

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENSTATUS VON PTEN UND C-MET IN SPEICHELDRÜSENKARZINOMEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Baader

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENSTATUS VON PTEN UND C-MET IN SPEICHELDRÜSENKARZINOMEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Baader

2013

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert |
| 1. Berichterstatter: | Priv.-Doz. Dr. Dr. Tobias Ettl |
| 2. Berichterstatter: | Priv.-Doz. Dr. Sebastian Hahnel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 26.06.2013 |

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Maligne Speicheldrüsentumoren | 1 |
| 1.1 Hintergründe | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Ätiologie | 1 |
| 1.1.3 Symptomatik | 2 |
| 1.1.4 Diagnostik | 3 |
| 1.1.5 Spezielle diagnostische Methoden | 3 |
| 1.1.5.1 Tissue Microarray | 3 |
| 1.1.5.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung | 3 |
| 1.2 Histologische Klassifikation | 4 |
| 1.2.1 Mukoepidermoidkarzinom (ICD-O 8430/3) | 5 |
| 1.2.2 Adenoid-zystisches Karzinom (ICD-O: 8200/3) | 7 |
| 1.2.3 Azinuszellkarzinom (ICD-O: 8550/3) | 8 |
| 1.2.4 Speicheldrüsenkarzinom (ICD-O: 8500/3) | 9 |
| 1.2.5 Polymorphes niedrig-malignes Karzinom (ICD-O: 8525/3) | 11 |
| 1.3 Staging | 12 |
| 1.3.1 TNM-Klassifikation der UICC | 12 |
| 1.3.2 C-Faktor | 14 |
| 1.3.3 Tumorgraduierung | 15 |
| 1.3.4 R-Klassifikation | 16 |
| 1.4 Therapie | 17 |
| 1.4.1 Chirurgie | 17 |
| 1.4.2 Lymphadenektomie | 19 |
| 1.4.3 Strahlentherapie | 22 |
| 1.4.4 Chemoprävention und Antikörpertherapie | 23 |
| 1.5 Genetik | 23 |
| 1.5.1 Aktuelle Forschung | 23 |
| 1.5.2 PTEN | 25 |
| 1.5.3 c-Met | 26 |
| 2 Fragestellung | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3 Patienten und Methoden | 28 |
| 3.1 Patienten | 28 |
| 3.2 Datenerhebung | 28 |
| 3.2.1 Histopathologie und Klassifizierung | 28 |
| 3.2.2 Tissue Microarray | 29 |
| 3.2.3 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung: Färbeprotokoll | 29 |
| 3.2.4 Verwendete Materialien und Reagenzien | 31 |
| 3.2.5 FISH-Sonden | 32 |
| 3.2.6 FISH-Analyse | 34 |
| 3.2.7 Auswertungskriterien für PTEN | 34 |
| 3.2.8 Auswertungskriterien für c-Met | 35 |
| 3.3 Statistische Analyse | 36 |
| 4 Ergebnisse | 37 |
| 4.1 Deskriptive Analyse: Klinisch-pathologische Parameter | 37 |
| 4.1.1 Tumorentitäten, Geschlecht und Alter | 40 |
| 4.1.2 Lokalisation | 41 |
| 4.1.3 TNM-Klassifikation und Tumorstadium | 41 |
| 4.1.4 Grading | 43 |
| 4.1.5 Therapie und Resektionsstatus | 44 |
| 4.1.6 Rezidive | 46 |
| 4.2 Deskriptive Analyse: FISH-Ergebnisse | 47 |
| 4.2.1 PTEN | 47 |
| 4.2.2 c-Met | 51 |
| 4.2.3 PTEN und c-Met | 55 |
| 4.3 Univariate Überlebensanalyse: Klinisch-pathologische Parameter | 57 |
| 4.3.1 Tumorentitäten, Geschlecht und Alter | 59 |
| 4.3.2 Lokalisation | 60 |
| 4.3.3 Grading | 61 |
| 4.3.4 TNM-Klassifikation und Tumorstadium | 62 |
| 4.3.5 Therapie und Resektionsstatus | 64 |
| 4.3.6 Rezidive | 66 |
| 4.4 Univariate Überlebensanalyse: Genstatus | 67 |
| 4.4.1 PTEN | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.2 c-Met | 67 |
| 4.5 Multivariate Überlebensanalyse | 69 |
| 5 Diskussion..... | 70 |
| 5.1 Diskussion der Methodik | 70 |
| 5.1.1 Tumorentitäten und Fallzahl | 70 |
| 5.1.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung..... | 71 |
| 5.1.3 Tissue Microarray | 71 |
| 5.2 Diskussion der Ergebnisse | 72 |
| 5.2.1 Deskriptive Analyse: Klinisch-pathologische Parameter..... | 72 |
| 5.2.1.1 Tumorhistologie | 72 |
| 5.2.1.2 Lokalisation, Geschlechts- und Altersverteilung | 73 |
| 5.2.1.3 Grading..... | 74 |
| 5.2.1.4 TNM-Klassifikation | 75 |
| 5.2.1.5 Therapie und Residualtumor | 76 |
| 5.2.1.6 Rezidive..... | 77 |
| 5.2.2 Deskriptive Analyse: FISH-Ergebnisse | 78 |
| 5.2.2.1 PTEN | 78 |
| 5.2.2.2 c-Met | 79 |
| 5.2.2.3 PTEN und c-Met | 80 |
| 5.2.3 Überleben und Prognose: Klinisch-pathologische Parameter..... | 80 |
| 5.2.3.1 Histologischer Subtyp | 80 |
| 5.2.3.2 Lokalisation, Geschlecht und Alter | 82 |
| 5.2.3.3 Grading..... | 82 |
| 5.2.3.4 TNM-Klassifikation | 83 |
| 5.2.3.5 Therapie und Resektionsstatus | 84 |
| 5.2.3.6 Rezidive..... | 84 |
| 5.2.4 Überleben und Prognose: FISH-Ergebnisse..... | 84 |
| 5.2.4.1 PTEN | 84 |
| 5.2.4.2 c-Met | 85 |
| 5.2.4.3 Multivariate Überlebensanalyse | 86 |
| 6 Zusammenfassung und Fazit..... | 88 |
| Literaturverzeichnis | 90 |

1 Maligne Speicheldrüsentumoren

1.1 Hintergründe

1.1.1 Epidemiologie

Speicheldrüsenmalignome machen etwa 4% aller bösartigen Kopf-Hals-Neoplasien und weniger als 1% aller malignen Erkrankungen aus [Kokemüller et al., 2004]. Generell befinden sich Speicheldrüsentumoren zu 64-80% in der Gl. parotis, meistens im lateralen Drüsenanteil, zu 7-11% in der Gl. submandibularis, zu weniger als 1% in der Gl. sublingualis und zu 9-23% in den kleinen Speicheldrüsen, wobei 54-79% all dieser Neoplasien gutartig und 21-46% bösartig sind. Der Anteil der Malignome beträgt für die Gl. parotis 15-32%, die Gl. submandibularis 41-45%, die Gl. sublingualis 70-90% und die kleinen Speicheldrüsen 50%. Tumoren des Mundbodens, der Zunge oder retromolarer Bereiche sind zu 80-90% maligne. Bezüglich der Geschlechterverteilung scheinen Frauen generell etwas häufiger betroffen zu sein als Männer, allerdings können je nach Tumortyp Diskrepanzen auftreten. Das Durchschnittsalter von Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen beträgt ca. 47 Jahre. Der Altersgipfel liegt für einige Tumortypen zwischen 50 und 70 Jahren, variiert allerdings je nach Entität und wird z. B. für pleomorphe Adenome, Mukoepidermoid- und Azinuszellkarzinome mit 20 bis 40 Jahren angegeben. Die zahlreichsten gutartigen Neoplasien sind das pleomorphe Adenom und der Warthin-Tumor, das Mukoepidermoidkarzinom ist der häufigste maligne Tumor [Eveson et al., 2005].

1.1.2 Ätiologie

Einige Viren stehen im Verdacht, hinsichtlich der Speicheldrüsentumorgenese eine Rolle zu spielen: Zusammenhänge bestünden z. B. zwischen Epstein-Barr-Virusinfektionen und lymphoepithelialen Karzinomen, die weniger als 1% aller Speicheldrüsenkarzinome ausmachen. Allerdings konnten diese Korrelationen hauptsächlich für bestimmte Regionen und ethnische Gruppen, wie beispielsweise die Inuit der Arktis, Südost-Chinesen und Japaner nachgewiesen werden [Eveson et al., 2005; Manganaris et al., 2007]. Einzelstudien berichten jedoch z. B. auch von einer Patientin aus dem Kaukasus mit einem lymphoepithelialen Karzinom und Epstein-Barr-viruspositiver Serologie [Manganaris et al., 2007].

Weitere Hinweise gibt es auf Zusammenhänge zwischen ionisierender Strahlung und der Pathogenese maligner Speicheldrüsentumoren: Menschen, die der Strahlenexposition der Atombombendetonationen von Hiroshima und Nagasaki ausgesetzt waren, unterliegen einem elfmal höheren Risiko, an einer malignen Speicheldrüsenneoplasie – insbesondere einem Mukoepidermoidkarzinom – zu erkranken. Auch von therapeutisch verwendeter Strahlung, z. B. bei Schilddrüsenerkrankungen eingesetztem Iodine131, Röntgen- und UV-Strahlung, scheint ein verstärktes Risiko auszugehen [Eveson et al., 2005].

Berufsgruppen, die mit diversen Stoffen wie Asbest, Gummi, Nickel, Zementstaub oder in Kosmetik verwendeten Substanzen arbeiten, erkranken ebenfalls häufiger an Speicheldrüsenkarzinomen [Eveson et al., 2005]. Während Zusammenhänge zwischen Nikotinabusus und der Entwicklung von Warthin-Tumoren belegt werden konnten, besteht bis heute keine Assoziation mit malignen Speicheldrüsenneoplasien. Dasselbe gilt für Alkoholkonsum. Cholesterinreiche Nahrung steht im Verdacht, als Risikofaktor gewertet werden zu können [Eveson et al., 2005].

1.1.3 Symptomatik

Das klinische Erscheinungsbild und Verhalten von malignen Tumoren der großen Kopfspeicheldrüsen kann sehr stark variieren. Etwa 40% der Karzinome verhalten sich asymptomatisch und imponieren als langsam wachsende, schmerzlose Masse, wobei erst nach stark vorangeschrittenem Wachstum bisweilen Schmerzen oder Nervenausfälle auftreten. Bei weiteren 40% der Tumoren konnten indes Symptome wie aggressives Wuchsverhalten oder Paralyse des N. facialis beobachtet werden. Letztere deutet immer auf eine Nervinfiltration eines Parotis-Malignoms hin. Karzinome im fortgeschrittenen Stadium manifestieren sich klinisch häufig mit Symptomen wie einer Kieferklemme, einer Fistelbildung und Gewebezunahme im Bereich des Gaumens oder Rachens sowie Ulzerationen der Haut. Etwa die Hälfte der Malignome der kleinen Speicheldrüsen verursacht eine schmerzlose Schwellung der Submukosa, oftmals werden kleine Ulzerationen der Mukosa beobachtet. Fortgeschrittene Tumoren des Epipharynx oder der Nasenhöhle gehen zum Teil mit Gesichtsschmerzen, Nasenbluten oder Verlegung der Atemwege, Tumoren des Kehlkopfes oder der Trachea mit Dyspnoe, Heiserkeit und Stimmveränderungen einher [Guzzo et al., 2009].

1.1.4 Diagnostik

Sonografie, Computertomografie (CT), CT-gestützte Sialografie und Magnetresonanztomografie sind die gängigen bildgebenden Verfahren in der Diagnostik maligner Speicheldrüsenneoplasien [Eveson et al., 2005]. Die sogenannte Feinnadelaspirations-Biopsie (FNA-Biopsie), häufig auch Sonografie-gestützt durchgeführt [Cho et al., 2011], hat sich sowohl als diagnostische Methode als auch als wichtiges Hilfsmittel in der Auswahl eines sinnvollen Therapiekonzepts bewährt. Literaturangaben berichten über eine korrekte Differenzierung maligner von benignen Neoplasien mit Hilfe der FNA-Biopsie in 81-98% der Fälle, während eine eindeutige Diagnose bei nur 60-75% gelingt. Die Präzision der Auswertung von Gefrierschnitten wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Benigne Tumoren können zu 98,7% korrekt diagnostiziert werden, wohingegen die fehlerfreie Auswertungsrage für maligne Tumoren bei nicht zufriedenstellenden 85,9% liegt. Pleomorphe Adenome werden mit dieser Methode am häufigsten fälschlicherweise als maligne Neoplasien, Mukoepidermoidkarzinome sehr oft als benigne Tumoren bewertet [Eveson et al., 2005].

1.1.5 Spezielle diagnostische Methoden

1.1.5.1 Tissue Microarray

Die Wirksamkeit der Methode der Tissue Microarrays (TMAs) wurde erstmals 1998 in einer Studie von KONONEN ET AL. beschrieben. Für die Herstellung wird mit Hilfe einer Stanze Gewebe aus Tumorböcken entnommen und an definierte Stellen in einem Empfängerblock transferiert. Anschließend wird dieser geschnitten und auf einen Objektträger übertragen. Die TMAs bieten somit die Möglichkeit, Gewebepöben eines umfangreichen Kollektivs auf einem Objektträger zu platzieren [Kononen et al., 1998; Henshall, 2003; Kearney und Shipley, 2012].

1.1.5.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Seit Ende der 1980er Jahre nimmt die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH), die sich

von der isotopischen, radioaktive Sonden verwendenden, in Situ-Hybridisierung ableitet, einen enormen Stellenwert in der Diagnostik und medizinischen Forschung ein. Mit Hilfe fluoreszierender Sonden lassen sich spezifische Chromosomenabschnitte darstellen, wobei die DNA-Sonde und der nachzuweisende Genabschnitt aus jeweils komplementären Nukleotidsequenzen bestehen [Mulisch und Welsch, 2010]. Die verwendeten Sonden beinhalten modifizierte Nukleotide, die mit Reportermolekülen ausgestattet sind, an welche fluoreszenzmarkierte Affinitätsmoleküle angelagert sind [Buselmaier, 2012]. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops können die entsprechenden Gensequenzen optisch sichtbar gemacht und analysiert werden.

1.2 Histologische Klassifikation

Nach der aktuellen Einteilung der World Health Organization (Tab. 1) können 24 verschiedene maligne epitheliale Speicheldrüsenneoplasien unterschieden werden. Jedem Tumortypus ist ein Code nach der ICD-O (*International Classification of Diseases for Oncology*) zugeteilt. Eine nachgestellte „3“ steht für eine maligne und eine „1“ für eine grenzwertige, nicht sicher einschätzbare Tumorsituation [Barnes et al., 2005].

Tab. 1: Histologische Klassifikation der malignen Speicheldrüsenneoplasien [Barnes et al., 2005]

| Tumortyp | ICD-O |
|---|--------------|
| Azinuszellkarzinom | 8550/3 |
| Mukoepidermoidkarzinom | 8430/3 |
| Adenoid-zystisches Karzinom | 8200/3 |
| Polymorphes niedrig-malignes Karzinom | 8525/3 |
| Epitheliales-myoepitheliales Karzinom | 8562/3 |
| Klarzelliges Karzinom NOS (not otherwise specified) | 8310/3 |
| Basalzelladenokarzinom | 8147/3 |
| Talgdrüsenkarzinom | 8410/3 |
| Talgdrüsenlymph-Adenokarzinom | 8410/3 |

| | |
|--|--------|
| Zystadenokarzinom | 8440/3 |
| Niedrig-malignes kribriiformes Zystadenokarzinom | |
| Muzinöses Adenokarzinom | 8480/3 |
| Onkozytäres Karzinom | 8290/3 |
| Speicheldrangkarzinom/Duktales Adenokarzinom | 8500/3 |
| Adenokarzinom NOS | 8140/3 |
| Myoepitheliales Karzinom | 8982/3 |
| Karzinom aus pleomorphem Adenom | 8941/3 |
| Karzinom Sarkom | 8980/3 |
| Metastasierendes pleomorphes Adenom | 8940/1 |
| Plattenepithelkarzinom | 8070/3 |
| Kleinzelliges Karzinom | 8041/3 |
| Großzelliges Karzinom | 8012/3 |
| Lymphoepitheliales Karzinom | 8082/3 |
| Sialoblastom | 8974/1 |

Die am zahlreichsten auftretenden und im Hinblick auf die vorliegende Arbeit besonders relevanten Tumorentitäten sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.2.1 Mukoepidermoidkarzinom (ICD-O 8430/3)

Mit 30% tritt das Mukoepidermoidkarzinom als häufigster maligner Speicheldrüsentumor auf [Peel und Seethala, 2007]. Das Durchschnittsalter liegt bei ca. 45 Jahren, wobei das Mukoepidermoidkarzinom auch als häufigstes Speicheldrüsenkarzinom bei Kindern gilt. Frauen erkranken etwas öfters als Männer [Di Palma et al., 2006].

