein *Grade* G3 und Stadium III auf, so dass die hohe Polysomie 17 also ebenso wie die Polysomie 7 ausschließlich hochmaligne Tumoren betraf. Während sich die hochgradige Polysomie 17 in nahezu einem Viertel der duktaalen Adenokarzinome fand, lag eine Trisomie 17 nur bei einem Fall dieses Tumortyps vor, was auf komplexere Veränderungen bei diesen hochmalignen Tumoren hindeutet. Umgekehrt fanden sich beim myoepithelialen Karzinom drei Fälle einer Trisomie 17, jedoch keine hochgradige Polysomie 17. Jedoch ist zu bedenken, dass die Fallzahlen der jeweiligen Tumoren unterschiedlich sind und bei letzterer Entität 17 Fälle untersucht werden konnten und beim duktaalen Adenokarzinom 30 Fälle.

Im Vergleich zu EGFR waren bei Her2 Tri- oder hochgradige Polysomien insgesamt nicht so häufig, zahlreicher jedoch Genamplifikationen, von denen 20 Fälle vorlagen. Die überwiegende Zahl dieser Amplifikationen waren dabei Clusteramplifikationen, bei denen die Zahl der Her2-Gen-Signale meist deutlich mehr als das Zehnfache der Centromer 17 - Signale ausmachte. Beachtlich ist, dass mehr als die Hälfte der Genvervielfachungen, darunter zwei Drittel der Clusteramplifikationen, auf das duktaale Adenokarzinom entfielen. In drei Fällen von Clusteramplifikation lag bei diesem Karzinomtyp zugleich eine hohe Polysomie 17 vor.

Zwei Drittel der Tumoren mit Genamplifikation zeigten eine positive Immunhistochemie für Her2, so dass die Amplifikation hochsignifikant mit der Her2-Expression assoziiert war. Zudem war sie signifikant mit hoher Proteinexpression von Her2 mit einem Wert des Produkts aus Färbeintensität und –extensität ≥ 120 assoziiert. Umgekehrt wiesen 27,9% der Tumoren mit positiver Immunhistochemie für Her2 eine Genamplifikation und 18,6% eine numerische Chromosom-17-Aberration im Sinne einer Trisomie oder hochgradigen Polysomie auf. Trisomie 17 oder Polysomie 17 waren nicht mit immunhistochemischer Her2-Expression assoziiert. Auch in anderen Arbeiten fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Her2-Expression und Genamplifikation, der jedoch nicht bei Tri- oder Polysomie 17

gegeben war.^{20,102} Dies deutet darauf hin, dass die Erhöhung der Genkopiezahl durch Amplifikation des Her2-Gens anders als bei EGFR eine größere Rolle für die Her2-Expression spielen muss, jedoch auch hier Mechanismen vermehrter Genexpression bei normaler Gendosis involviert sein müssen. Die Amplifikation von Her2 zeigte, wie auch die positive Immunhistochemie von Her2, in der univariaten Betrachtung ein signifikant schlechteres Überleben der Patienten.

Sowohl Trisomie 17 und hochgradige Polysomie 17 als auch Genamplifikation von Her2 waren mit einer höheren Tumorgraduierung assoziiert. Ferner fanden sich signifikante Assoziationen zwischen hochgradiger Polysomie 17 und hochgradiger Polysomie 7 – mehr als die Hälfte der Fälle mit hochgradiger Polysomie 17 wiesen zugleich eine hochgradige Polysomie 7 auf – bzw. zwischen Trisomie 17 und Trisomie 7. Darüber hinaus zeigte die hochgradige Polysomie 17 anders als die Trisomie 17 eine Assoziation mit höherem Patientenalter bei Diagnose, höherem Tumorstadium und höherer Rezidivrate. Womöglich sind numerische Chromosom-17-aberrationen im Kontext vielfacher genomischer Veränderungen aufgrund genetischer Instabilität zu sehen und stellen somit kein unabhängiges Phänomen dar. Entsprechend lassen sich die univariat signifikant schlechteren Überlebenskurven nicht alleine auf Veränderungen der Zahl von Chromosom 17 zurückführen. Diese könnten als Marker genereller aneuploider Veränderungen und komplexer genetischer Alterationen verstanden werden. Das spiegelt sich auch in der multivariaten Betrachtung wider: während alleinige chromosomale Aberrationen des EGFR oder Her2- tragenden Chromosoms aus dem Cox-Regressionsmodell eliminiert wurden, stellten hochgradige Polysomie 17 und hochgradige Polysomie 7 zusammen einen Marker für signifikant schlechteres Überleben dar, das im Mittel 34,1 Monate betrug bei einer mittleren Hazard-Ratio von 3,7. Die gezeigte ungünstigere Prognose von Fällen mit alleiniger hochgradiger Polysomie 7 wurde bei zusätzlichem Vorliegen einer hochgradigen Polysomie 17 weiter signifikant verschlechtert. Betroffen waren ausschließlich hochmaligne Tumoren, darunter mit 13,3% am häufigsten das duktales Adenokarzinom und mit 12,0% am zweithäufigsten das Plattenepithelkarzinom. Zum Einen mag die Veränderung der Genanzahl zahlreicher Gene im Rahmen umfangreicher genomischer Veränderungen, deren Indikator die hochgradige Polysomie 17 sein könnte, eine Verschlechterung des Gesamtüberlebens bedingen, zum Anderen aber könnte speziell die Kombination von Veränderungen der Genausstattung der Tumorzelle mit dem EGFR- und dem Her2-Gen zusammen ein Risiko

potenzierende Wirkung entfalten und zu aggressiverem Krankheitsverlauf führen. Tatsächlich zeigten Fälle mit positiver Immunhistochemie sowohl von EGFR als auch von Her2 ein schlechteres Überleben gegenüber allen anderen Fällen (keine immunhistochemische Genexpression von Her2 und/oder EGFR) und gegenüber singulär positiver Immunhistochemie (immunhistochemische Genexpression von Her2 oder EGFR) tendenziell eine schlechtere Prognose. Fast die Hälfte der Fälle mit zweifach positiver Immunhistochemie entfiel auf die duktaalen Adenokarzinome und umgekehrt zeigten nahezu ein Viertel der duktaalen Adenokarzinome diese Koexpression. Williams et al. fanden in einem Drittel der von ihnen untersuchten duktaalen Adenokarzinome ähnliche Proteinexpressionen von EGFR und Her2, jedoch keine positive Assoziation zwischen EGFR- und Her2-Status, auch chromosomal mit FISH betrachtet, und folgern, anders als in dieser Arbeit, dass beide Marker unabhängig seien.¹⁰² Jedoch sei auf die geringe Fallzahl immunhistochemisch zweifach positiver Fälle sowohl in der hier vorliegenden als auch in der genannten Arbeit verwiesen. Da das duktaale Adenokarzinom am häufigsten von Veränderungen im Her2-Status betroffen ist, sollte in zukünftigen Studien entsprechend eine höhere Zahl speziell dieser Karzinome hinsichtlich der Immunhistochemie beider Rezeptoren, also von EGFR und Her2, untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass bei einer Genamplifikation von Her2 sowohl die eigene Rezeptor-Down-Regulation als auch die von aktivierten EGF-Rezeptoren gehemmt werden, was zu einer konsekutiv verlängerten Aktivierung der Signalkaskade führt. Ferner soll unter dem Einfluss von Her2 eine erhöhte Recycling-Rate internalisierter EGF-Rezeptoren resultieren. Zudem können sich Heterodimere aus EGF- und Her2-Rezeptoren ausbilden, da sowohl EGFR als auch Her2 zur selben Rezeptorfamilie gehören. Für diese EGFR-Her2-Heterodimere wurde gezeigt, dass sie die höchste mitogene und Zellen transformierende Potenz aufweisen.^{46,105} In dieser Arbeit konnte keine signifikante, sondern nur eine tendenzielle Assoziation zwischen einer Her2-Genamplifikation und einer EGFR-Expression in der Immunhistochemie gefunden werden. Ebenso zeigten Tumoren mit positiver Immunhistochemie von Her2 häufiger, jedoch nicht signifikant, eine immunhistochemisch nachweisbare EGFR-Expression. Dennoch implizieren diese Befunde sowie diejenigen aus dem Regressionsmodell vor dem erwähnten biologischen Hintergrund, dass eine getrennte Betrachtung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR oder Her2 nicht sinnvoll sein kann.

Demgemäß könnten Therapien wirkungsvoller sein, die nicht nur gegen einen speziellen Rezeptor gerichtet sind.

Tatsächlich findet sich so ein Ansatz beispielsweise bei dem pan-Her-Kinase-Inhibitor "BMS-599626", der sowohl Homodimere von EGFR und Her2 als auch die Heterodimerisierung bei Tumoren mit Koexpression beider Rezeptoren hemmt. Es konnte hierbei *in vitro* gezeigt werden, dass nur Tumorzellen im Wachstum gehemmt werden, die von EGFR und/oder Her2 abhängig sind, nicht jedoch Tumoren ohne entsprechende Rezeptorexpression.¹⁰⁴ Einen anderen Inhibitor sowohl von EGFR als auch von Her2 stellt das sogenannte *small molecule* "Lapatinib" dar, für das bei Brustkrebspatientinnen gefunden wurde, dass dieses im Gegensatz zu Gefitinib als Monotherapie, welches nur EGFR blockiert, eine bessere Wirkung aufweist.¹⁶ Jedoch konnte in einer großen Studie, in der die Ansprechrate von Frauen mit metastasiertem Brustkrebs auf eine Kombinationstherapie eines Chemotherapeutikums mit Lapatinib in Bezug auf den FISH/Immunhistochemie-EGFR- und Her2-Status retrospektiv untersucht wurde, nur für Her2-Positivität ein signifikanter Nutzen gefunden werden. Die Autoren schließen, dass die geringere EGFR-Expression im Brustkrebsgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe und die geringe Rate von EGFR-Amplifikationen und Mutationen bei Brustkrebs im Vergleich zu Her2-Veränderungen der Grund hierfür sein könnten.⁷⁴

Bei Speicheldrüsenkarzinomen finden sich noch vergleichsweise wenige Studien mit derartigen Therapieformen, auch aufgrund der geringen Inzidenz dieser Tumoren im Vergleich zu Brustkrebs. Jedoch konnte in einer Arbeit von Vidal et al. analog zur oben genannten Studie bestätigt werden, dass Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen mit hoher Her2-Gen/Centromer 17-Ratio bei Therapie mit Lapatinib ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben hatten als Patienten mit moderater Genamplifikation. Eine EGFR-Amplifikation hatte sich bei den untersuchten Tumoren nicht gefunden.⁹⁹ Größere Studien mit einer höheren Zahl EGFR- und Her2-koexprimierender Fälle wären nötig, um untersuchen zu können, ob eine duale Therapie tatsächlich die sich aus der Theorie ergebenden Erwartungen erfüllen kann und im Vergleich zu einer Therapie gegen nur einen Wachstumsfaktorrezeptor besser abschneidet. Grundsätzlich scheint diese, ebenso wie beispielsweise eine Therapie mit Trastuzumab, einem Antikörper ausschließlich gegen Her2, allerdings eher bei duktalem Adenokarzinomen sinnvoll, weil diese Karzinome als Tumoren, die dem exkretorischen Gangsystem entspringen, im Gegensatz zu solchen, welche aus dem

Schaltstück hervorgehen, am häufigsten Her2-positiv sind. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt und deutet auf die histogenetische Ähnlichkeit mit den duktalem Adenokarzinomen der Mamma hin.³² Entsprechend dürften sich bei dieser Entität häufiger Fälle sowohl mit positivem Her2- als auch EGFR-Status finden, anhand derer pan-Kinase-Inhibitoren erprobt werden könnten. Dies mag auch einem besseren biologischen Verständnis des Zusammenwirkens der verschiedenen Her-Rezeptoren zuträglich sein, von dem Patienten mit unterschiedlichsten Tumoren profitieren könnten.