Der Tumor entsteht in 50-60% der Fälle in den großen Speicheldrüsen, dabei ist zu etwa 80% die Parotis, 8-13% die Gl. submandibularis und 2-4% die Gl. sublingualis betroffen [Peel und Seethala, 2007]. Intraoral ist er meistens in Gaumen und Wangenmukosa aufzufinden [Goode und El-Naggar, 2005]. Üblicherweise breitet sich das Mukoepidermoidkar-

zinom als schmerzlose und langsam zunehmende Schwellung von unverschieblicher und derber Konsistenz, zystischer, prall-glatter Beschaffenheit und bräunlich bis pinkem Colorit aus. Seine makroskopischen Erscheinungsformen reichen von definiert abgrenzbar bis infiltrativ wachsend [Peel und Seethala, 2007; Goode und El-Naggar, 2005].

In Mukoepidermoidkarzinomen finden sich schleimbildende, Plattenepithel- und Intermediärzellen. Im histologischen Grading kann aufgrund der diagnostizierten zytologischen und morphologischen Charakteristika des Tumors eine Einteilung in drei Stufen vorgenommen werden: In den gut abgrenzbaren niedrig-malignen Mukoepidermoidkarzinomen sind zahlreiche, zum Teil schleimgefüllte, zystische Hohlräume enthalten, selten werden Mitosen, niemals perineurale Invasionen gefunden (Abb. 1). Die oftmals das angrenzende Gewebe infiltrierenden mittelgradig-malignen Tumoren enthalten weniger und kleinere Zysten und führen selten zu neuralen Infiltrationen. Hoch-maligne, generell in benachbarte Gewebe einwachsende, Mukoepidermoidkarzinome zeigen ein solides, kaum zystisches Wachstumsmuster sowie zahlreiche Zell- und Kernpleomorphismen, Mitosen und neurale Invasionen [Peel und Seethala, 2007].

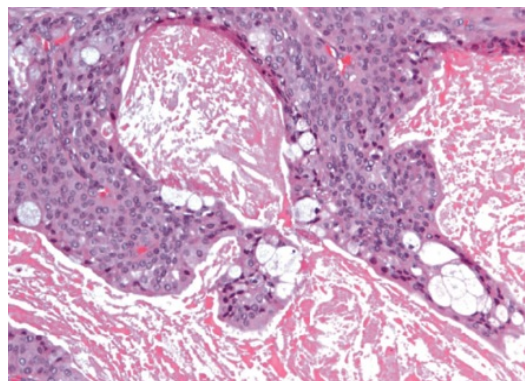


Abb. 1: Niedrig-malignes Mukoepidermoidkarzinom mit zystischem Wachstumsmuster
[Peel und Seethala, 2007]

Sowohl im Grading als auch in der Differentialdiagnostik spielen MUC1, MUC4 und MUC5AC als immunhistologische Tumormarker eine wichtige Rolle: Die MUC1-Werte steigen in Korrelation mit dem Malignitätsgrad im Gegensatz zu MUC4. Der Nachweis von MUC5AC hilft bei der Unterscheidung des high-grade Mukoepidermoidkarzinoms vom Plattenepithelkarzinom. Auch HER2/neu oder Ki-67 gelten als wichtige Marker zur Einstufung der Malignität [Peel und Seethala, 2007]. Zu einem weniger aggressiven klinischen Verlauf und einer weitaus besseren Prognose kommt es zudem bei einer nachgewiesenen Translokation t(11,19) des MECT1- und MAML2-Gens [Schwarz et al., 2009;

O'Neill, 2009].

Eine Neigung zur Metastasierung haben vor allem hoch-maligne Tumoren, wobei sich Fernmetastasen überwiegend in Lunge und Knochen bilden. Die Fünfjahres-Überlebensrate variiert zwischen 92-100% bei niedrig-malignen und 0-43% bei hoch-malignen Tumoren. Patienten über 40 Jahren haben eine generell schlechtere Prognose [Peel und Seethala, 2007].

1.2.2 Adenoid-zystisches Karzinom (ICD-O: 8200/3)

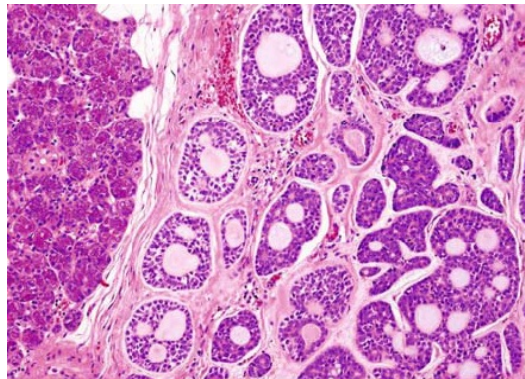
Das adenoid-zystische Karzinom manifestiert sich mit einer Inzidenz von 20% als der zweithäufigste maligne Speicheldrüsentumor, wobei in 35-55% der Fälle die kleinen Speicheldrüsen, vor allem in Gaumen, Zunge, Wangenmukosa, Lippe und Mundboden, betroffen sind. Somit gilt das adenoid-zystische Karzinom als der häufigste maligne epitheliale Tumor der kleinen Speicheldrüsen. Frauen und Männer sind in etwa gleich stark betroffen, der Altersgipfel liegt zwischen 40 und 60 Jahren [Peel und Seethala, 2007; El-Naggar und Huvos, 2005]. Das tückische Charakteristikum des adenoid-zystischen Karzinoms ist seine perineurale Ausbreitung, oftmals weit über die klinisch erkennbaren Tumorgrenzen hinweg. Seine Symptome sind langsames Wachstum und durch die perineurale Ausdehnung bedingte Schmerzen bis hin zur Fazialisparese. Es imponiert als bräunlich pralle, nicht abgekapselte Geschwulst [El-Naggar und Huvos, 2005].

Der Tumor ist hauptsächlich aus duktalem und modifizierten myoepithelialen Zellen zusammengesetzt [El-Naggar und Huvos, 2005]. Ferner kann eine Unterteilung in drei Wachstumsmuster vorgenommen werden: Der am öftesten vorkommende kribriiforme Typ ist durch myoepitheliale Zellnester und Pseudolumina charakterisiert, wodurch sein typisches „Schweizer-Käse-Muster“ entsteht (Abb. 2) [Peel und Seethala, 2007].

Beim tubulären Typ sind Drüsengänge mit einer inneren epithelialen und einer äußeren myoepithelialen Zellschicht zu erkennen. Rundlich-gelappte Zellnester und -inseln sowie zentrale komedoartige Nekrosen bestimmen das histologische Erscheinungsbild des soliden Wachstumsmusters. Außerdem finden sich im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Typen zahlreiche Pleomorphismen und Mitosen [Peel und Seethala, 2007].

Tumoren vom kribriiformen oder tubulären Typ wird eine bessere Prognose zugeschrieben als denjenigen, die mehr als 30% des soliden Wachstumsmusters aufweisen. Darüber hinaus spielen auch klinisches Staging, Tumoralage und Knochenbeteiligung eine wichtige

Rolle [El-Naggar und Huvos, 2005].



**Abb. 2: Adenoid-zystisches Karzinom mit kribriformem Wachstumsmuster:
„Schweizerkäsemuster“ [Di Palma et al., 2006]**

In immunhistologischen Untersuchungen wurde bewiesen, dass ein p53-Anstieg ebenfalls zu einer schlechteren Prognose führt [Peel und Seethala, 2007]. Metastasen entstehen weniger in den regionären Lymphknoten (5-25%) als vielmehr in Lunge, Knochen, Gehirn und Leber (25-55%). 16-85% der Patienten entwickeln Rezidive, 80-90% sterben innerhalb von 10-15 Jahren [El-Naggar und Huvos, 2005].

1.2.3 Azinuszellkarzinom (ICD-O: 8550/3)

12-17% aller malignen Speicheldrüsentumoren sind Azinuszellkarzinome. Frauen sind generell etwas häufiger betroffen als Männer, das Durchschnittsalter liegt bei etwa 44 Jahren [Di Palma et al., 2006]. In ungefähr 80% der Fälle manifestiert sich der Tumor in der Gl. parotis, zu 16% in den kleinen Speicheldrüsen und zu 4% in der Gl. submandibularis. Dabei kommt es bei ca. 22% der Patienten zu einem schmerzhaften Verlauf und bei 3-8% zu einer Fazialisparese. Ein bilaterales Auftreten des Tumors wurde wiederholt beobachtet [Peel und Seethala, 2007].

Klinisch ist das Azinuszellkarzinom durch langsames Wachstum und eine solide, verschiebbliche Konsistenz gekennzeichnet. Metastasen finden sich zunächst in den regionären Halslymphknoten, die selten auftretenden Fernmetastasen überwiegend in Lunge und Knochen [Ellis und Simpson, 2005; Peel und Seethala, 2007]. Die Wachstumsmuster des im Erscheinungsbild grau bis bräunlichen, bisweilen zystischen Azinuszellkarzinoms können in die Kategorien solide, mikrozystisch, papillär-zystisch und follikulär eingeteilt werden

(Abb. 3) [Peel und Seethala, 2007].

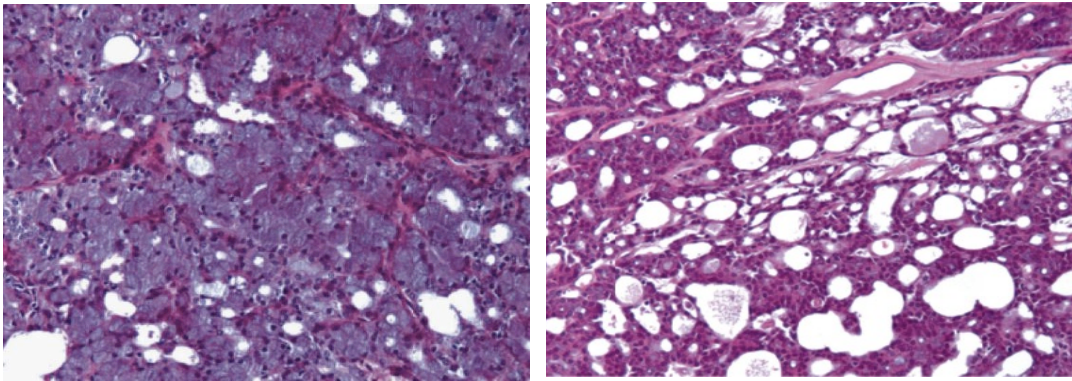


Abb. 3: Azinuszellkarzinom mit solidem (linkes Bild) und mikrozystischem (rechtes Bild) Wachstumsmuster [Peel und Seethala, 2007]

Im histologischen Aufbau des Tumors finden sich typischerweise Zellen, die regulären serösen Azinuszellen sehr ähnlich sind, als auch duktale Zellen der Schaltstücke sowie helle, vakuoläre und unspezifische glanduläre Zellen [Peel und Seethala, 2007].

In 10-35% der Fälle treten Rezidive, in 13-16% Fernmetastasen auf. Die Fünfjahresüberlebensrate wird mit 78-90%, die 20-Jahresüberlebensrate mit 44-67% angegeben. Aufgrund dessen und angesichts der Tatsache, dass Rezidivfälle sogar nach einem dreißigjährigen symptomfreien Zeitintervall beschrieben werden, lassen sich nur schwer prognostische Aussagen treffen [Peel und Seethala, 2007]. Auch auf der Basis des histologischen Gratings oder der Diagnose des Wachstumsmusters und auftretender Zelltypen kann nur eine unsichere Beurteilung stattfinden. Vielmehr sollte hierzu das Staging des Tumors oder die Immunhistologie herangezogen werden [Ellis und Simpson, 2005]. Eine Untersuchung ergab, dass, bezogen auf einen Untersuchungszeitraum von 30 Jahren, fünf von sieben Tumorpatienten mit einem MIB-1 Wert größer als 10% einer höheren Rezidivgefahr unterlagen [Peel und Seethala, 2007].

1.2.4 Speicheldrangkarzinom (ICD-O: 8500/3)

Das Speicheldrangkarzinom, ein aggressives Adenokarzinom mit großer Ähnlichkeit zum duktalem Mammakarzinom, macht etwa 9% aller malignen Speicheldrüsentumoren aus [Brandwein-Gensler et al., 2005]. Dabei sind zu ca. 78% die Parotis, 12% die Gl. submandibularis und 10% die kleinen Speicheldrüsen betroffen [Peel und Seethala, 2007]. Die

meisten Patienten sind über 50 Jahre alt, Männer erkranken etwa dreimal so häufig wie Frauen [Di Palma et al., 2006].

Mikroskopisch sind – ähnlich wie beim duktalem Mammakarzinom – zwei histopathologische Komponenten zu erkennen: Der intraduktale Bestandteil setzt sich aus soliden, kribriformen, papillären und komedonekroseartigen Wachstumsmustern mit seinen typischen, „römischen Brücken“ ähnelnden, Zellformationen zusammen (Abb. 4). Der invasive Anteil besteht aus cluster- und bandartigen Zellgruppierungen in einem desmoplastischen Stroma [Peel und Seethala, 2007; Brandwein-Gensler et al., 2005]. Häufig aufzufinden sind Kernpleomorphismen und Mitosefiguren [Di Palma et al., 2006].

Klinisch auffällig ist das rasche Wachstum, das oftmals mit starken Schmerzen und einer Parästhesie bzw. Parese des N. facialis einhergeht [Peel und Seethala, 2007]. In 60% der Fälle werden eine perineurale Ausbreitung, bei 31% der Patienten intravaskuläre Tumorablagerungen beschrieben [Brandwein-Gensler et al., 2005].

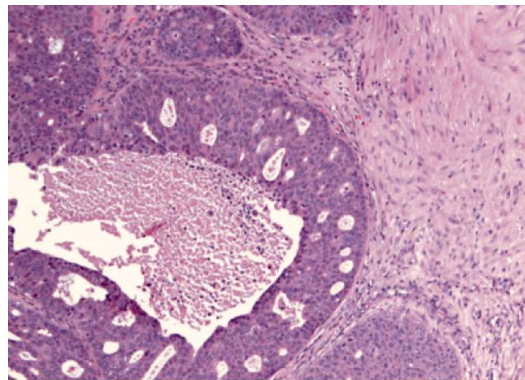


Abb. 4: Speicheldrangkarzinom: Kribriiformes und komedonekroseartiges Wachstumsmuster: „Römische Brücke“ [Peel und Seethala, 2007]

Aus einer Studie von JAEHNE ET AL. wird die Aggressivität dieser Neoplasie ersichtlich, da zwei Drittel aller Speicheldrangkarzinome in die Kategorien T3 oder T4 eingeteilt werden können [Jaehne et al., 2005]. Bei 60-80% findet man bereits initial zervikale Lymphknotenmetastasen. Zudem muss beachtet werden, dass rund die Hälfte aller klinisch negativen Lymphknoten bei mikroskopischer Begutachtung als tumorpositiv zu werten sind [Peel und Seethala, 2007]. Etwa 33% der Patienten erkranken an einem Rezidiv [Brandwein-Gensler et al., 2005], 33-66% entwickeln Fernmetastasen. Etwa zwei Drittel der Patienten sterben innerhalb der ersten vier Behandlungsjahre [Peel und Seethala, 2007].

Zur wesentlichen Verbesserung der Prognose tragen neben der Früherkennung die komplette operative Entfernung sowie eine Tumorgöße möglichst unter 3 cm bei. Allerdings

werden auch äußerst aggressive Verläufe mit Durchmessern von 2 cm und kleiner beschrieben [Di Palma et al., 2006]. In immunhistochemischen Untersuchungen imponiert eine Überexprimierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2 analog zu den duktalem Adenokarzinomen der Brustdrüse. Die HER2-Überexpression korreliert mit einer frühen Rezidiv- und Fernmetastasenbildung sowie einer geringeren Überlebensrate [Ettl et al., 2008].