4.2 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome

4.2.1 Untersuchung der histologischen Subtypen

Im Rahmen dieser Arbeit sind 40 Mukoepidermoidkarzinome unter genauer Betrachtung der jeweils zugrunde liegenden Histologie mittels Differenzierung der Subtypen und Relation dieser zu klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorlokalisation, *Grade*, Tumorstadium, Überleben und der Translokation t(11;19) untersucht worden. Die Ergebnisse demonstrieren die hohe Bandbreite an Morphologie, die aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der drei Zelltypen, aus denen der Tumor aufgebaut ist, resultiert. Der klassische Subtyp weist eine Zusammensetzung aus mindestens zwei Zelltypen, häufig auch aus allen dreien, auf, so dass die Diagnose dieser histologischen Variante keine Schwierigkeiten bereitet. Jedoch kann im Falle der nicht-klassischen Subtypen auch ein einzelner Zelltyp des Mukoepidermoidkarzinoms vorherrschend und hierunter die Diagnose erschwert sein. Die varianten histologischen Muster wurden in dieser Arbeit unterteilt in squamoide, eosinophile und klarzellige Subtypen, sofern sie mindestens 80% der Tumorphistologie ausmachten.

Die häufigste Variante des MEC stellte das squamoide Mukoepidermoidkarzinom dar mit in der Regel hohem Tumormaligntätsgrad und signifikant schlechter Prognose. Kleine *Foci* mit klassischem MEC-Muster sowie isoliert lokalisierte Mukuszellen oder der intrazelluläre Muzinnachweis mittels Spezialfärbungen (Muzicarmin, PAS) erleichtern die Diagnose. Ebenso mögen kleinere Zellen ohne erkennbare squamoide Differenzierung (Intermediärzellen) einen wichtigen Hinweis für die richtige Diagnosefindung geben. Hierbei ist die Immunhistochemie hilfreich, um diese Zellen zu detektieren. Eine wichtige

differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber dem adenosquamösen Karzinom, welches in der WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren nicht eingeschlossen ist, gelingt vor allem durch das Auffinden von Mukus- und/oder Intermediärzellen, was die Bedeutung obengenannter Spezialfärbungen oder entsprechender Immunhistochemie unterstreicht. Ebenso kann die unter den Speicheldrüsenkarzinomen bisher nur bei Mukoepidermoidkarzinomen gefundene reziproke Translokation t(11;19) Aufschluss über die vorliegende Entität geben. Lennerz et al. fanden das chromosomale Rearrangement oder t(11;19)-verwandte Rearrangements in 7 von 7 MECs der Cervix, jedoch in keinem von 14 zervikalen adenosquamösen Karzinomen.⁴⁷ Jedoch ist die Sensitivität mit 11% sehr gering, so dass die Translokation als alleiniger Marker zur Differentialdiagnose nicht geeignet ist. Im Gegenteil fand sich bei den squamoiden MECs eine negative Assoziation mit der Translokation.

Wie in einer Studie von Lueck et al. gezeigt, stellt eine starke Expression von Zytokeratin 5 (CK5) einen signifikanten negativen Prognosefaktor dar und ist assoziiert mit *high grade*-Tumoren.⁵³ So ist dieser Marker auch durchwegs präsent in squamoiden Mukoepidermoidkarzinomen. In einem Fall jedoch zeigten sich vorwiegend kleine, sich basophil anfärbende Intermediärzellen, welche CK5-negativ waren, so dass es sich womöglich um eine Variante von Intermediärzellen handelt. In weiteren Studien mit größerer Fallzahl sollte die klinische Signifikanz dieses Befundes überprüft werden, zumal ein "MEC des intermediären Zelltyps" bisweilen nicht klassifiziert ist. Der Fall wurde deshalb zum squamoiden Subtyp gerechnet.

Das eosinophile Mukoepidermoidkarzinom, auch onkozytisches MEC genannt, weist eine ausgeprägte zytoplasmatische Eosinophilie auf, ungeachtet des Wachstumsmusters. Es ist als *low grade*-Tumor vorbeschrieben.^{14,100} Der onkozytoide Phänotyp rührt in manchen Fällen von einer ausgeprägten Streifenstück-ähnlichen Differenzierung her.²⁹ Dieses Muster ist sehr selten und lässt an Mukoepidermoidkarzinome denken, die in Warthin Tumoren entstehen.¹⁰³ Zwar kann der eosinophile Subtyp durchaus ein deutliches papilläres und zystisches Muster aufweisen. Anders als beim Warthin-Tumor aber findet sich bei einem *de-novo* entstehenden eosinophilen MEC kein zweischichtiges Muster aus onkozytären Zellen mit zentralen Zellkernen und ebenso kein ausgeprägtes lymphoides Stroma. Zudem gehören die Mukoepidermoidkarzinome, die aus oder in Warthin-Tumoren entstehen, normalerweise

zum klassischen Subtyp.¹⁰³ Des Weiteren muss das eosinophile MEC mit papillärem Muster und Tumor-assoziiertes lymphoide Proliferation von gutartigen Warthin-Tumoren mit squamöser und/oder muköser Metaplasie und von sogenannten Warthin-Adenokarzinomen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden.⁹ Positive Befunde bezüglich der Translokation t(11;19) können die Differentialdiagnose zu histomorphologisch ähnliche wirkenden Karzinomen erleichtern.