1.2.5 Polymorphes niedrig-malignes Karzinom (ICD-O: 8525/3)

Das polymorphe niedrig-maligne Karzinom, das histologisch bestimmten Brustkrebsformen ähnlich ist, macht ca. 25% aller intraoralen malignen Tumoren der kleinen Speicheldrüsen aus, wobei es in etwa 60-70% der Fälle im Gaumen lokalisiert ist [Peel und Seethala, 2007]. Frauen sind ungefähr doppelt so oft betroffen wie Männer. Das Erkrankungsalter liegt üblicherweise zwischen 50 und 70 Jahren. Ausschlaggebend ist, dass sich im histologischen Vergleich verschiedener polymorpher niedrig-maligner Karzinome aber auch innerhalb eines einzelnen Tumors eine große Vielzahl an morphologischen Konfigurationen ergibt: Die gängigen Wachstumsmuster sind lobulär, papillär, papillär-zystisch, trabekulär oder kribriform (Abb. 5) [Luna und Wenig, 2005].

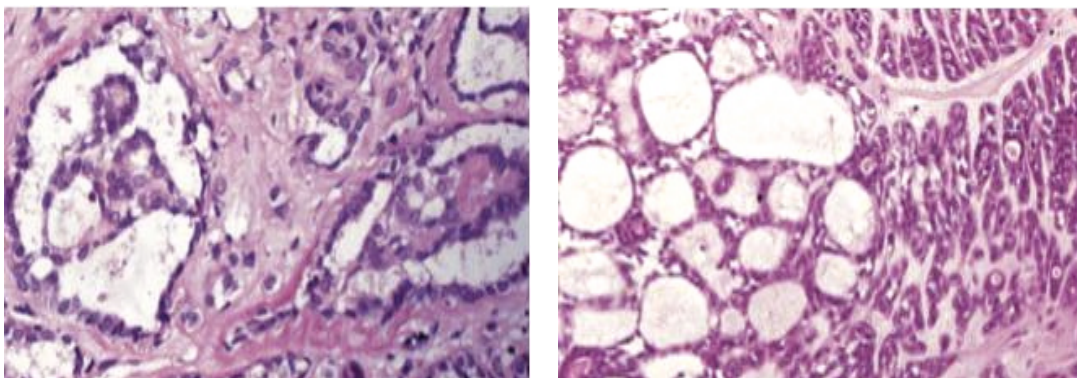


Abb. 5: Polymorphes niedrig-malignes Karzinom mit papillär-zystischem (linkes Bild) und kribriformem (rechtes Bild) Wachstumsmuster [Luna und Wenig, 2005]

Die wichtigsten Differentialdiagnosen sind das pleomorphe Adenom sowie das sich wesentlich aggressiver verhaltende adenoid-zystische Karzinom. Ersteres ist typischerweise gut umschrieben und wächst nicht infiltrativ [Luna und Wenig, 2005]. In der Abgrenzung des adenoid-zystischen Karzinoms kann die Anwendung verschiedener Proliferationsindi-

zes, wie z. B. des MIB1-Index, oder die typisch diffuse und kräftige Färbereaktion für das S-100 Protein hilfreich sein [Di Palma et al., 2006]. Die Malignität dieses Tumors ist in seiner Tendenz zu invasivem Wachstum sowie seiner Neigung zur Rezidivbildung, perineuralen Ausbreitung und Metastasierung begründet, weshalb das oberste Therapieziel in einer kompletten Tumorresektion liegt. Verschiedene Literaturangaben berichten über Rezidivraten zwischen 9,1-20%. Eine regionale Metastasierung liegt in 6-7% der Fälle vor, wobei vor allem Karzinome mit papillärem Wachstumsmuster mit einer höheren Inzidenz für Halslymphknotenmetastasen einherzugehen scheinen [Peel und Seethala, 2007]. Die meisten Patienten – mit Ausnahme derer, die an einem der seltenen entdifferenzierten Karzinome erkranken – besitzen eine ausgesprochen gute Prognose [Luna und Wenig, 2005].

1.3 Staging

1.3.1 TNM-Klassifikation der UICC

Um ein individuelles, auf den Patienten abgestimmtes, Therapiekonzept entwickeln zu können, ist es obligat, mit Hilfe des Stagings möglichst viele Informationen über den Allgemeinzustand des Patienten, die Tumorgröße und -lokalisierung sowie eine eventuelle (Fern-)Metastasierung zu gewinnen. Darüber hinaus dient das Staging der Abklärung, ob eine risikofreie Tumorentfernung im Gesunden (R0-Resektion) realisierbar ist und eventuell nicht-chirurgische Maßnahmen im Gesamtbehandlungskonzept notwendig und sinnvoll erscheinen [Weitz et al., 2010].

Das zwischen 1943 und 1952 erstmals von PIERRE DENOIX beschriebene und seit 1950 durch die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) stetig weiterentwickelte TNM-Schema dient durch Zusammenfassung repräsentativer, prognostisch und therapeutisch einheitlicher, Tumorgruppen der Klassifikation maligner Neoplasien (Tab. 2) [Sobin et al., 2009]. Es besteht aus drei Kategorien:

- T** Größe des Primärtumors
- N** Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen
- M** Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen [Sobin et al., 2009]

Ferner besteht die Möglichkeit einer klinischen (cTNM) und einer pathologisch-

anatomischen (pTNM) Einteilung. Während der Ersteren die präoperative klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, Biopsien oder auch die Auswertung serologischer Tumormarker zugrunde liegen, ergibt sich die Letztere aus der postoperativen pathohistologischen Befundung des Resektats [Müller-Hermelink und Papadopoulos, 2010]. Dabei hat die pTNM-Klassifikation, welche grundsätzlich als die Zuverlässigere zu werten ist, die Aufgabe, die klinische Einteilung zu verifizieren, zu komplettieren oder eventuelle Änderungen vorzunehmen und eine Beurteilung des chirurgischen Therapieergebnisses sowie der Prognose zu ermöglichen [Wittekind, 2010].

Die aktuelle TNM-Klassifikation für Speicheldrüsenmalignome stammt aus dem Jahr 2009 [Sobin et al., 2009]. Die im Folgenden aufgeführte T-Klassifikation bezieht sich auf die großen Kopfspeicheldrüsen, die N- und M-Stadien stimmen mit denjenigen der Mundhöhlenkarzinome überein [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Die Einteilung von Malignomen der kleinen Speicheldrüsen des oberen Aerodigestivtrakts erfolgt gemäß der Vorgaben zur Klassifikation von Tumoren der jeweiligen anatomischen Region [Sobin et al., 2009].

Tab. 2: TNM-Klassifikation der UICC [Sobin et al., 2009]

| T-Status (Primärtumor) | |
|---|---|
| TX | Beurteilung des Primärtumors nicht möglich |
| T0 | Kein Hinweis auf einen Primärtumor |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | ≤ 2 cm, keine Infiltration der umliegenden Gewebe |
| T2 | 2-4 cm, keine Infiltration der umliegenden Gewebe |
| T3 | > 4 cm und/oder Infiltration der umliegenden Gewebe |
| T4a | Infiltration der Haut, Mandibula, Gehörgang, N. facialis |
| T4b | Infiltration der Schädelbasis, Proc. pterygoideus, A. carotis |
| N-Status (regionäre Lymphknoten) | |
| NX | Beurteilung der regionären Lymphknoten nicht möglich |
| N0 | Kein Hinweis auf regionäre Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Metastase(n) ≤ 3 cm in solitärem ipsilateralem Lymphknoten |
| N2a | Metastase(n) 3-6 cm in solitärem ipsilateralem Lymphknoten |
| N2b | Metastase(n) ≤ 6 cm in multiplen ipsilateralen Lymphknoten |

| | | | |
|----------------------------------|---|------------|----|
| N2c | Metastase(n) \leq 6 cm bilateral oder kontralateral | | |
| N3 | Metastase(n) \geq 6 cm | | |
| M-Status (Fernmetastasen) | | | |
| MX | Beurteilung der Fernmetastasen nicht möglich | | |
| M0 | Keine Fernmetastasen vorhanden | | |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden | | |
| Stadieneinteilung | | | |
| 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 |

1.3.2 C-Faktor

Die Genauigkeit und Sicherheit der TNM-Formel für einen Tumor wird maßgeblich von den verwendeten Untersuchungsmethoden beeinflusst. Aufgrund dieser Tatsache wurde der sogenannte C-Faktor ($C = \text{certainty}$) eingeführt, mit Hilfe dessen eine Einschätzung der Präzision der jeweiligen diagnostischen Mittel möglich ist (Tab. 3) [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011].

Tab. 3: C-Faktor für die anatomischen Regionen Lippe, Mundhöhle, Oropharynx, Nasenhaupt- und -nebenhöhlen [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]

| | |
|-----------|---|
| C1 | Standardverfahren, z. B. klinische Untersuchung, konventionelles Röntgen etc. |
| C2 | Spezielle Verfahren, z. B. CT, MRT, Sonografie, Biopsie |

| | |
|-----------|---|
| C3 | Ergebnisse der chirurgischen Exploration, Zytologie, Biopsie |
| C4 | Befund beim definitiven Eingriff (komplette histopathologische Aufbereitung des Resektats, gleichbedeutend mit der pTNM-Klassifikation) |
| C5 | Beurteilung nach Biopsie einschließlich histopathologischer Untersuchung |

1.3.3 Tumorgraduierung

Unter der histologischen Tumorgraduierung (Grading) versteht man die lichtmikroskopische Beurteilung der Aggressivität eines Malignoms mittels Untersuchung des Differenzierungs-, Malignitäts- und Anaplasiegrades. Hoch differenzierte Tumoren enthalten überwiegend Zellen, deren Differenzierungseigenschaften, z. B. Zell- und Wuchsform oder Beschaffenheit des Zellkerns sowie des Zytoplasmas, denen von nicht neoplastisch verändertem Gewebe nahe kommen. Folglich korreliert ein geringerer Differenzierungsgrad mit einer sowohl quantitativen als auch qualitativen Verminderung der aufgeführten Merkmale sowie mit einem sukzessiv „primitiveren“ Organisationsmuster der Zellverbände. Je entdifferenzierter das Tumorgewebe, je häufiger also Atypien wie Hyperchromasie der Zellkerne, Anisokaryose, Kernpolymorphien und Dysplasien auftreten, desto höher sind der Malignitätsgrad und die Wahrscheinlichkeit für invasives Wachstum oder Metastasierung [Müller-Hermelink und Papadopoulos, 2010]. Das Wachstumsmuster und der Differenzierungsgrad des Primärtumors und dazugehöriger Metastasen können durchaus differieren, was in der Beurteilung des Gratings ein Problem darstellen kann. Außerdem muss beachtet werden, dass eine definitive Tumorgraduierung meistens nicht nach Entnahme einer Biopsie, sondern erst nach Untersuchung des kompletten Resektats möglich ist [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Generell ergeben sich folgende Differenzierungsstufen (Tab. 4):

Tab. 4: Histologisches Grading [Wittekind, 2010]

| | Differenzierungsgrad | Malignitätsgrad | |
|-----------|------------------------|-------------------|---------|
| G1 | Gut differenziert | Low-grade | Niedrig |
| G2 | Mäßig differenziert | | Mittel |
| G3 | Schlecht differenziert | High-grade | Hoch |
| G4 | Undifferenziert | | |

Im Hinblick auf die Graduierung von malignen Speicheldrüsenneoplasien werden in der Literatur unterschiedliche Differenzierungssysteme vorgeschlagen, wobei in der Vergangenheit ein zweigeteiltes Schema (*low-* und *high-grade*) zur Anwendung kam, das in aktuellen Studien aufgrund seiner prognostischen Unterlegenheit durch ein – von THERKILDSEN ET AL. publiziertes – dreigeteiltes System (*G1*, *G2*, *G3*) abgelöst wurde [Therkildsen et al., 1998; Schwarz-Furlan, 2011]. Daraus ergibt sich folgendes Vorgehen: Mukoepidermoidkarzinome werden (wie unter 1.2.1 beschrieben) je nach Differenzierungsgrad in ein Dreistufensystem eingeteilt. Adenoid-zystische Karzinome mit einem tubulären oder kribbriformen Wachstumsmuster werden in das G2-Stadium, diejenigen mit einem soliden Wachstumsmuster in das G3-Stadium eingeordnet [Schwarz-Furlan, 2011]. SCHWARZ-FURLAN schlägt ferner vor, onkozytäre Karzinome, Adenokarzinome NOS, Speicheldrangkarzinome und Plattenepithelkarzinome generell als G3-Malignome zu bezeichnen. Carcinomata ex pleomorphen Adenomen sollten im Hinblick auf den Differenzierungsgrad ihrer malignen Komponente eingestuft werden. Entitäten wie Azinuszellkarzinome, polymorphe niedrig-maligne Karzinome oder epithelial-myoepitheliale Karzinome werden – aufgrund fehlender klassischer Malignitätskriterien – dem G1-Stadium zugeordnet [Schwarz-Furlan, 2011]. Die Beurteilung der Azinuszellkarzinome wird jedoch kontrovers diskutiert, da in zahlreichen Studien die für low-grade Tumoren unüblich starke Tendenz zur Lymphknotenmetastasierung belegt wurde [Seethala, 2011].

1.3.4 R-Klassifikation

Mit Hilfe der R-Klassifikation kann festgehalten werden, ob und in welcher Dimension Resttumorgewebe vorhanden ist (Tab. 5). Auch wenn diese historisch bedingt kein Bestandteil der TNM-Klassifikation ist, sieht sie die *Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren* (ADT) als eine unerlässliche und zwingend notwendige Ergänzung zur TNM-Klassifikation an. Um die Chancen auf Heilung oder längeres Überleben eines Tumorkranken zu erhöhen, ist die Abklärung eines eventuellen Residualtumors nach Behandlungsabschluss obligat [Wittekind, 2010]. Die Beurteilung der Situation muss im interdisziplinären Zusammenspiel der klinischen Untersuchung, Darstellung über bildgebende Verfahren und histopathologischen Aufbereitung des Tumorresektats erfolgen, da auch bei lokaler Tumorfreiheit mit radiologisch nachgewiesener Fernmetastasierung eine R2-Situation besteht [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011].

Tab. 5: R-Klassifikation [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]

| | |
|-----------|---|
| R0 | Kein Residualtumor nachweisbar |
| R1 | Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor |
| R2 | Makroskopisch nachweisbarer Residualtumor |

1.4 Therapie

Grundsätzlich unterscheidet man in der Therapie bösartiger Neoplasien kurative und palliative Behandlungsmöglichkeiten. Ein kuratives Vorgehen ist dann sinnvoll und notwendig, wenn eine R0-Resektion aufgrund des Allgemeinbefindens des Patienten sowie der Tumorgröße und -lokalisation möglich erscheint oder der Tumor auf Strahlen- bzw. Chemotherapie anspricht. Falls eine Heilung des Patienten von vornherein ausgeschlossen ist, beispielsweise aufgrund eines sehr ausgedehnten Befundes mit starker (Fern-)Metastasierung, wird der Patient palliativ betreut, um Schmerzen oder Funktionseinschränkungen zu lindern, z. B. mit Hilfe einer primären Chemo- bzw. Strahlentherapie oder einer Tumorverkleinerung („*Salvage-Resektion*“) [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011].

Mittel der ersten Wahl heutiger kurativer Behandlungskonzepte für maligne Speicheldrüsensentumoren ist die Resektion im Gesunden mit entsprechendem Sicherheitsabstand [Ettl et al., 2012b]. Für das adenoid-zystische Karzinom wird dieser beispielsweise mit mindestens 2 cm angegeben [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Das Hauptproblem dabei ist, dass, trotz Verbesserung der Feinnadel-Zytologie und bildgebenden Verfahren, zum Zeitpunkt der operativen Entfernung oftmals noch keine definitive histologische Diagnose vorliegt, diese allerdings in großem Maße die chirurgische Ausdehnung sowie die Notwendigkeit einer Lymphadenektomie oder adjuvanter Therapieformen beeinflusst [Ettl et al., 2012b].