Das klarzellige MEC erinnert im Allgemeinen an das klarzellige Karzinom, NOS. Bei sorgfältiger Betrachtung kann jedoch eine variable, in der Regel kleinere Population von Intermediärzellen oder ein winziger histologischer Fokus des klassischen MEC gefunden werden. Mit Hilfe der Translokation t(11;19) konnte sehr sensitiv dieses variante Mukoepidermoidkarzinom als solches identifiziert werden (in 3 von 3 Fällen positiv), so dass diese womöglich ein bedeutendes diagnostisches Hilfsmittel darstellen könnte. Aufgrund der geringen Fallzahl können jedoch keine sicheren Schlüsse gezogen werden. Interessanterweise wurden in einem Fall eines klassischen MEC fokale klarzellige Veränderungen gefunden, die mit einem zweischichtigen Muster vergesellschaftet waren, welches an epithelial-myoepitheliale Karzinome (EMC) erinnerte. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde jedoch ein invertiertes EMC-Muster gefunden: die innere, luminal Zellschicht war Zytokeratin 5-, die äußere Zellschicht Zytokeratin 7-positiv. Um differentialdiagnostisch im Falle eines klassischen oder klarzelligen MEC ein EMC korrekterweise auszuschließen, ist die Kenntnis dieser immunhistochemischen Musterumkehrung hilfreich.

Ein interessanter Befund in dieser Arbeit, der mehrere Fälle klassischer Mukoepidermoidkarzinome betrifft, war das Auftreten von atypischen, Krypten-ähnlichen Schleimzellhyperplasien und von Foci mit Intermediärzellen in residuellen Speicheldrüsengängen. Womöglich handelt es sich dabei um eine Vorläuferläsion, doch können reaktive Veränderungen, die durch den Tumor induziert sind sowie eine sekundäre Kolonisation präexistenter Ausführungsgänge mit Tumorzellen nicht sicher ausgeschlossen werden. Allerdings sind diese Veränderungen in der Histologie anderer Speicheldrüsenkarzinome in dieser Arbeit nicht gefunden und auch in der Literatur für andere Entitäten nicht vorbeschrieben worden, was gegen eine reaktive Veränderung der Ausführungsgänge und für eine spezifische Vorläuferläsion des Mukoepidermoidkarzinoms

spricht. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Studien vonnöten. Ähnliche *Foci* mit Plattenepithel- und Mukuszellmetaplasien, die assoziiert sind mit zytologischen Atypien im onkozytischen Epithel von Warthin Tumoren, die ein MEC beinhalten, wurden von Williamson et al. beschrieben. Auch hierbei wurde vermutet, dass es sich um Vorläuferläsionen von Mukoepidermoidkarzinomen handelt.¹⁰³

4.2.2 Untersuchung der Mukoepidermoidkarzinome bzgl. weiterer klinisch-pathologischer Faktoren

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit des aktuellen WHO-*Grading*³⁴, welches auf den Kriterien des Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) beruht.^{5,33} Aufgrund der limitierten Fallzahl konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob die WHO das Mukoepidermoidkarzinom im *Grading* zu niedrig einstuft, was in Fachkreisen umstritten ist.^{5,13,83} In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Brandwein et al. korreliert das dominante histologische Muster des Tumors gut mit dem *Grade* und dem Überleben, so dass die Festlegung histologischer Kriterien in das *Grading* von MECs eingeschlossen werden sollte.¹³ Die nicht-klassischen MECs tendierten zu einer höheren Tumorggraduierung und wiesen nur in 29% *Grade* G1 auf. Im Gegensatz dazu war die klassische Variante mit einem *Grade* G1, welches hier in 96% vorlag, hochsignifikant assoziiert ($p < 0,001$), so dass das Vorliegen dieses, des häufigsten Subtyps, einen niedrigen Malignitätsgrad impliziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen bestätigt werden, dass Mukoepidermoidkarzinome mit der Translokation t(11;19) eine bessere Prognose aufweisen als solche ohne Translokation, wenngleich die Assoziation nicht signifikant war.^{58,70} Die Translokation war ausschließlich bei Mukoepidermoidkarzinomen zu verzeichnen, nicht jedoch bei anderen Karzinomen der Tumorsammlung. Translokation-positive Tumoren waren überwiegend G1-Tumoren und am häufigsten klassische MECs, allerdings fanden sich auch 4 MECs mit *Grade* G3. Auch Seethala et al. und Tirado et al. fanden das MECT1-MAML2 Fusionsgen in einem nicht unerheblichen Anteil hochgradig maligner Mukoepidermoidkarzinome (G3).^{83,94} Da hochaggressive Verläufe bei Patienten mit t(11;19)-positiven MECs berichtet wurden, relativiert sich die prognostische Aussagekraft.⁸³