1.4.1 Chirurgie

Der N. facialis, der sich im Inneren der Gl. parotidea in der sagittalen Ebene aufzweigt, separiert diese in einen kleineren medialen (20%) und einen größeren lateralen Anteil (80%) [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011; Wang und Eisele, 2007]. Die Resektion des kompletten seitlichen Drüsenanteils, bei Schonung des Nerven, wird als *laterale Parotidektomie* be-

zeichnet und zur Entfernung niedrig-maligner und kleiner (T1-)Tumoren verwendet [Wang und Eisele, 2007; Ettl et al., 2012b]. Eine vorübergehende Fazialisparese wird in 10-30% der Fälle, eine dauerhafte bei weniger als 1% der Patienten beschrieben. Der dabei zumeist betroffene Nervast ist der Ramus marginalis mandibulae [Wang und Eisele, 2007]. Eine *totale Parotidektomie*, die chirurgische Entfernung des tief und oberflächlich liegenden Drüsenanteils, ist laut MOORE UND OLSEN zur Behandlung von hoch-malignen Tumoren mit starker Metastasierungsgefahr sowie Metastasen in Lymphknoten des lateralen Drüsenanteils, ausgehend von einem Karzinom der Gl. parotidea oder einem anderen Malignom, indiziert. Bei Unversehrtheit des N. facialis kann dieser im Sinne einer *totalen konservativen Parotidektomie* geschont werden [Moore und Olsen, 2007; Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Hinweise auf eine Infiltration des N. facialis geben eine präoperativ bestehende Dysfunktion sowie ein intraoperativ geschwollenes, dunkleres Erscheinungsbild der Nervareale, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumor befinden. Bei Verdacht auf eine Nervbeteiligung muss dieser mitentfernt werden, außerdem kann es bei großen Befunden mit Infiltration der benachbarten Gewebe notwendig sein, z. B. Teile des Os temporalis, der Mandibula, des Gehörgangs, der Haut oder angrenzenden Muskulatur zu reseziieren (*totale radikale Parotidektomie*) [Moore und Olsen, 2007]. Eine häufige postoperative Komplikation nach Eingriffen an der Ohrspeicheldrüse stellt das sogenannte *Frey-Syndrom* (Synonym „gustatorisches Schwitzen“) dar, das von vielen Patienten innerhalb von 6-12 Monaten – oftmals unbemerkt – entwickelt wird [Moore und Olsen, 2007].

Die Entfernung der Gl. submandibularis, die in der Regel über einen submandibulären Zugang und, sofern möglich, unter Schonung des Ramus marginalis mandibulae des N. facialis sowie des N. lingualis erfolgt, wird als *Submandibulektomie* bezeichnet [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Hier lokalisierte niedrig-maligne Tumoren in kleineren Stadien sollten in Kombination mit einer Lymphadenektomie des ersten Levels behandelt werden. Hoch-maligne, im Zuge höherer Tumorstadien auftretende, Malignome erfordern hingegen neben der Exstirpation der Drüse eine Ausräumung der Regionen I bis III. Bei fortgeschrittenen Tumoren muss gegebenenfalls radikaler reseziert und eine noch ausgedehntere Lymphadenektomie (Level I bis V) durchgeführt werden [Dias et al., 2007].

Im Zuge der chirurgischen Therapie von Malignomen der Gl. sublingualis sollte – aufgrund der anatomischen Nähe – neben der Entfernung der Drüse eine Resektion von gesundem Gewebe des Mundbodens oder lateraler Zungenanteile erfolgen. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die Halslymphknotenlevel I-III auszuräumen. Fortgeschrittene Tumoren oder Rezidive können zudem eine Entfernung von Teilen des Unterkiefers, supraomohyoi-

daler Gewebe sowie des N. lingualis oder N. hypoglossus erfordern [Dias et al., 2007].

Die chirurgische Entfernung von Karzinomen der kleinen Speicheldrüsen richtet sich nach den Therapiekonzepten zur operativen Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle [Ettl et al., 2012b].

1.4.2 Lymphadenektomie

Die Entfernung von Lymphknoten aus dem lokalen Abstromgebiet eines Malignoms wird als *Lymphadenektomie* oder *Neck Dissection* bezeichnet [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Das Komitee der *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) führte ein international verwendetes, 2008 letztmals überarbeitetes, System ein, das die Halslymphknotenregionen in sieben Level strukturiert, wobei drei davon nochmals in jeweils zwei Sublevel unterteilt sind (Abb. 6 und Tab. 6) [Robbins et al., 2002; Robbins et al., 2008]:

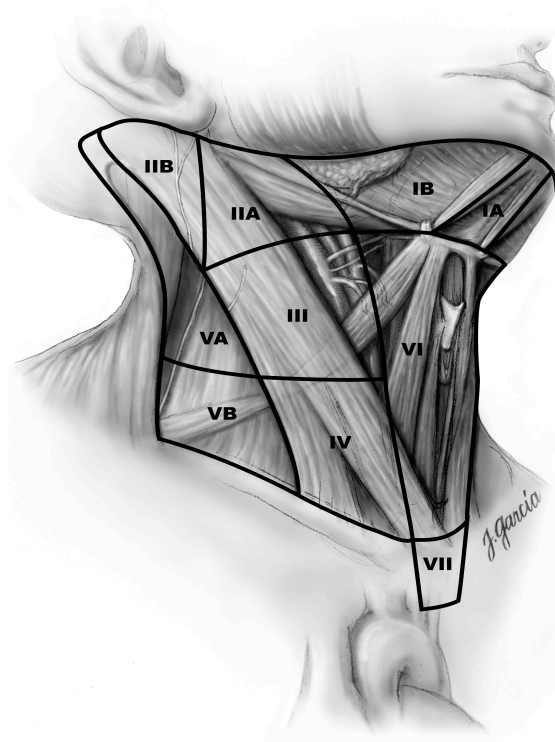


Abb. 6: Halslymphknotenregionen der AAO-HNS [Carty et al., 2009]

Tab. 6: Einteilung der Halslymphknoten [Robbins et al., 2002; Robbins et al., 2008]

| Level | Anatomische Region |
|-------|---|
| I | Submental (A) und submandibulär (B) |
| II | Kraniojugular; Anterior (A) und posterior (B) des N. accessorius |
| III | Mediojugular |
| IV | Kaudojugular |
| V | Posteriore Halsdreieck; Oberhalb (A) und unterhalb (B) des Ringknorpels |
| VI | Anteriore Halsregion |
| VII | Kraniomediastinal (bis zum Truncus Brachiocephalicus) |

Indikationen für eine Neck Dissection im Zuge der Behandlung eines Speicheldrüsenmalignoms bestehen generell bei folgenden klinisch-pathologischen Zuständen:

1. Klinisch tumorpositive Lymphknoten
2. Hoch-maligne und große (T3 oder T4) Tumoren
3. Laryngealer oder pharyngealer Tumorursprung
4. Lymphatische Invasion (L1) im Hauptpräparat [Ettl et al., 2012b]

Generell unterscheidet man eine *therapeutische Lymphadenektomie* – bei z. B. präoperativ durch eine Feinnadelbiopsie oder intraoperativ durch eine Schnellschnittuntersuchung nachgewiesenen Metastasen – von einer *elektiven* bzw. *prophylaktischen Neck Dissection*. Diese kommt zum Einsatz, wenn trotz einer präoperativ nicht verdächtigen N0-Situation des Halses eine Ausräumung durchgeführt wird, um das Risiko einer Metastasierung der entsprechenden Lymphbahnen auszuschalten oder noch nicht nachgewiesene Mikrometastasen zu entfernen [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011].

Je nach Umfang werden folgende Modifikationen unterschieden: Bei einer *radikalen Neck Dissection* werden alle ipsilateralen Lymphknoten aus Level I bis V [Robbins et al., 2002], die durch den M. sternocleidomastoideus und M. trapezius, die tiefe Halsfaszie, den M. digastricus, die Gl. thyroidea und die Klavikula sowie nach lateral durch die Subkutis und das Platysma begrenzt sind, entfernt. Zusätzlich erfolgt eine Resektion aller angrenzenden Weichgewebe ohne lebenswichtige Funktionen (M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna, Binde- und Fettgewebe der Halsgefäßscheide, M. omohyoideus, N. accessorius und Ansa cervicalis) [Schwenzer und Ehrenfeld, 2011]. Bei Erhaltung von mindestens einer der nicht-lymphatischen Strukturen spricht man von einer *modifiziert-radikalen Neck*

Dissection [Robbins et al., 2002]. Eine modifiziert-radikale Lymphadenektomie ist indiziert bei Parotismalignomen mit klinisch oder radiologisch nachweisbarer Metastasierung der Halslymphknoten, high-grade-Tumoren oder einer fortgeschrittenen Größe des Primärtumors [Ettl et al., 2012b].

Die Ausräumung unter Schonung von mindestens einem der fünf Lymphknotenlevel, je nach Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, und Belassen des M. sternocleidomastoideus, der V. jugularis interna und des N. accessorius wird als *selektive Neck Dissection* bezeichnet [Robbins et al., 2002] und geht (im Vergleich zur radikalen Neck Dissection) mit einem kleineren Risiko der Gefäß- oder Nervverletzung, einer geringeren Morbidität und höheren Lebensqualität für den Patienten einher [Dhiwakar et al., 2011]. Für die Therapie von Malignomen der Gl. submandibularis sowie der kleinen Speicheldrüsen der Mundhöhle wird eine *selektive (supraomohyoidale) Lymphadenektomie* der Level I bis III, für Neoplasien der kleinen Speicheldrüsen des Pharynx oder Larynx die Ausräumung der Level II bis V vorgeschlagen [Ettl et al., 2012b].

Bei einem metastatischen Befall der parapharyngealen, oberen mediastinalen, perifazialen oder paratrachealen Lymphknoten oder der Infiltration z. B. der A. carotis, des N. hypoglossus, N. vagus oder der paraspinalen Muskulatur kann eine sogenannte *extendierte Neck Dissection* – die zusätzliche Lymphadenektomie der Level VI oder VII und eine entsprechende Weichgewebeentfernung – indiziert sein [Robbins et al., 2002].

GENDRON UND FERRIS berichten, dass von Tumoren der Gl. parotis ausgehende Metastasen zu 53% in intra- oder periparotiden Lymphknoten, 10% in Level I, 27% in Level II, 23% in Level III, 20% in Level IV und 3% in Level V vorkommen. Tumoren der Gl. submandibularis drainieren in 59% der Fälle in Level I, zu 53% in Level II, 47% in Level III, 18% in Level IV und 6% in Level V. Tumoren der Gl. sublingualis sind selten (1%) und von Neoplasien der kleinen Speicheldrüsen oftmals schwer zu unterscheiden, weshalb für diese allein wenig Daten vorliegen. Malignome der kleinen Speicheldrüsen metastasieren in 9-16% der Fälle, für Patienten mit Tumoren der Stadien III oder IV wurde diese Rate allerdings bereits mit 65% beschrieben [Gendron und Ferris, 2007].

1.4.3 Strahlentherapie

Eine adjuvante postoperative Bestrahlung wird grundsätzlich in folgenden Situationen empfohlen:

1. Undifferenzierte oder high-grade Malignome
2. Perineurale Invasion
3. Fortgeschrittene Tumorstadien mit Beteiligung des N. facialis oder des medialen Parotisanteils
4. Unklare bzw. positive Resektionsränder
5. Positiver N-Status
6. Adenoid-zystische Karzinome [Ettl et al., 2012b]

Zahlreiche Arbeiten belegen den günstigen prognostischen Einfluss einer adjuvanten Bestrahlung: Eine retrospektive Studie mit Daten von 1990 bis 2006 zeigt beispielsweise, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, die sowohl chirurgisch als auch strahlentherapeutisch behandelt wurden, eine verbesserte lokoregionale Kontrolle erreicht werden konnte. In einer Untersuchung der *Dutch Head and Neck Oncology Cooperative Group* von Patienten mit T3- oder T4-Neoplasien lag die lokale Tumorfreiheit im 10 Jahres-Follow-up nach postoperativer Radiatio bei 84%, nach alleiniger chirurgischer Behandlung bei nur 18% [Feinstein et al., 2011]. Vielversprechende Ergebnisse erhielt man zudem aus Untersuchungen, im Verlauf derer Patienten mit Kombinationstherapien, bestehend aus einer adjuvanten Bestrahlung und Chemotherapeutika wie Carboplatin, Paclitaxel, Hydroxyurea oder Fluoruracil, behandelt wurden [Ettl et al., 2012b]. Kleinere Studien nennen 5-Jahres-Überlebensraten von 60-72% bei einer adjuvanten Radiochemotherapie [Pederson et al., 2011].

Inoperable Tumoren oder ausgedehnte Karzinome bei multimorbiden Patienten können auch primär kurativ bestrahlt werden. Allerdings liegt die generelle Heilungsrate hier bei lediglich 25% [Ettl et al., 2012b].

1.4.4 Chemoprävention und Antikörpertherapie

Die chemotherapeutische Behandlung von Speicheldrüsenkarzinomen kommt heute üblicherweise im Rahmen der palliativen Therapie bei vorliegender Metastasierung oder lokoregionalen Rezidiven, die nicht mehr operabel sind oder auf Bestrahlung ansprechen, zum Einsatz [Ettl et al., 2012b].

Aufgrund der Seltenheit maligner Speicheldrüsenneoplasien finden sich relativ wenige Studien über den therapeutischen Einsatz und Erfolg der Chemotherapie beziehungsweise ihrer Rolle vor oder nach einem operativen Eingriff und/oder einer Radiatio. LAURIE UND ARGIRIS bemängeln darüber hinaus, dass viele Publikationen, aufgrund oftmals schlecht definierter objektiver Kriterien zur Beurteilung eines Ansprechens auf eine Chemotherapie, fraglicher methodologischer Qualität, der zumeist kleinen Anzahl an Patientenfällen und deren histologischer Heterogenität, schwer miteinander vergleichbar und nur unzureichend interpretierbar seien. Die meisten Daten, in Relation zu den wenigen repräsentativen Studien, liegen für das adenoid-zystische, das Mukoepidermoid- und das Adenokarzinom vor. In klinischen Versuchen wurden z. B. Mitoxantron, Vinorelbin, Epirubicin, Paclitaxel oder Cisplatin untersucht [Laurie und Argiris, 2007].

Die Antikörpertherapie nimmt seit einigen Jahren einen sukzessiv größeren Stellenwert in der Forschung ein. Untersucht wurden biologische Wirkstoffe gegen C-KIT (Imatinib), HER2 (Trastuzumab), EGFR (Cetuximab, Gefitinib) und EGFR/HER2 (Lapatinib). Allerdings wird lediglich in Einzelfällen über das Ansprechen von Mukoepidermoid- oder Speicheldrüsenkarzinomen auf Trastuzumab oder Lapatinib berichtet [Ettl et al., 2012b; Laurie und Argiris, 2007]. JASPERS ET AL. behandelten 10 Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen im Sinne einer Androgen-Deprivationstherapie, wobei in fünf Fällen positive Ergebnisse wie die Stabilisierung des Krankheitsverlaufs oder eine Schmerzreduktion zu verzeichnen waren [Jaspers et al., 2011].

1.5 Genetik

1.5.1 Aktuelle Forschung

Um pathogenetische Mechanismen von malignen Speicheldrüsenkarzinomen und ihre Ätiopathogenese besser erfassen zu können, ist es wichtig, diagnostische und prognosti-

sche Marker zu identifizieren und zu untersuchen [Falbo et al., 2011]. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigen sich mit genetischen Aberrationen. Einige wenige seien hier genannt:

Der prognostische Einfluss von Mutationen am Tumorsuppressorgen p53 wird in der aktuellen Forschung kontrovers diskutiert. JAEHNE ET AL. stellen Zusammenhänge zwischen der p53-Expression bei Speicheldrüsenkarzinomen und der Neigung zur Rezidivbildung oder Fernmetastasierung sowie einer verringerten Überlebensprognose fest [Jaehne et al., 2005]. Im Kontrast dazu können LUUKKAA ET AL. für p53 keine signifikanten Assoziationen hinsichtlich des Gesamtüberlebens aufzeigen, nennen aber den Proliferationsmarker Ki-67 als wichtigen prognostischen Faktor [Luukkaa et al., 2006].

Für Adeno-, Mukoepidermoid- und Speicheldrüsenkarzinome wurden erhöhte Expressions- und Amplifikationsraten der Rezeptortyrosinkinasen EGFR und HER2 nachgewiesen. Eine Überexprimierung von C-erbB-2/HER2/neu, einem Wachstumsfaktorrezeptor, der beim invasiven dukalen Adenokarzinom der Brust zur Einführung der revolutionären Antikörpertherapie mittels Trastuzumab (Herceptin®) geführt hat, konnte gehäuft auch beim dukalen Adenokarzinom der Speicheldrüsen (Speicheldrüsenkarzinom) festgestellt werden [Eveson et al., 2005; Williams et al., 2010; Ettl et al., 2012c].

In immunhistochemischen Analysen von adenoid-zystischen Karzinomen, insbesondere vom soliden Typ, wurde eine Überexprimierung des, für den Transkriptionsfaktor EN1 codierenden, EN1-Gens (Engrailed homeobox 1) belegt. Dieser Genstatus korreliert mit einer geringeren Überlebensrate und einem höheren Risiko für Lymphknotenmetastasen [Bell et al., 2012].

Während sich ein Großteil der bisherigen Forschung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 beschäftigte, untersuchten STAIBANO ET AL., inwiefern es bei Speicheldrüsenneoplasien zu einer veränderten Expression des CAF-1/p60 (Chromatin Assembly Factor-1) kommt und welches klinische Tumorverhalten damit in Verbindung gebracht werden kann. Eine erhöhte CAF-1/p60-Expression wurde sowohl in benignen als auch in malignen Tumoren nachgewiesen, wobei eine starke Überexprimierung mit aggressiven Malignomen assoziiert zu sein scheint [Staibano et al., 2011].

Da sich diese Arbeit im Speziellen mit dem Tumorsuppressorgen PTEN und dem Met-Protoonkogen beschäftigt, sollen diese im Folgenden genauer betrachtet und erläutert werden.

1.5.2 PTEN

1997 konnte PTEN erstmals auf Chromosom 10 in der Region 10q23 nachgewiesen werden. Es codiert für die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), deren Hauptangriffspunkte die Plasmamembranlipide Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP_3) und Phosphatidylinositol-3,4-Biphosphat darstellen. Diese Lipide werden im Verlauf zellulärer Signaltransduktionswege durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) mittels Phosphorylierung hergestellt. PIP_3 aktiviert weitere Kinasen, die wiederum bestimmte Substrate durch Phosphorylierung herstellen, welche z. B. Apoptose, Proliferation oder Zellgröße regulieren. Die Proteinphosphatase PTEN wirkt somit als Gegenspieler der Proteinkinase PI3K (Abb. 7). Ein PTEN-Genverlust geht infolgedessen mit einer Dysregulation der PI3K-Aktivität, einem PIP_3 -Anstieg und einer Veränderung des physiologischen Zellhaushalts einher [Sansal und Sellers, 2004].

In retrospektiven Untersuchungen konnten bereits Mutationen von PTEN z. B. bei Speicheldrüsentumoren, Melanomen oder Prostatakarzinomen nachgewiesen werden [Falbo et al., 2011; Conde-Perez und Larue, 2012; Yoshimoto et al., 2007]. Ferner gelang – mit Hilfe von Knockout-Mäusen – der Nachweis negativer Auswirkungen eines PTEN-Genverlusts auf verschiedene Gewebe [Ma et al., 2005].

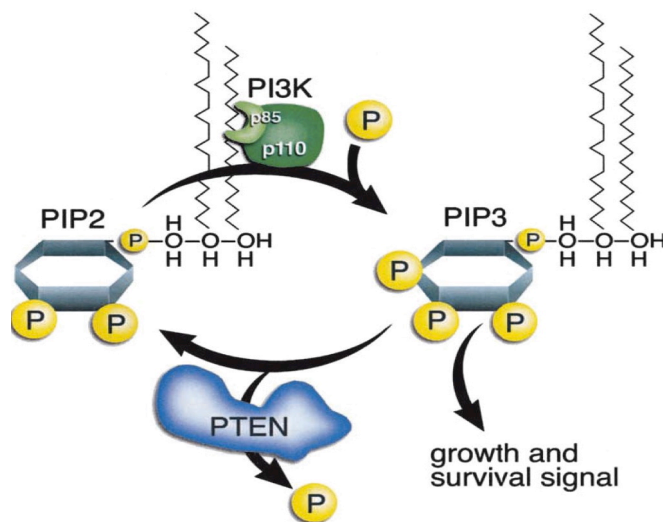


Abb. 7: PTEN als Antagonist der PI3K [Sansal und Sellers, 2004]

1.5.3 c-Met

Das Produkt des Met-Protoonkogens (Mesenchymal Epithelial Transition Factor), die Met-Tyrosinkinase (c-Met), dient als Rezeptor für HGF (Hepatocyte Growth Factor). Das HGF-Molekül besteht aus einer, über eine Disulfidbrücke verbundenen, 69 kDa schweren Alphakette und einer 34 kDa schweren Betakette. C-Met setzt sich aus einer glykosylierten 50 kDa schweren Alphakette und einer transmembranen 145 kDa schweren Betakette zusammen, die ebenso über eine Disulfidbrücke verknüpft sind (Abb. 8). Nach Bindung von HGF an den extrazellulären Anteil von c-Met kommt es zur Autophosphorylierung von intrazellulär liegenden Tyrosinresten, dem Anbinden diverser Proteine, z. B. Src (Src Homology 2), Gab1 oder Grb2, und der Aktivierung verschiedener Wirkmechanismen, wie des Ras/MEK- oder PI3K/Akt-Signalwegs. Die Aktivierung von c-Met hat unter anderem Einfluss auf Zellmigration, -differenzierung und -proliferation und äußert sich letztlich – durch die Hemmung der Apoptose – in einer Wachstumsförderung der Zellen [You und McDonald, 2008; Leo et al., 2011]. Eine c-Met-Überexprimierung konnte bereits z. B. bei hochmalignen Magenkarzinomen nachgewiesen werden. Darüber hinaus werden erhöhte HGF/c-Met-Interaktionen bei adenoid-zystischen Karzinomen mit einer gesteigerten Invasion und Aggressivität in Verbindung gebracht [Suzuki et al., 2003].

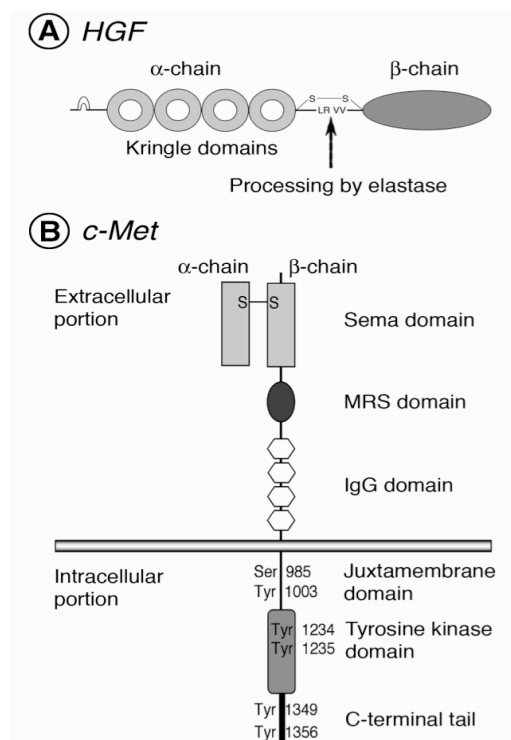


Abb. 8: Aufbau von HGF c-Met [You und McDonald, 2008]

2 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Punkte bearbeitet werden:

1. Retrospektive Analyse der klinischen Daten von Tumorpatienten, die zwischen 1984 und 2008 in den Universitätskliniken in Regensburg und Erlangen-Nürnberg sowie der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Nürnberger Klinikums wegen eines Speicheldrüsenkarzinoms behandelt wurden.
2. Untersuchung der genetischen Expressionsmuster von PTEN und c-Met mit Hilfe der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH).

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Treten Aberrationen der genannten Gene bei Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen auf?
2. Welche Assoziationen bestehen zwischen genetischer Expression und klinischen Parametern, dem histologischen Subtyp sowie dem Malignitätsgrad der Tumoren?
3. Welche Bedeutung besitzen Aberrationen von PTEN und c-MET für die Prognose von Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen?

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten

Retrospektiv wurden Daten eines 324 Patienten umfassenden Gesamtkollektivs untersucht. Im Rahmen der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung kamen 232 Gewebeschnitte für PTEN und 233 für c-Met zur Auswertung. Die Diagnosestellung erfolgte zwischen 1984 und 2008 durch die pathologischen Institute des Klinikums Nürnberg sowie der Universitätskliniken in Regensburg und Erlangen-Nürnberg. Die chirurgische Tumorthherapie wurde in den Kliniken für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der entsprechenden Kliniken durchgeführt. Sowohl klinische als auch Follow-up-Daten entstammen – gemäß der ethischen Forschungsrichtlinien – den Tumorzentren der medizinischen Fakultäten in Regensburg und Erlangen-Nürnberg.

Für sämtliche Patienten wurde das Tumorstadium gemäß der TNM-Klassifikation der UICC aus dem Jahr 2002 dokumentiert [Sobin und Wittekind, 2002]. Dabei war nach der chirurgischen Therapie das pathologische (p)TNM-Stadium entscheidend. Bei einer fehlenden histopathologischen Untersuchung erfolgte die Einteilung nach dem klinischen (c)TNM-Stadium. Des Weiteren wurden Fernmetastasen nach Tumorresektion sowie inoperable Primärtumoren als R2-Status (makroskopischer Residualtumor) gewertet.

3.2 Datenerhebung

3.2.1 Histopathologie und Klassifizierung

Von allen formalinfixierten Tumoren waren bereits im Vorfeld neue mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte angefertigt und von zwei Fachärzten für Pathologie – ohne Kenntnis der Ausgangsdiagnose – gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation [Barnes et al., 2005] für Speicheldrüsentumoren reklassifiziert worden.

Zur Beurteilung des Malignitätsgrades kam ein dreigeteiltes System zur Anwendung [Therkildsen et al., 1998]. Generell wurden Azinuszellkarzinome, Basalzelladenokarzinome, epitheliale-myoepitheliale Karzinome, Zystadenokarzinome und polymorphe niedrig-maligne Karzinome in die Kategorie *low-grade* (G1) eingeteilt. Eine Ausnahme stellten entdifferenzierte Karzinomvarianten (G3) dar. Speichelgang-, Plattenepithel-, onkozytäre,

undifferenzierte und großzellige Karzinome sowie primäre maligne Mischtumoren wurden fortwährend als *high-grade*-Tumoren (G3) eingestuft. Die Beurteilung bei Mukoepidermoidkarzinomen basierte auf den Richtlinien der aktuellen WHO-Klassifikation [Barnes et al., 2005]. Adenoid-zystische Karzinome mit überwiegend tubulo-kribriformem Wachstumsmuster wurden als G2-Tumoren, diejenigen vom soliden Typ als G3-Malignome kategorisiert. Zur Einschätzung des Malignitätsgrads der Adenokarzinome NOS sowie der myoepithelialen Karzinome wurde das Gewebe – wie bereits von ELSTON UND ELLIS für die Graduierung von Brustkrebs publiziert [Elston und Ellis, 1991] – auf Zellkernpleomorphismen und mitotische Aktivität untersucht. Die Graduierung der Karzinome aus pleomorphen Adenomen erfolgte entsprechend der malignen Komponente des Tumors [Ettl et al., 2012a].

Anschließend wurde ein für das jeweilige Karzinom repräsentatives Areal ausgewählt und das Gewebe für die Herstellung der Tissue Microarrays in Paraffin eingebettet.

3.2.2 Tissue Microarray

Die Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs) erfolgte durch Ausstanzung (zwei Millimeter Durchmesser) der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebestücke. Anschließend wurden die bis zu 60 Gewebestücken fassenden TMAs mit DNA-Sonden für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung behandelt. Zudem wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte TMAs für die Referenzhistologie angefertigt.

3.2.3 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung: Färbeprotokoll

Bei dem im Folgenden beschriebenen Färbeverfahren für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung handelt es sich um das übliche Vorgehen des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Regensburg.

Erster Tag

1. Entparaffinieren und Rehydrieren

Zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurden die SuperFrost® Plus-Objektträger für 35 Minuten bei 72° C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine Behandlung der Prä-

parate mit Xylol (zweimal für 10 Minuten) und absteigender Ethanolreihe (100%, 80%, 70%) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate für jeweils zwei Minuten mit Millipore-Wasser gewaschen.

2. Vorbehandlung (Antigendemaskierung)

Nach Einlegen der Objektträger in den vortemperierten Natriumcitratpuffer und Inkubation für 40 Minuten bei 95° C im Wasserbad wurden die Präparate mit Pepsinlösung für vier Minuten bei 37° C proteolytisch behandelt.

3. Waschen

Zum Stoppen des Verdaus wurden die Präparate bei Raumtemperatur kurz mit zweifachem Sodiumcitratpuffer (2x SSC) und Millipore-Wasser gewaschen und daraufhin durch die aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 100%) dehydriert und getrocknet.

4. Gewebe-Denaturierung

Im abgedunkelten Raum wurden die DNA-Sonden auf die Gewebeschnitte aufgetragen, die Deckgläser aufgebracht und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten bei 73° C erhitzt.

5. Hybridisierung

Schließlich wurden die Präparate in eine feuchte Kammer gelegt und bei 37° C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zweiter Tag

Nach Entfernung der Deckgläser wurden die Schnitte für jeweils zehn Minuten bei 50° C mit 4x SSC, 2x SSC und 1x SSC und abschließend bei Raumtemperatur für eine Minute mit Millipore-Wasser gewaschen. Die getrockneten Präparate wurden mit einem wasserlöslichen Eindeckmedium und Deckgläsern versehen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C.

3.2.4 Verwendete Materialien und Reagenzien

Tab. 7: Materialien und Hersteller

| Material | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| Brutschrank B6060 | Heraeus Sepatech, Osterode |
| Deckgläser 24 x 50 mm | Engelbrecht GmbH, Edermünde |
| Entellan | Merck, Darmstadt |
| Fixogum | Marabu, Tamm |
| Floureszenz-Mikroskop: AxioImager Z1 | Zeiss, Oberkochen |
| Gefrierschrank | Liebherr, Kirchdorf a.d. Iller |
| Glasküvetten | Dako Diagnostika, Hamburg |
| Handstanze | Zytomed, Berlin |
| Heizplatte | Ika Labortechnik, Staufen i. Br. |
| Filterset Sp. Green | AHF, Tübingen |
| HQ-Filterset TRITC/TAMARA | AHF, Tübingen |
| Dapi-Einfachbandpassfilter | AHF, Tübingen |
| Metallständer | Wagner & Munz, München |
| Millipore Wasser: Filteranlage Milli-Q UF Plus | Millipore, Billerica/USA |
| Objektträger: SuperFrost® Plus | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Schlittenmikrotom | Mikrom, Heidelberg |
| Vectashield mounting medium with Dapi | Vector Laboratories, Burlingame/USA |
| Wasserbad Lo-boy | Lab-Line Instruments, Illinois/USA |
| ZytoLight SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe | Zytovision, Bremerhaven |
| ZytoLight SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe | Zytovision, Bremerhaven |

Tab. 8: Reagenzien und Inhaltsstoffe

| Reagenz | Inhaltsstoffe |
|---|--|
| 0,01 N Natriumcitratlösung, pH = 6 | 0,98 g Trinatriumcitratdihydrat Millipore Wasser ad 1000 ml |
| 20x Sodiumcitratpuffer (SSC), pH = 7,35 | 175,32 g Natriumchlorid 88,24 g Trinatriumcitratdihydrat Millipore Wasser ad 1000 ml |
| 4x SSC + 0,3% Igepal, pH = 7 - 7,5 | 200 ml 20x SSC 3 ml Igepal CA-630 800 ml Millipore Wasser |
| 2x SSC, pH = 7 - 7,5 | 100 ml 20x SSC 900 ml Millipore Wasser |
| 1x SSC, pH = 7 - 7,5 | 50 ml 20x SSC 950 ml Millipore Wasser |

Tab. 9: Reagenzien und Hersteller

| Reagenz | Hersteller |
|--------------------------|--------------------------|
| Ethanol | Riedel-de Haën, Seelze |
| Igepal CA-630 | Sigma-Aldrich, Louis/USA |
| Natriumchlorid | VWR, West Chester/USA |
| Pepsinlösung | Zytovision, Bremerhaven |
| Trinatriumcitratdihydrat | Merck, Darmstadt |
| Xylol | J. T. Baker, Griesheim |

3.2.5 FISH-Sonden

Zur Untersuchung von PTEN und c-Met wurden die ZytoLight® Sonden SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe (PL37) und SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe (PL46) der Firma ZytoVision® verwendet.

Sie enthalten grün markierte Polynukleotide (ZyGreen; Absorption bei 503 nm und Emission bei 528 nm, ähnlich FITC) zum Anfärben der jeweiligen Gensignale und orange markierte Polynukleotide (ZyOrange; Absorption bei 547 nm und Emission bei 572 nm, ähnlich Rhodamin) zum Sichtbarmachen der Alpha-Satelliten-Sequenzen des Zentromers von Chromosom 10 (PTEN)^{*} und 7 (c-Met)^{**}.