Eine Implementierung des Translokationsstatus in das Tumorgraduierungssystem wäre somit problematisch. Dennoch fanden sich bei Seethala et al. bei MECs mit *Grade* G3 und Translokation weniger häufig Mitosen und Anaplasien als bei translokationsnegativen Fällen, wobei jedoch in Anbetracht der differentialdiagnostisch schwierigen Abgrenzung von *high grade* MECs zum adenosquamösen Karzinom die korrekte Einordnung als "MEC" bei translokationsnegativen Fällen von den Autoren bezweifelt wird.⁸³ Dennoch wird eine unterschiedliche Pathogenese und Biologie der *high grade* MECs mit Fusionsgen im Gegensatz zu den *high grade* Fällen ohne Translokation diskutiert. Dabei ist eine Progression von *low grade* Tumoren mit Translokation t(11;19) zu *high grade* Tumoren denkbar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Speicheldrüsenkarzinome stellen Tumoren geringer Inzidenz bei großer Heterogenität dar, wobei zahlreiche Entitäten wie beispielsweise das Mukoepidermoidkarzinom in verschiedene histologische Subtypen weiter unterteilt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 289 Speicheldrüsenkarzinome hinsichtlich allgemeiner klinisch-pathologischer Faktoren sowie mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) bezüglich des EGFR- und Her2-Status untersucht. Ferner wurde das Vorliegen der Translokation t(11;19) geprüft, insbesondere bei den gesondert betrachteten 40 Mukoepidermoidkarzinomen der Sammlung.

Die von der UICC zugrunde gelegte Stadieneinteilung konnte in ihrer prognostischen Relevanz bestätigt werden. Das Tumorstadium hat sowohl bei uni- als auch multivariater Betrachtung hochsignifikant Einfluss auf das Überleben. Ebenso relevant ist das *Grading*, wengleich die Anwendung eines drei- oder viergliedrigen Graduierungssystems umstritten ist. Gleichwohl kann, abgeleitet von der Klinik und dem histologischen Subtyp, eine Einteilung in hoch- und niedrigmaligne Tumoren erfolgen.

Für höheres Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigte sich eine schlechtere Prognose. Frauen haben hochsignifikant häufiger niedrigmaligne Speicheldrüsentumoren, was einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Sexualhormonen an der Entstehung mancher Tumorentitäten darstellen könnte und in speziellen Untersuchungen näher betrachtet werden sollte. Eine Tumorlokalisation in den großen Speicheldrüsen ist hochsignifikant mit einem höheren *Grade* assoziiert.

Polyploide Veränderungen der Chromosomen 7 und 17 fanden sich, mit Ausnahme der Trisomie 7, nahezu ausschließlich bei hochmalignen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium und waren signifikant miteinander assoziiert. Mehr als die Hälfte der Fälle mit hochgradiger Polysomie 17 zeigte auch eine hochgradige Polysomie 7. Dies deutet auf komplexe genomische Veränderungen in dieser Tumorgruppe hin. Darüber hinaus konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die hochgradige Polysomie 7 und die hochgradige Polysomie 17 zusammen eine entscheidende prognostische Variable im Cox-Regressionsmodell darstellen. Eine hochgradige Polysomie 7 war signifikant mit einer EGFR-

Expression in der Immunhistochemie assoziiert. Diese wiederum fand sich gehäuft bei Tumoren mit hohem *Grade*, Stadium und Alter, am häufigsten beim Plattenepithelkarzinom, nicht jedoch beim Azinuszellkarzinom. Sowohl die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als auch die Immunhistochemie sollten zur besseren Patientenselektion für eine gegen EGFR gerichtete Therapie zur Anwendung kommen.

Während sich bei EGFR kaum eine Genamplifikation fand, lag diese häufiger bei Her2 vor und konzentrierte sich vor allem auf die duktaalen Adenokarzinome. Zudem war sie, im Gegensatz zur Tri- und hochgradigen Polysomie 17, hochsignifikant mit einer Genexpression von Her2 in der Immunhistochemie assoziiert. Die Erhöhung der Her2-Genexpression mittels Amplifikation oder numerischer Chromosom-17-Aberration ist mit signifikant schlechterem Überleben assoziiert. Bei Tri- und hochgradiger Polysomie 17 fanden sich signifikant häufiger ein höheres *Grade*, ein höheres Stadium, ein höheres Patientenalter bei Diagnose und eine höhere Rezidivrate.

Aufgrund der prognostischen Relevanz empfiehlt sich neben der Immunhistochemie zu EGFR somit auch die Untersuchung des Her2-Status, letzteres besonders bei duktaalen Adenokarzinomen. Hierzu ist neben der Immunhistochemie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hilfreich, um zum Einen Patienten mit Amplifikation von Her2 identifizieren und eventuell einer entsprechenden Therapie, die gegen diesen Rezeptor gerichtet ist, zuführen zu können und zum Anderen eine mögliche hohe Polysomie sowohl von Chromosom 7 als auch 17 aufzudecken und das „prognostische Modell“ um diese Variable zu erweitern. Diese spezielle chromosomale Konstellation ist in weiteren Studien zu untersuchen. In diesen Fällen wäre besonders die Frage nach Effektivität einer dualen Therapie, die sowohl gegen EGFR als auch gegen Her2 gerichtet ist, von Interesse, zumal beide Rezeptoren derselben Familie angehören. Da Plattenepithelkarzinome am zweithäufigsten von einer simultanen Polysomie 7 und 17 betroffen waren, sollten auch diese Tumoren diesbezüglich in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet werden.

Zusammenfassend kann bezüglich der Mukoepidermoidkarzinome festgehalten werden, dass hierbei eine hohe histologische Bandbreite aufgefallen ist und die jeweiligen histologischen Varianten gut mit dem Malignitätsgrad und dem biologischen Verhalten korrelierten. Die häufigste MEC-Form stellte der klassische Subtyp dar, der hochsignifikant mit einem guten Differenzierungsgrad (G1) assoziiert war. Im Gegensatz dazu tendierten die

nicht-klassischen Subtypen zu einem höheren *Grade* und implizieren somit eine schlechtere Prognose. Die Bedeutung der histologischen Varianten für die Ergänzung der Tumorgraduierung und für die Prognose sollte in größeren Fallstudien noch genauer untersucht werden.

Die vorbeschriebene Assoziation der Translokation t(11;19) mit einer besseren Prognose des Mukoepidermoidkarzinoms sowie die Restriktion auf diesen Speicheldrüsentumortyp konnten bestätigt werden, wenngleich der Zusammenhang mit besserem Überleben in der vorliegenden MEC-Sammlung nicht signifikant war. Bei 4 Fällen mit t(11;19) lag ein Differenzierungsgrad G3 vor, sodass ein positiver Translokationsstatus keinen Ausschluss des Vorliegens eines hochmalignen MECs erlaubt. Im Falle der MEC-Varianten mit monomorphem histologischen Erscheinungsbild kann der Nachweis der Translokation zur Diagnosefindung beitragen und die differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Tumoren wie hochmalignen, nicht weiter klassifizierbaren Adenokarzinomen, adenosquamösen Karzinomen, klarzelligen oder onkozytären Karzinomen erleichtern, wobei t(11;19) jedoch nur bei ca. 60% aller untersuchten MECs vorlag und sich am häufigsten beim klassischen Subtyp fand, während sich beim squamoiden Subtyp eine negative Assoziation mit der Translokation zeigte. 3 von 3 Fällen des klarzelligen Subtyps zeigten t(11;19). Bei den nicht-klassischen MECs ist eine Assoziation mit bestimmten Subtypen also denkbar, jedoch bei zu geringer Fallzahl im Rahmen dieser Arbeit nicht zu belegen.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen an der zusammengestellten Serie von Speicheldrüsenkarzinomen auf die Bedeutung chromosomaler und genetischer Veränderungen dieser Tumoren hin, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Entität sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können und eine differenzierte Betrachtung derselben erfordern. Eine genaue Aufklärung ursächlicher molekularer Mechanismen chromosomaler Aneuploidie und genetischer Veränderungen ist erforderlich, um einen gemeinsamen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der diversen Malignome zu finden.

6 Appendix

6.1 Referenzen

1. Armstrong JG, Harrison LB, Spiro RH et al. Malignant tumors of major salivary gland origin. A matched-pair analysis of the role of combined surgery and postoperative radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116:290-293.
2. Arnold G, Beier HM, Herrmann M et al. Kopf und Hals. In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, eds. *Anatomie.*1999; Würzburg, Innsbruck, Düsseldorf: Springer-Verlag.
3. Aro K, Leivo I, Makitie AA. Management and outcome of patients with mucoepidermoid carcinoma of major salivary gland origin: a single institution's 30-year experience. *Laryngoscope.* 2008;118:258-262.
4. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL et al. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:893-901.
5. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer.* 1992;69:2021-2030.
6. Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al. Tumours of the Salivary Glands. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al., eds. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.*2005; Lyon: IARC Press.
7. -----*World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* 2005; Lyon: IARC Press.
8. Behboudi A, Enlund F, Winnes M et al. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45:470-481.
9. Bell D, Luna MA. Warthin adenocarcinoma: analysis of 2 cases of a distinct salivary neoplasm. *Ann Diagn Pathol.* 2009;13:201-207.
10. Bell RB, Dierks EJ, Homer L et al. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:917-928.
11. Böcker W, Höfler HK, Lax S et al. Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heiz PU et al., eds. *Pathologie.*2008; München;Jena: Urban & Fischer.
12. Boenninghaus H-G, Lenarz T. *HNO.* 2007; Heidelberg, Hannover: Springer-Verlag.
13. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:835-845.

14. Brannon RB, Willard CC. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of parotid gland origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:727-733.
15. Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG. Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer.* 2003;39:1828-1834.
16. Chan SK, Hill ME, Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2006;11:3-11.
17. Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology.* 2007;51:1-20.
18. Chung CH, Ely K, McGavran L et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006;24:4170-4176.
19. Conkright MD, Canettieri G, Sreaton R et al. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell.* 2003;12:413-423.
20. Cornolti G, Ungari M, Morassi ML et al. Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133:1031-1036.
21. de A, V, de Sousa SO, Carvalho YR et al. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8:195-202.
22. Dietz A, Barne B, Gewelke U et al. [The epidemiology of parotid tumors. A case control study]. *HNO.* 1993;41:83-90.
23. El-Naggar AK, Huvos AG. Adenoid cystic carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al., eds. *World Health Organization of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* 2005; Lyon: IARC Press.
24. Ellis GL, Auclair PL. *Tumours of the salivary glands.* 1996; Washington: Armed Forces Institute of Pathology.
25. Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical Pathology of the Salivary Glands.* 1991; Philadelphia: WB Saunders.
26. Ethunandan M, Davies B, Pratt CA et al. Primary epithelial submandibular salivary gland tumours - Review of management in a district general hospital setting. *Oral Oncol.* 2008.
27. Ettl T, Schwarz S, Kleinsasser N et al. Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas. *Histopathology.* 2008;53:567-577.
28. Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR et al. Tumours of the salivary glands: Introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al., eds. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* 2005; Lyon: IARC Press.
29. Foschini MP, Marucci G, Eusebi V. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virchows Arch.* 2002;440:536-542.