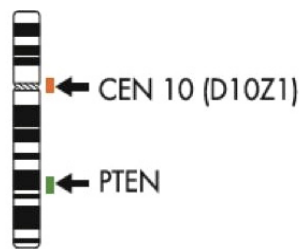


Abb. 9: Oranges Fluorochrom bindet an die Alpha-Satelliten-Sequenz von Zentromer 10 (D10Z1), grünes Fluorochrom an PTEN (Genlokus 10q23.3)^{*}**

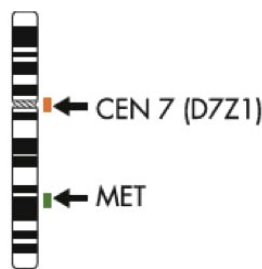


Abb. 10: Oranges Fluorochrom bindet an die Alpha-Satelliten-Sequenz von Zentromer 10 (D7Z1), grünes Fluorochrom an c-Met (Genlokus 7q31)^{**}**

^{*} Quelle: http://www.zytovision.com/zytolightmanuals/ZytoLight_Manuals_Deutsch/Z-2078-CE-IVD-Deu.pdf, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

^{**} Quelle: http://www.zytovision.com/zytolightmanuals/ZytoLight_Manuals_Deutsch/Z-2087-CE-IVD-Deu.pdf, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

^{***} Bildquelle: <http://www.zytovision.com/productinfo/ZytoLight/fe018.pdf>, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

^{****} Bildquelle: <http://www.zytovision.com/productinfo/ZytoLight/fe024.pdf>, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

3.2.6 FISH-Analyse

Zur Auswertung der Gewebeschnitte diente ein Fluoreszenzmikroskop, wobei drei Filter der Firma AHF verwendet wurden:

| | |
|-------------------------------|---|
| 1. Dapi-Einfachbandpassfilter | Übersicht und Beurteilung der Zellkerne |
| 2. Filterset Sp. Green | Auszählen der grünen Signale |
| 3. HQ-Filterset TRITC/TAMARA | Auszählen der orangen Signale |

Insgesamt wurden 50 Zellkerne pro Gewebeschnitt ausgewertet. Zur Orientierung im Präparat und zum Auffinden des Tumorbereichs wurde der Dapi-Filter mit 100- bis 200-facher Vergrößerung verwendet, anschließend Immersionsöl aufgetragen und auf 630-fache Vergrößerung gewechselt. Die Beurteilung der Zellkerne fand ebenso im Dapi-Filter statt: Ausgewertet wurden nur nicht überlappende Zellkerne mit gut erkennbaren Grenzen. Mit Hilfe der anderen beiden Filter konnten die Signale ausgezählt werden, wobei nur eindeutige, akzentuierte Leuchtsignale gewertet und zwei Signale, deren Abstand weniger als einen Signaldurchmesser betrug (sogenannte Split-Signale), als ein Signal gezählt wurden. Da nicht alle Signale in einer Ebene lagen, mussten die Zellkerne mittels des Feintriebs durchfokussiert werden. Zur Dokumentation wurden Auswertungsbögen des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Regensburg verwendet.

3.2.7 Auswertungskriterien für PTEN

Das Vorliegen von jeweils zwei Gen- und Zentromersignalen wurde als *Disomie* interpretiert. Fehlten bei über 20% der Kerne beide Gensignale bei gleichzeitigem Auftreten mindestens zweier Kontrollsignale, so bestand eine *homozygote Deletion*. Der Verlust eines Gensignals bei Vorhandensein mindestens zweier Zentromersignale oder das Vorliegen von zwei PTEN-Lokussignalen bei mindestens vier Zentromersignalen in mehr als 30% der Fälle wurde als *hemizygot* oder *relative Deletion* gewertet (Abb. 11) [Sircar et al., 2009].

Für die weitere Analyse wurden hemi- und homozygote Deletionen als *gesamte Deletionen* zusammengefasst.

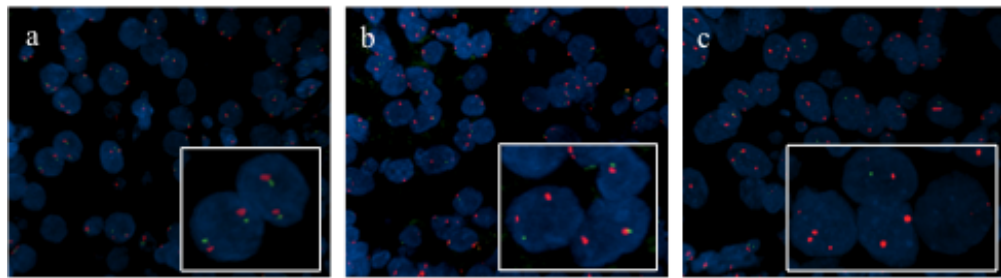


Abb. 11: PTEN-Genstatus

a) Disomien, b) hemizygote Deletionen, c) homozygote Deletionen

[Ettl et al., 2012a]

3.2.8 Auswertungskriterien für c-Met

Basierend auf den von CAPPUZZO ET AL. publizierten Richtlinien wurde die Einteilung in die Kategorie *Disomie* vorgenommen, wenn bei $\geq 50\%$ der Zellkerne zwei Gen- und zwei Zentromersignale sichtbar waren. Eine *Amplifikation* lag bei einem Verhältnis der Gen- zu Zentromersignale ≥ 2 , bei Vorliegen von ≥ 10 Gensignalen bzw. bei Clustersignalen vor [Ach et al., 2012; Cappuzzo et al., 2009]. Das Auftreten von ≥ 4 Gen-/ ≥ 4 Zentromersignalen in $\geq 40\%$ der Fälle wurde als *hohe Polysomie*, die Präsenz von 3 Gen-/3 Zentromersignalen in $\geq 40\%$ der Fälle als *niedrige Polysomie* definiert (Abb. 12). Ein Gen- zu Zentromer-Verhältnis von $< 0,5$ in mehr als 30% der Fälle wurde als *Deletion* gewertet [Ach et al., 2012; Varella-Garcia, 2006; Lujan et al., 2010].

Für die weitere Auswertung wurden niedrige und hohe Polysomien sowie Amplifikationen als *erhöhte Genanzahl* gewertet. Zudem wurden niedrige und hohe Polysomien, Amplifikationen sowie Deletionen als *c-Met-Aberrationen* zusammengefasst [Ach et al., 2012].

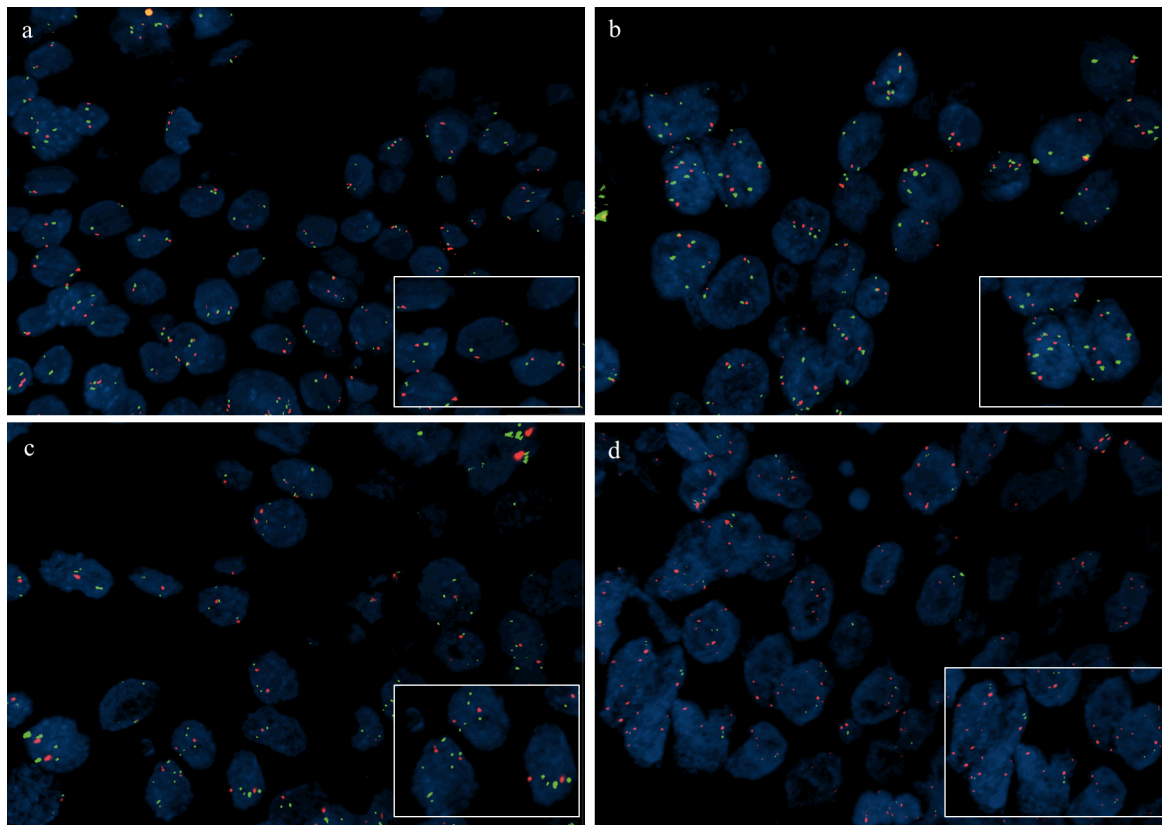


Abb. 12: c-Met-Genstatus

a) Disomien, b) Hohe Polysomie, c) Amplifikation, d) Deletion

[Ach et al., 2012]

3.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS in der Version 19.0 für Mac OS verwendet (IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Zum Nachweis von Zusammenhängen zwischen verschiedenen Parametern kam das Chi-Quadrat-Testverfahren zum Einsatz (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$). Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rang-Teststatistik konnte die univariate Überlebensanalyse durchgeführt werden (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$), wobei das tumorspezifische Überleben (TSÜ) durch den Zeitraum zwischen dem Tag der Diagnose und dem Datum des tumorbedingten Todes definiert wurde. Das Ereignis des Ausscheidens aus der Beobachtung wurde als *zensiert* markiert. Die multivariate Überlebensanalyse erfolgte mittels der Cox-Regression im Einschlussverfahren (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Analyse: Klinisch-pathologische Parameter

Im Gesamtkollektiv (n = 324) trat das adenoid-zystische Karzinom mit 17% (n = 55) am häufigsten auf. Diesem folgten das Mukoepidermoidkarzinom (n = 51) und das Azinuszellkarzinom (n = 44).

Tabelle 10 liefert eine Übersicht über die 15 diagnostizierten Entitäten. Ab der Tumorphistologie des onkozytären Karzinoms wurden alle Entitäten aufgrund ihres seltenen Auftretens als „Andere“ zusammengefasst. Tabelle 11 schafft einen Überblick über die acht, im vorliegenden Kollektiv, häufigsten Tumortypen und die jeweiligen klinischen Parameter.

Tab. 10: Verteilung der Tumorentitäten im Patientenkollektiv

| Entität | Abkürzung (engl.) | Häufigkeit | Prozent |
|---------------------------------------|----------------------|------------|---------|
| Adenoid-zystisches Karzinom | ADZK | 55 | 17 |
| Mukoepidermoidkarzinom | MEK | 51 | 15,7 |
| Azinuszellkarzinom | AZZK | 44 | 13,6 |
| Adenokarzinom NOS | AKNOS | 37 | 11,4 |
| Speichelgangkarzinom | SGK | 35 | 10,8 |
| Plattenepithelkarzinom | PEK | 31 | 9,6 |
| Myoepitheliales Karzinom | MYEK | 21 | 6,5 |
| Polymorphes niedrig-malignes Karzinom | PNMK | 13 | 4 |
| Onkozytäres Karzinom | OZK | 10 | 3,1 |
| Basalzelladenokarzinom | BZAK | 9 | 2,8 |
| Epitheliales myoepitheliales Karzinom | EMYEK | 5 | 1,5 |
| Primärer maligner Mischtumor | PMMT | 5 | 1,5 |
| Undifferenziertes Karzinom | UK | 4 | 1,2 |
| Zystadenokarzinom | ZAK | 2 | 0,6 |

| | | | |
|-----------------------|-----|-----|-------|
| Großzelliges Karzinom | GZK | 2 | 0,6 |
| Gesamt | | 324 | 100,0 |

Tab. 11: Die häufigsten Entitäten und Assoziationen mit klinischen Parametern

| | ADZK | MEK | AZZK | AKNOS | SGK | PEK | MYEK | PNMK | Andere | Gesamt |
|---------------------------|------|-----|------|-------|-----|-----|------|------|--------|--------|
| Gesamt | 55 | 51 | 44 | 37 | 35 | 31 | 21 | 13 | 37 | 324 |
| Geschlecht* | | | | | | | | | | |
| männlich | 17 | 19 | 14 | 24 | 19 | 25 | 9 | 9 | 17 | 153 |
| weiblich | 38 | 32 | 30 | 13 | 16 | 6 | 12 | 4 | 20 | 171 |
| Alter* | | | | | | | | | | |
| ≤ 70 | 36 | 37 | 35 | 25 | 16 | 7 | 15 | 10 | 21 | 202 |
| > 70 | 19 | 14 | 9 | 12 | 19 | 24 | 6 | 3 | 16 | 122 |
| Lokalisation* | | | | | | | | | | |
| Gl. parotidea | 22 | 31 | 39 | 28 | 29 | 30 | 14 | 5 | 31 | 229 |
| Gl. submandibularis | 15 | 4 | 3 | 6 | 5 | 1 | 6 | 0 | 6 | 46 |
| Gl. sublingualis | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Kleine Speicheldrüsen | 17 | 15 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 8 | 0 | 47 |
| T-Status (n = 319) | | | | | | | | | | |
| T1 | 13 | 17 | 19 | 10 | 7 | 3 | 2 | 4 | 7 | 82 |
| T2 | 17 | 21 | 14 | 11 | 10 | 10 | 6 | 4 | 13 | 106 |
| T3 | 14 | 8 | 8 | 9 | 5 | 10 | 9 | 2 | 11 | 76 |
| T4 | 8 | 5 | 3 | 6 | 13 | 7 | 4 | 3 | 6 | 55 |

| | | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| N-Status (n = 316)* | | | | | | | | | | |
| N0 | 41 | 38 | 40 | 20 | 10 | 17 | 15 | 9 | 27 | 217 |
| N1 | 4 | 7 | 3 | 2 | 6 | 7 | 1 | 4 | 3 | 37 |
| N2 | 5 | 5 | - | 14 | 19 | 6 | 5 | 0 | 6 | 60 |
| N3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| M-Status (n = 321) | | | | | | | | | | |
| M0 | 46 | 46 | 43 | 29 | 30 | 29 | 18 | 12 | 35 | 288 |
| M1 | 8 | 4 | 1 | 8 | 5 | 1 | 3 | 1 | 2 | 33 |
| Tumorstadium (UICC) (n = 322)* | | | | | | | | | | |
| I | 11 | 18 | 20 | 5 | 4 | 2 | 2 | 3 | 6 | 71 |
| II | 13 | 16 | 11 | 4 | 3 | 9 | 5 | 3 | 9 | 73 |
| III | 11 | 9 | 9 | 7 | 5 | 8 | 7 | 4 | 8 | 68 |
| IV | 19 | 8 | 4 | 21 | 23 | 11 | 7 | 3 | 14 | 110 |
| Grading* | | | | | | | | | | |
| G1 | 3 | 30 | 38 | 3 | - | - | 4 | 13 | 14 | 105 |
| G2 | 38 | 6 | - | 4 | - | - | 6 | - | - | 54 |
| G3 | 14 | 15 | 6 | 30 | 35 | 31 | 11 | - | 23 | 165 |
| Therapie | | | | | | | | | | |
| Alleinige Chirurgie | 15 | 29 | 24 | 12 | 11 | 11 | 10 | 7 | 13 | 132 |
| Adjuvante oder primäre Radio-/Radiochemo-/ Chemotherapie | 40 | 22 | 20 | 25 | 23 | 20 | 11 | 6 | 24 | 191 |
| Keine Therapie | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |

| Residualtumor (n = 321) | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| R0 | 30 | 47 | 41 | 25 | 26 | 22 | 17 | 10 | 30 | 248 |
| R1 | 18 | 2 | 3 | 8 | 6 | 7 | 2 | 3 | 4 | 53 |
| R2 | 6 | 2 | - | 3 | 3 | 2 | 2 | - | 2 | 20 |
| Rezidiv (n = 310) | | | | | | | | | | |
| Nein | 32 | 41 | 35 | 23 | 25 | 20 | 15 | 11 | 27 | 229 |
| Ja | 20 | 8 | 9 | 11 | 8 | 9 | 5 | 2 | 9 | 81 |

*Signifikante Assoziationen (Chi-Quadrat-Test): $p < 0,001$

4.1.1 Tumorentitäten, Geschlecht und Alter

Im Gesamtkollektiv waren Frauen mit 52,8% etwas häufiger betroffen als Männer (47,2%). Bezogen auf die einzelnen histologischen Tumortypen zeigte sich besonders beim adenoidzystischen Karzinom mit 69,1%, beim Azinuszellkarzinom mit 68,2% und beim Mukoepidermoidkarzinom mit 62,7% eine stärkere Zuordnung zum weiblichen Geschlecht, während 64,9% aller Adenokarzinome NOS, 69,2% aller polymorphen niedrig-malignen Karzinome sowie 80,6% der Plattenepithelkarzinome Männern zugewiesen werden konnten ($p < 0,001$; vgl. Tab. 11).