30. Frankenthaler RA, Luna MA, Lee SS et al. Prognostic variables in parotid gland cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;117:1251-1256.
31. Gibbons MD, Manne U, Carroll WR et al. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 2001;111:1373-1378.
32. 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.
33. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer.* 1998;82:1217-1224.
34. Goode RK, El-Naggar AK. Mucoepidermoid Carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al., eds. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* 2005; Lyon: IARC Press.
35. Greene FL, Page DL, Fleming ID. *AJCC Cancer Staging Manual.* 2002; New York: Springer.
36. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N et al. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:184-189.
37. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr. et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003;21:3798-3807.
38. Hoffman DA, McConahey WM, Fraumeni JF, Jr. et al. Cancer incidence following treatment of hyperthyroidism. *Int J Epidemiol.* 1982;11:218-224.
39. Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology.* 1997;8:414-419.
40. Horn-Ross PL, Morrow M, Ljung BM. Diet and the risk of salivary gland cancer. *Am J Epidemiol.* 1997;146:171-176.
41. Junqueira LC, Carneiro J. Anhangdrüsen des Verdauungskanalns. In: Schiebler TH, ed. *Histologie.* 1996; Würzburg: Springer-Verlag.
42. Kessler A, Handler SD. Salivary gland neoplasms in children: a 10-year survey at the Children's Hospital of Philadelphia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1994;29:195-202.
43. Koivunen P, Suutala L, Schorsch I et al. Malignant epithelial salivary gland tumors in northern Finland: incidence and clinical characteristics. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2002;259:146-149.
44. Lang S, Rotter N, Lorenzen A et al. [Salivary gland carcinomas. 1. Epidemiology, etiology, malignancy criteria, prognostic parameters and classification]. *HNO.* 2005;53:817-826.
45. Leivo I. Insights into a complex group of neoplastic disease: advances in histopathologic classification and molecular pathology of salivary gland cancer. *Acta Oncol.* 2006;45:662-668.

46. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J*. 1998;17:3385-3397.
47. Lennerz JK, Perry A, Mills JC et al. Mucoepidermoid carcinoma of the cervix: another tumor with the t(11;19)-associated CRTC1-MAML2 gene fusion. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:835-843.
48. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell*. 1999;4:1029-1040.
49. Lima RA, Tavares MR, Dias FL et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;133:702-708.
50. Locati LD, Quattrone P, Bossi P et al. A complete remission with androgen-deprivation therapy in a recurrent androgen receptor-expressing adenocarcinoma of the parotid gland. *Ann Oncol*. 2003;14:1327-1328.
51. Loning T, Jakel KT. [Salivary gland tumors--tumor typing and grading]. *Pathologe*. 2004;25:38-45.
52. Lopes MA, Kowalski LP, da Cunha SG et al. A clinicopathologic study of 196 intraoral minor salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:264-267.
53. Lueck NE, Robinson RA. High levels of expression of cytokeratin 5 are strongly correlated with poor survival in higher grades of mucoepidermoid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2008;61:837-840.
54. Maiorano E, Favia G, Maisonneuve P et al. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol*. 1998;185:167-174.
55. Martins C, Cavaco B, Tonon G et al. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn*. 2004;6:205-210.
56. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352:476-487.
57. Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med*. 2006;6:905-918.
58. Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H et al. Prognostic significance of p27Kip1, Ki-67, and CRTC1-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:1432-1441.
59. Modan B, Chetrit A, Alfandary E et al. Increased risk of salivary gland tumors after low-dose irradiation. *Laryngoscope*. 1998;108:1095-1097.
60. Monoo K, Sageshima M, Ito E et al. [Histopathological grading and clinical features of patients with mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 2003;106:192-198.

61. Monteiro LS, Bento MJ, Palmeira C et al. Epidermal growth factor receptor immunoexpression evaluation in malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med.* 2009;38:508-513.
62. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2005;6:279-286.
63. Morrison LE, Jacobson KK, Friedman M et al. Aberrant EGFR and chromosome 7 associate with outcome in laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 2005;115:1212-1218.
64. Muscat JE, Wynder EL. A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;118:195-198.
65. Nance MA, Seethala RR, Wang Y et al. Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Cancer.* 2008;113:2082-2089.
66. Nasser SM, Faquin WC, Dayal Y. Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am J Clin Pathol.* 2003;119:801-806.
67. Normanno N, De LA, Bianco C et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366:2-16.
68. O'Neill ID. t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol.* 2008.
69. Ogata H, Ebihara S, Mukai K. Salivary gland neoplasms in children. *Jpn J Clin Oncol.* 1994;24:88-93.
70. Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H et al. MECT1-MAML2 fusion transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3902-3907.
71. Ostman J, Anneroth G, Gustafsson H et al. Malignant salivary gland tumours in Sweden 1960-1989--an epidemiological study. *Oral Oncol.* 1997;33:169-176.
72. Park S, James CD. ECop (EGFR-coamplified and overexpressed protein), a novel protein, regulates NF-kappaB transcriptional activity and associated apoptotic response in an IkappaBalpha-dependent manner. *Oncogene.* 2005;24:2495-2502.
73. Pinkston JA, Cole P. Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120:834-840.
74. Press MF, Finn RS, Cameron D et al. HER-2 gene amplification, HER-2 and epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression, and lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7861-7870.
75. Razak AR, Siu LL, Le TC. Molecular targeted therapies in all histologies of head and neck cancers: an update. *Curr Opin Oncol.* 2010;22:212-220.
76. Renehan AG, Gleave EN, Slevin NJ et al. Clinico-pathological and treatment-related factors influencing survival in parotid cancer. *Br J Cancer.* 1999;80:1296-1300.

77. Rizkalla H, Toner M. Necrotizing sialometaplasia versus invasive carcinoma of the head and neck: the use of myoepithelial markers and keratin subtypes as an adjunct to diagnosis. *Histopathology*. 2007;51:184-189.
78. Ron E, Saftlas AF. Head and neck radiation carcinogenesis: epidemiologic evidence. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;115:403-408.
79. Rubin GJ, Melhem MF, Gooding WE et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:824-832.
80. Saku T, Hayashi Y, Takahara O et al. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer*. 1997;79:1465-1475.
81. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19:183-232.
82. Schramm VL, Jr., Imola MJ. Management of nasopharyngeal salivary gland malignancy. *Laryngoscope*. 2001;111:1533-1544.
83. Seethala RR, Dacic S, Cieply K et al. A reappraisal of the MECT1/MAML2 translocation in salivary mucoepidermoid carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1106-1121.
84. Sheikh MS, Carrier F, Johnson AC et al. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene*. 1997;15:1095-1101.
85. Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis*. 2002;8:229-240.
86. Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J et al. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol*. 2000;148:385-397.
87. Sun EC, Curtis R, Melbye M et al. Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8:1095-1100.
88. Swanson GM, Burns PB. Cancer incidence among women in the workplace: a study of the association between occupation and industry and 11 cancer sites. *J Occup Environ Med*. 1995;37:282-287.
89. ----Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Ann Epidemiol*. 1997;7:369-374.
90. Sygut D, Bien S, Ziolkowska M et al. Immunohistochemical expression of androgen receptor in salivary gland cancers. *Pol J Pathol*. 2008;59:205-210.
91. Takeichi N, Hirose F, Yamamoto H. Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. I. Epidemiologic observations. *Cancer*. 1976;38:2462-2468.
92. Takeichi N, Hirose F, Yamamoto H et al. Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. II. Pathologic study and supplementary epidemiologic observations. *Cancer*. 1983;52:377-385.
93. Terhaard CH, Lubsen H, Van dT, I et al. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head Neck*. 2004;26:681-692.

94. Tirado Y, Williams MD, Hanna EY et al. CRTC1/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin's tumors: implications for histogenesis and biologic behavior. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46:708-715.
95. Tonon G, Modi S, Wu L et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet*. 2003;33:208-213.
96. Tsai CC, Chen CL, Hsu HC. Expression of Epstein-Barr virus in carcinomas of major salivary glands: a strong association with lymphoepithelioma-like carcinoma. *Hum Pathol*. 1996;27:258-262.
97. Tzeng CW, Frolov A, Frolova N et al. EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients. *J Surg Res*. 2007;143:20-26.
98. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y et al. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer*. 2000;89:484-487.
99. Vidal L, Tsao MS, Pond GR et al. Fluorescence in situ hybridization gene amplification analysis of EGFR and HER2 in patients with malignant salivary gland tumors treated with lapatinib. *Head Neck*. 2009;31:1006-1012.
100. Weinreb I, Seethala RR, Perez-Ordóñez B et al. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma: clinicopathologic description in a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:409-416.
101. Wells A, Welsh JB, Lazar CS et al. Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science*. 1990;247:962-964.
102. Williams MD, Roberts DB, Kies MS et al. Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: empirical and therapeutic significance. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2266-2274.
103. Williamson JD, Simmons BH, El-Naggar A et al. Mucoepidermoid carcinoma involving Warthin tumor. A report of five cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 2000;114:564-570.
104. Wong TW, Lee FY, Yu C et al. Preclinical antitumor activity of BMS-599626, a pan-HER kinase inhibitor that inhibits HER1/HER2 homodimer and heterodimer signaling. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6186-6193.
105. Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:8865-8874.
106. Wu L, Liu J, Gao P et al. Transforming activity of MECT1-MAML2 fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *EMBO J*. 2005;24:2391-2402.
107. Wu L, Sun T, Kobayashi K et al. Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7688-7700.
108. Xu YH, Ishii S, Clark AJ et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells. *Nature*. 1984;309:806-810.

109. Zandi R, Larsen AB, Andersen P et al. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal*. 2007;19:2013-2023.
110. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N et al. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20:408-412.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

A. = Arteria

Aa. = Arteriae

AFIP = Armed forces institute of pathology

Ca = Karzinom

CEN = Centromer

Chr. = Chromosom

CI = Konfidenzintervall

CK = Zytokeratin

CREB = cAMP-response element binding protein

DAB = Diaminobenzidintetrahydrochlorid

DAPI = 4,6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid

EGF = Epidermal growth factor

EGFR = Epidermal growth factor receptor

EMC = Epithelial-myoepitheliales Karzinom

FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Gl. = Glandula

H&E = Hämatoxylin & Eosin

Her2 = Her2/neu = Human epidermal growth factor receptor 2

M. = Musculus

MAML2 = mastermind-like gene family 2

MEC = Mukoepidermoidkarzinom

MECT1 = Mucoepidermoid carcinoma translocated gene 1 = CRTC1 = CREB-regulated transcription coactivator 1

N. = Nervus

NOS = Not otherwise specified

n.s. = nicht signifikant

p = Signifikanzwert

PAS = Periodsäure-Schiff-Reaktion

PEC = Plattenepithelkarzinom

RT-PCR = Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

SSC = Sodium citrate standard

TMA = Tissue microarray

UICC = Union internationale contre le cancer

V. = Vena

Vv. = Venae

WHO = World Health Organization

6.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gero Brockhoff für die freundliche Themenstellung der Dissertation und seine zuvorkommende Unterstützung.

Großer Dank gilt ferner Herrn PD Dr. Stephan Schwarz-Furlan für die gute Betreuung dieser Arbeit trotz räumlicher Distanz, seine konstruktive Kritik und für seine Geduld. Ich möchte ihm insbesondere für seine qualifizierten Ratschläge danken.

Frau Marietta Bock und Herrn Rudolf Jung möchte ich für die Einarbeitung in die Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der Immunhistochemie danken. Beide standen als Ansprechpartner bei technischen Fragen/Problemen stets zur Verfügung.

Allen weiteren hilfsbereiten Mitgliedern des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg, die nicht namentlich erwähnt sind, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Schließlich gilt ein ganz herzlicher Dank meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich unterstützt hat, besonders auch meiner Schwester Nicole Beck, welche mir als gutes Vorbild voranging und meiner Freundin Stefanie Königer, die mir mit Rat zur Seite stand.