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose durchschnittlich 60,83 Jahre alt. Die an einem Speicheldrang- oder Plattenepithelkarzinom Erkrankten waren zu 54,3% bzw. 77,4% über 70 Jahre alt. Entitäten wie das Azinuszell- oder Mukoepidermoidkarzinom wurden dagegen überwiegend bei jüngeren Patienten (≤ 70 Jahren) diagnostiziert (79,5% bzw. 72,5%; $p < 0,001$; vgl. Tab. 11).

Zudem zeigten sich Zusammenhänge zwischen einem Erkrankungsalter über 70 Jahren und histologischer Entdifferenzierung: Waren lediglich 21,7% der Patienten mit G1-Malignomen über 70 Jahre alt, stieg diese Rate für G2- und G3-Tumoren auf 43,2% an (291 Patienten; $p < 0,001$).

4.1.2 Lokalisation

In der Gl. parotidea waren 229, in der Gl. submandibularis 46, in der Gl. sublingualis zwei und in den kleinen Speicheldrüsen 47 Karzinome lokalisiert.

30,9% aller adenoid-zystischen Karzinome, 29,4% der Mukoepidermoidkarzinome und 61,5% aller polymorphen niedrig-malignen Adenokarzinome entstanden in den kleinen Speicheldrüsen. 96,8% der Plattenepithelkarzinome, 88,6% der Azinuszellkarzinome und 82,9% der Speichelgangkarzinome befanden sich hingegen in der Gl. parotis ($p < 0,001$; vgl. Tab. 11).

131 von 229 (57,2%) Parotis-Malignomen und 26 von 46 (56,5%) Karzinomen der Gl. submandibularis erwiesen sich als schlecht differenziert. Demgegenüber waren 26 von 49 Tumoren (53,1%) der kleinen Speicheldrüsen sowie der Gl. sublingualis gut differenziert ($p < 0,001$; Abb. 13).

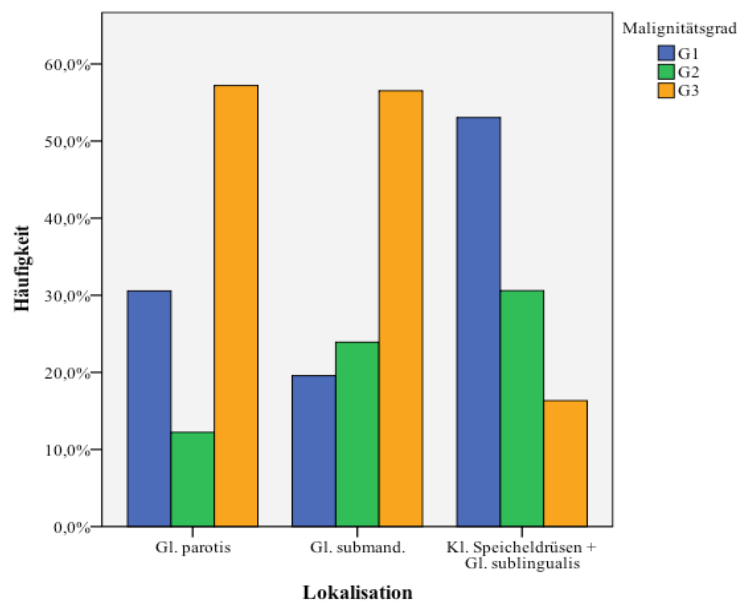


Abb. 13: Assoziationen zwischen Tumorlokalisierung und Malignitätsgrad

4.1.3 TNM-Klassifikation und Tumorstadium

Nach chirurgischer Entfernung und histopathologischer Untersuchung der Resektate erfolgte eine Einordnung entsprechend des TNM-Schemas der UICC in das jeweilige Stadium. Zur Auswertung des T-Stadiums kamen 319 Fälle. Dabei lag zu 25,7% ein T1-, 33,2%

ein T2-, 23,8% ein T3- und 17,2% ein T4-Stadium vor ($p = 0,165$; Tab. 11).

Bezüglich der Lymphknotenmetastasierung konnten Daten von 316 Patienten ausgewertet werden. Hierbei zeigten sich im Gesamtkollektiv in 31,3% der Fälle befallene Lymphknoten. 93,0% der Azinuszellkarzinome, 82,0% der adenoid-zystischen Karzinome und 74,5% der Mukoepidermoidkarzinome gingen mit einem negativen Nodalstatus einher, wohingegen 71,4% der Speicheldrüsenkarzinome, 44,5% der Adenokarzinome NOS, 43,3% der Plattenepithelkarzinome und 28,6% der myoepithelialen Karzinome in Verbindung mit Lymphknotenmetastasen auftraten ($p < 0,001$; Tab. 11). Des Weiteren lassen sich Zusammenhänge zwischen der Größe des Primärtumors und dem N-Status erkennen (Tab. 12). Während lediglich 17,1% der T1- bzw. 28,3% der T2-Malignome mit Lymphknotenmetastasen assoziiert waren, zeigten sich 42,1% der T3- und 48,1% der T4-Neoplasien mit tumorpositiven Halslymphknoten vergesellschaftet ($p < 0,001$; Daten von 316 Patienten).

Tab. 12: Assoziationen zwischen T- und N-Status

| T-Stadium | N-Status | | Gesamt |
|------------------|-----------------|----------------|---------------|
| | negativ | positiv | |
| T1 | 68 (82,9%) | 14 (17,1%) | 82 |
| T2 | 76 (71,7%) | 30 (28,3%) | 106 |
| T3 | 44 (57,9%) | 32 (42,1%) | 76 |
| T4 | 27 (51,9%) | 25 (48,1%) | 52 |
| Gesamt | 215 (68,0%) | 101 (32,0%) | 316 |

Eine Fernmetastasierung lag in 10,3% der Fälle vor (Daten von 321 Patienten). Am auffälligsten zeigte sich hierbei das Adenokarzinom NOS, bei dem zu 21,6% Fernmetastasen auftraten ($p = 0,21$; Tab. 11).

Bezüglich des Gesamtstadiums (UICC) konnten 322 Patientenfälle ausgewertet werden. 71 Tumoren (22,0%) waren mit Stadium I, 73 (22,7%) mit Stadium II, 68 (21,1%) mit Stadium III und 110 (34,2%) mit Stadium IV vergesellschaftet (Abb. 14 und Tab. 11). 70,5% der Azinuszellkarzinome und 66,7% der Mukoepidermoidkarzinome gingen mit einem niedrigen Tumorstadium (I oder II) einher, wohingegen sich bei 80,0% der Speicheldrüsenkarzinome, 78,4% der Adenokarzinome NOS, 66,7% der myoepithelialen Karzinome,

63,3% der Plattenepithelkarzinome, 55,6% der adenoid-zystischen Karzinome und 53,8% der polymorphen niedrig-malignen Karzinome ein Tumorstadium III oder IV nachweisen ließ ($p < 0,001$).

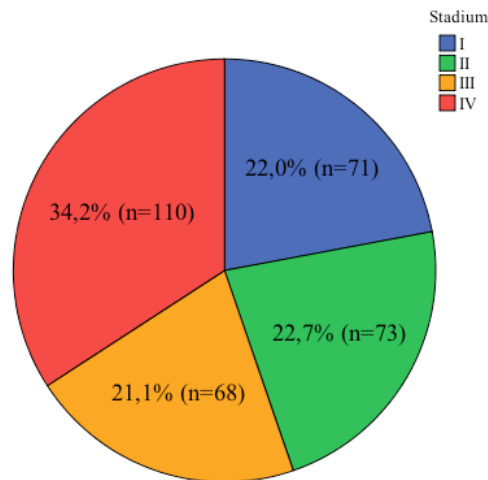


Abb. 14: Verteilung der Tumorstadien (UICC) im Gesamtkollektiv

4.1.4 Grading

Insgesamt waren 105 Tumoren (32,4%) gut (G1), 54 (16,7%) mäßig (G2) und 165 (50,9%) schlecht (G3) differenziert (Tab. 11).

Signifikante Zusammenhänge ergaben sich zwischen dem histologischen Grading und dem Tumorstadium: 63,8% der Grad 1- und 54,7% der Grad 2-Tumoren konnten den Stadien I oder II zugeordnet werden, während 71,3% aller Grad 3-Malignome mit einem Tumorstadium III oder IV assoziiert waren ($p < 0,001$, 322 Patienten; Abb. 15).

Ferner ließen sich Korrelationen zwischen Malignitätsgrad und Größe des Primärtumors darstellen: Lediglich 29,5% der G1-Malignome, jedoch 52,1% der G3-Tumoren waren mit einem T3- oder T4-Stadium vergesellschaftet (319 Patienten; $p < 0,001$).

Während gut differenzierte Neoplasien nur zu 14,4% mit tumorpositiven Lymphknoten in Erscheinung traten, fanden sich bei solchen mit mäßiger Differenzierung in 18,0% und bei schlecht differenzierten Tumoren in 47,5% der Fälle Lymphknotenmetastasen (316 Patienten; $p < 0,001$; Abb. 16).

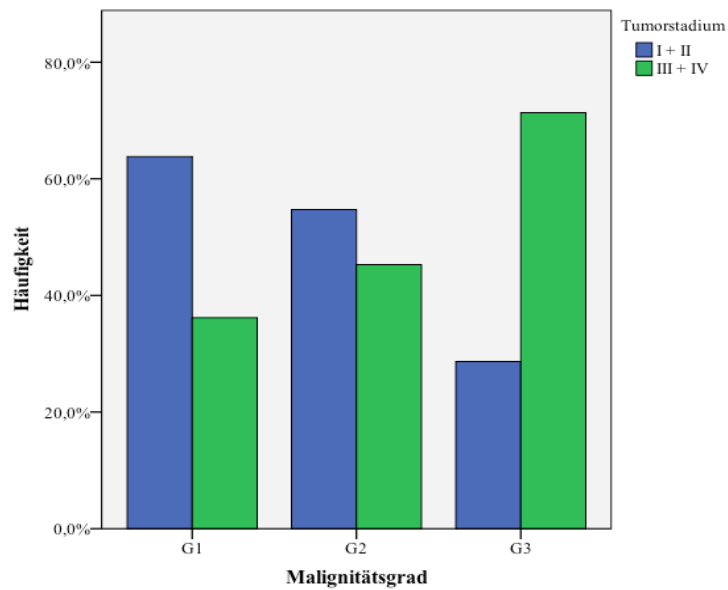


Abb. 15: Assoziationen zwischen Malignitätsgrad und Tumorstadium (UICC)

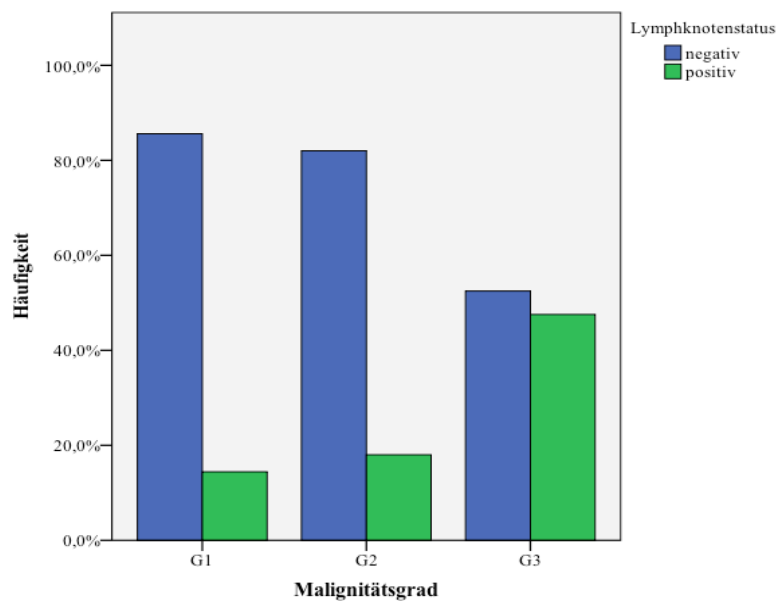


Abb. 16: Assoziationen zwischen Malignitätsgrad und Lymphknotenstatus

4.1.5 Therapie und Resektionsstatus

322 der insgesamt 324 Patienten (99,4%) wurden chirurgisch therapiert, davon 299 in kurativer Intention. 132 Patienten (40,7%) wurden allein operativ therapiert, 191 Patienten (58,9%) wurden zusätzlich (adjuvant) oder singulär (primär) radio-/chemotherapeutisch

behandelt (mittlere Strahlendosis 57,3 Gy). 134 Patienten (41,4%) erhielten eine adjuvante Radiatio, 40 (12,3%) eine Radiochemotherapie (hauptsächlich Cisplatin oder 5-Fluoruracil). 17 Patienten (5,2%) wurden primär radio-, radiochemo- oder chemotherapiert (überwiegend Taxotere). Ein Patient (Speicheldrangkarzinom) wurde nicht behandelt (Tab. 11).

Hinsichtlich des Resektionsstatus konnte in 248 von 321 Fällen (77,3%) das Tumorgewebe in Sano entfernt werden (R0), während in 53 Fällen (16,5%) ein mikroskopischer (R1) und in 20 Fällen (6,2%) ein makroskopischer (R2) Residualtumor vorlag (Tab. 11). Es zeigten sich signifikante Assoziationen zwischen dem R-Status und dem Tumorstadium: Lediglich 9,8% der Tumorstadien I und II gingen mit einem Residualtumor einher, für Stadium III und IV erhöhte sich diese Rate auf 33,5% (319 Patienten; $p < 0,001$; Tab. 13).

Tab. 13: Tumorstadium und Auftreten eines Residualtumors

| Tumorstadium | Residualtumor | | Gesamt |
|-------------------------|----------------------|----------------|---------------|
| | R0 | R1 + R2 | |
| Stadium I + II | 129 (90,2%) | 14 (9,8%) | 143 |
| Stadium III + IV | 117 (66,5%) | 59 (33,5%) | 171 |
| Gesamt | 246 (77,1%) | 73 (22,9%) | 319 |

234 Patienten (72,7% der chirurgisch behandelten Fälle bzw. 86,1% derjenigen mit positivem N-Status) erhielten eine Neck Dissection. Dabei ließen sich Assoziationen mit der Tumorlokalisation aufzeigen: Bei Malignomen der kleinen Speicheldrüsen wurde in nur 40,4% der Fälle eine Neck Dissection durchgeführt, wohingegen dieser Anteil bei Tumorage in der Gl. parotidea bei 79,7% und in der Gl. submandibularis bei 71,7% lag (322 Patienten; $p < 0,001$).

Bei gut und mäßig differenzierten Karzinomen wurde zu 63,3%, bei schlecht differenzierten Tumoren zu 81,7% eine chirurgische Lymphknotenentfernung durchgeführt (322 Patientenfälle; $p < 0,001$).

Patienten mit Tumorstadium I oder II wurden in 66,2%, solche mit Stadium III oder IV in 78,2% der Fälle mittels einer Neck Dissection behandelt (321 Patientenfälle; $p = 0,016$). Zudem erhielten erstere (I oder II) in 40,6% der Fälle eine adjuvante Radiatio oder Radiochemotherapie. Für fortgeschrittene Tumorstadien (III und IV) erhöhte sich diese Rate auf

73,7% (322 Patienten; $p < 0,001$).

4.1.6 Rezidive

In insgesamt 81 von 310 Fällen (26,1%) kam es zu einem Rezidiv. Auffällig, jedoch nicht signifikant, verhielten sich das adenoid-zystische Karzinom, das in 38,5% der Fälle ein Rezidiv entwickelte, sowie das Adenokarzinom NOS (32,4%) und das Plattenepithelkarzinom (31,0%). Ferner seien die zwei großzelligen Karzinome genannt, die beide zu Rezidiven führten (Tab. 11). Bezüglich Alter, Lokalisation und Lymphknotenstatus ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge darstellen. Von 306 Patienten gingen diejenigen mit einem kleineren Primärtumor (T1 und T2) in 21,5% der Fälle mit einem Rezidiv einher. Dem gegenüber gestellt lag dieser Anteil für größere Karzinome (T3 und T4) bei 32,5% ($p = 0,032$).

Während 16,8% der Patienten mit einem Tumorstadium I oder II Rezidive bildeten, erhöhte sich diese Quote für die Stadien III und IV auf 34,5% (308 Patientenfälle; $p < 0,001$; Abb. 17).

Im Hinblick auf das Grading ($n = 310$) entwickelten 16,3% der G1-Tumoren ein Rezidiv. Diese Rate lag für G2- bei 26,9% und G3-Malignome bei 32,5% ($p = 0,015$).

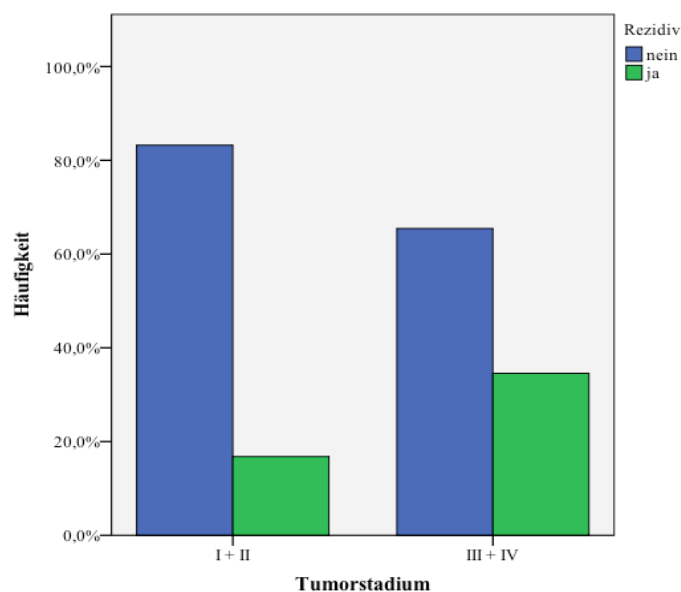


Abb. 17: Zusammenhänge zwischen Tumorstadium (UICC) und Rezidiventwicklung

4.2 Deskriptive Analyse: FISH-Ergebnisse

4.2.1 PTEN

Tabelle 14 zeigt die Zusammenhänge zwischen den häufigsten Entitäten und den jeweiligen PTEN-Genstatus. Generell lagen bei 180 von 232 Patienten (77,6%) Disomien, in 35 Fällen (15,1%) hemizygote und in 17 Fällen (7,3%) homozygote Deletionen vor.

Es fiel vor allem das Speicheldrüsenkarzinom auf, das in 37,5% der Fälle hemi- und 29,2% der Fälle homozygote Deletionen zeigte. Beim Plattenepithelkarzinom kam es zu 34,6% und beim Adenokarzinom NOS in 22,7% der Fälle zu hemizygoten Deletionen. Letzteres zeigte zu 27,3% homozygote Genverluste ($p < 0,001$).

Tab. 14: Disomien, hemi- und homozygote Deletionen sowie Bezüge zu den häufigsten Entitäten

| | PTEN | | |
|--------------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| | Disomie | Hemizygote Del. | Homozygote Del. |
| Gesamt (n = 232)* | 180 (77,6%) | 35 (15,1%) | 17 (7,3%) |
| AZZK (n = 35) | 30 (85,7%) | 5 (14,3%) | - |
| ADZK (n = 42) | 41 (97,6%) | 1 (2,4%) | - |
| MEK (n = 39) | 35 (89,7%) | 3 (7,7%) | 1 (2,6%) |
| SGK (n = 24) | 8 (33,3%) | 9 (37,5%) | 7 (29,2%) |
| AKNOS (n = 22) | 11 (50,0%) | 5 (22,7%) | 6 (27,3%) |
| PEK (n = 26) | 15 (57,7%) | 9 (34,6%) | 2 (7,7%) |
| MYEK (n = 18) | 15 (83,3%) | 2 (11,1%) | 1 (5,6%) |
| Andere (n = 26) | 25 (13,9%) | 1 (2,7%) | - |

*Signifikante Assoziationen (Chi-Quadrat-Test): $p < 0,001$;

Del. = Deletion; AZZK = Azinuszellkarzinom, ADZK = Adenoid-zystisches Karzinom;
 MEK = Mukoepidermoidkarzinom; SGK = Speicheldrüsenkarzinom; AKNOS = Adenokarzinom NOS;
 PEK = Plattenepithelkarzinom; MYEK = Myoepitheliales Karzinom

Tabelle 15 fasst die vorliegenden Assoziationen zwischen den ermittelten PTEN-Genstatus und klinisch-pathologischen Parametern zusammen. Bezüglich des Geschlechts, des Alters, der Größe des Primärtumors, des M-Status, Vorliegens eines Residualtumors und der Entwicklung von Rezidiven zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Im Hinblick auf den Nodalstatus lagen bei Tumoren mit unauffälligem Genzustand zu 77,5% metastasenfreie Lymphknoten vor, wohingegen 54,3% der Malignome mit hemizygoten und 58,8% derjenigen mit homozygoten Deletionen mit tumorpositiven Lymphknoten einhergingen (225 Patienten; $p < 0,001$; Abb. 18).

Patienten mit einem regelrechten PTEN-Genstatus (Disomie) konnten in 49,4% der Fälle dem Tumorstadium I oder II zugeordnet werden. Im Kontrast dazu waren hemizygoten Deletionen in 68,6% der Fälle und homozygote Deletionen in 88,2% der Fälle mit einem Tumorstadium III oder IV assoziiert (230 Patienten; $p = 0,003$).

Ein signifikanter Zusammenhang verdeutlichte sich ebenfalls in Anbetracht des Malignitätsgrades: Disomien waren zu 57,2% mit guter oder mäßiger Differenzierung, hemi- und homozygote Deletionen in 77,1% bzw. 94,1% der Fälle mit schlechter Differenzierung vergesellschaftet (232 Patienten; $p < 0,001$; Abb. 19).

Tab. 15: PTEN-Genstatus und Assoziationen zu klinisch-pathologischen Parametern

| | PTEN | | |
|--------------------|-------------|------------------|-----------------|
| | Disomie | Hemizygoten Del. | Homozygote Del. |
| Geschlecht | | | |
| männlich (n = 116) | 90 (77,6%) | 20 (17,2%) | 6 (5,2%) |
| weiblich (n = 116) | 90 (77,6%) | 15 (12,9%) | 11 (9,5%) |
| Alter | | | |
| ≤ 70 (n = 146) | 119 (81,5%) | 18 (12,3%) | 9 (6,2%) |
| > 70 (n = 86) | 61 (70,9%) | 17 (19,8%) | 8 (9,3%) |
| T-Status | | | |
| T1 + T2 (n = 130) | 103 (79,2%) | 19 (14,6%) | 8 (6,2%) |

| | | | |
|----------------------|-------------|------------|------------|
| T3 + T4 (n = 98) | 73 (74,5%) | 16 (16,3%) | 9 (9,2%) |
| N-Status** | | | |
| N0 (n = 157) | 134 (85,4%) | 16 (10,2%) | 7 (4,5%) |
| N1 - N3 (n = 68) | 39 (57,4%) | 19 (27,9%) | 10 (14,7%) |
| M-Status | | | |
| M0 (n = 205) | 160 (78,0%) | 31 (15,1%) | 14 (6,8%) |
| M1 (n = 25) | 18 (72,0%) | 4 (16,0%) | 3 (12,0%) |
| Tumorstadium* | | | |
| I + II (n = 101) | 88 (87,1%) | 11 (10,9%) | 2 (2,0%) |
| III + IV (n = 129) | 90 (69,8%) | 24 (18,6%) | 15 (11,6%) |
| Grading** | | | |
| G1 + G2 (n = 112) | 103 (92,0%) | 8 (7,1%) | 1 (0,9%) |
| G3 (n = 120) | 77 (64,2%) | 27 (22,5%) | 16 (13,3%) |
| Residualtumor | | | |
| R0 (n = 179) | 140 (78,2%) | 28 (15,6%) | 11 (6,1%) |
| R1 + R2 (n = 51) | 38 (74,5%) | 7 (13,7%) | 6 (11,8%) |
| Rezidiv | | | |
| Nein (n = 165) | 134 (81,2%) | 20 (12,1%) | 11 (6,7%) |
| Ja (n = 59) | 41 (69,5%) | 13 (22,0%) | 5 (8,5%) |

Signifikante Assoziationen (Chi-Quadrat-Test): *p < 0,01; **p < 0,001

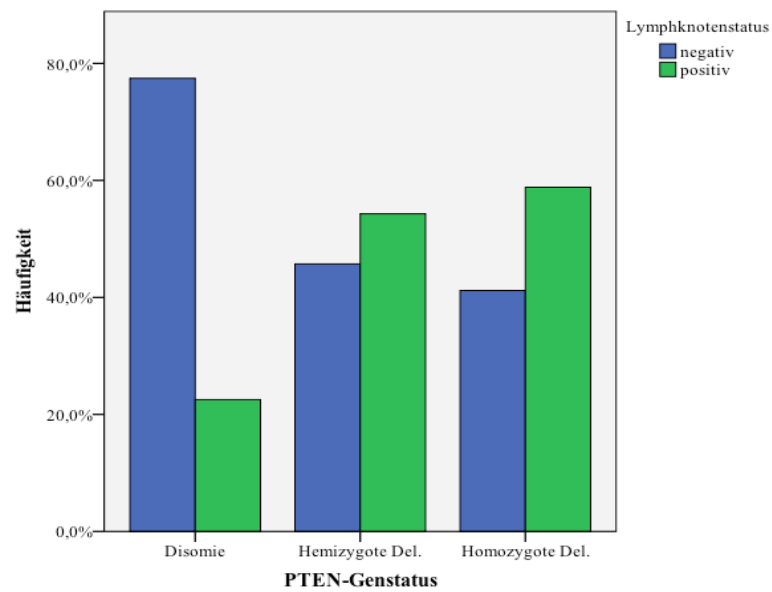


Abb. 18: PTEN-Genstatus und Lymphknotenmetastasierung

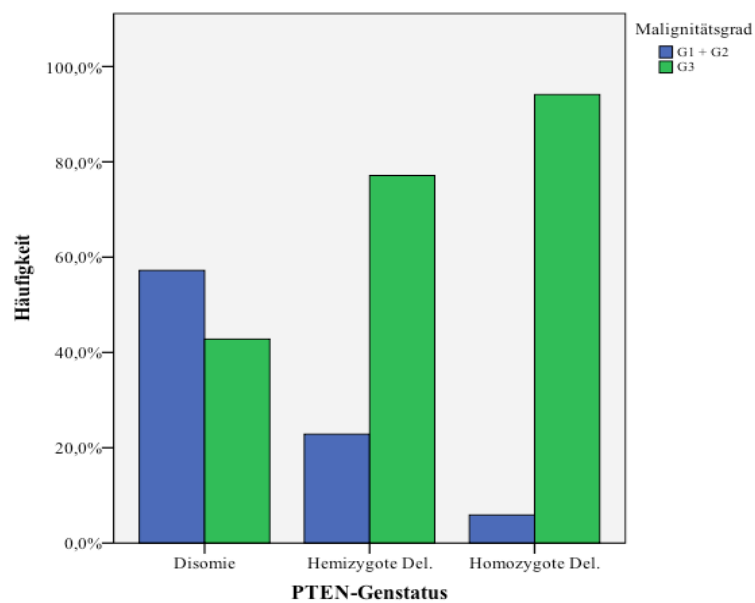


Abb. 19: PTEN-Genstatus und Malignitätsgrad

4.2.2 c-Met

Tabelle 16 zeigt Zusammenhänge zwischen den häufigsten Entitäten und den jeweiligen c-Met-Genstatus. Es lagen bei insgesamt 233 Tumoren in 144 Fällen Disomien, in 42 niedrige Polysomien, in 27 hohe Polysomien, in 2 Amplifikationen und in 18 Fällen Deletionen vor. Dabei ergab sich ein starker Bezug zu den verschiedenen Entitäten: Während 88,6% aller adenoid-zystischen und 86,5% aller Azinuszellkarzinome mit Disomien einhergingen, verringerte sich diese Rate beim Speicheldrangkarzinom auf 16,7%. Letzteres zeigte zu 41,7% niedrige und zu 16,7% hohe Polysomien sowie in 25,0% der Fälle Deletionen. Bei 24,0% der Adenokarzinome NOS konnten niedrige Polysomien und zu 20,0% hohe Polysomien diagnostiziert werden. Das Plattenepithelkarzinom war in 11,5% der Fälle mit niedrigen, zu 34,6% mit hohen Polysomien und zu 11,5% mit Deletionen vergesellschaftet. Jeweils ein Adenokarzinom NOS (4,0%) und ein myoepitheliales Karzinom (5,0%) zeigten Amplifikationen ($p < 0,001$).

Tab. 16: Disomien, niedrige und hohe Polysomien, Amplifikationen und Deletionen bei c-Met sowie deren Bezug zu den häufigsten Entitäten

| | c-Met | | | | |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| | Disomie | Niedrige Polysomie | Hohe Polysomie | Amplifikation | Deletion |
| Gesamt (n = 233)* | 144 (61,8%) | 42 (18,0%) | 27 (11,6%) | 2 (0,9%) | 18 (7,7%) |
| AZZK (n = 37) | 32 (86,5%) | 5 (13,5%) | 0 | 0 | 0 |
| ADZK (n = 35) | 31 (88,6%) | 3 (8,6%) | 1 (2,8%) | 0 | 0 |
| MEK (n = 41) | 28 (68,3%) | 8 (19,5%) | 4 (9,6%) | 0 | 1 (2,4%) |
| SGK (n = 24) | 4 (16,7%) | 10 (41,7%) | 4 (16,7%) | 0 | 6 (25,0%) |
| AKNOS (n = 25) | 11 (44,0%) | 6 (24,0%) | 5 (20,0%) | 1 (4,0%) | 2 (8,0%) |
| PEK (n = 26) | 11 (42,3%) | 3 (11,5%) | 9 (34,6%) | 0 | 3 (11,5%) |
| MYEK (n = 20) | 10 (50,0%) | 6 (30,0%) | 1 (5,0%) | 1 (5,0%) | 2 (10,0%) |
| Andere (n = 25) | 17 (68,0%) | 1 (4,0%) | 3 (12,0%) | 0 | 4 (16,0%) |

*Signifikante Assoziationen (Chi-Quadrat-Test): $p < 0,001$;
 AZZK = Azinuszellkarzinom, ADZK = Adenoid-zystisches Karzinom;
 MEK = Mukoepidermoidkarzinom; SGK = Speicheldrangkarzinom; AKNOS = Adenokarzinom NOS;
 PEK = Plattenepithelkarzinom; MYEK = Myoepitheliales Karzinom

In Tabelle 17 sind auftretende Assoziationen zwischen den diversen c-Met-Genstatus und klinisch-pathologischen Parametern zusammengefasst.

Während 70,4% der weiblichen Patienten Disomien aufwiesen, lag diese Rate bei Männern bei 53,4%. Ein deutlicher Unterschied ergab sich ebenfalls im Auftreten von hohen Polysomien, die bei Frauen zu 7,0% und bei Männern zu 16,1% nachgewiesen werden konnten. Deletionen fanden sich bei weiblichen Patienten in 4,3%, bei männlichen in 11,0% der Fälle (233 Patienten; $p = 0,035$). 105 von 152 (69,1%) der Patienten, die maximal 70 Jahre alt waren, wiesen eine regelrechte Genkopie auf, während sich diese Rate für ein Diagnosealter über 70 Jahre auf 48,1% verringerte (233 Patienten; $p = 0,002$).

66,0% der Disomien traten im Zusammenhang mit kleineren Tumoren (T1 + T2) auf. Demgegenüber lagen bei 43,9% der niedrigen Polysomien, bei 66,7% der hohen Polysomien und bei 72,2% der Deletionen größere Tumoren (T3 + T4) vor (229 Patienten; $p = 0,002$).

Statistisch signifikante Zusammenhänge ließen sich ebenso für den Nodalstatus aufzeigen: Lagen keine genetischen Aberrationen vor, so konnte in 80,6% der Fälle von tumorfreien Lymphknoten ausgegangen werden. C-Met-Aberrationen (niedrige und hohe Polysomien, Amplifikationen sowie Deletionen) waren hingegen in 52,9% der Fälle mit Lymphknotenmetastasen assoziiert (226 Patienten; $p < 0,001$).

Bezüglich der Fernmetastasierung ließen sich keine signifikanten Ergebnisse nachweisen. Im Bezug auf das Gesamtstadium konnte festgestellt werden, dass sich 57,7% der Tumoren mit regelrechter Genkopie im Stadium I oder II befanden, während 77,5% der Karzinome mit Genaberrationen mit einem Tumorstadium III oder IV kombiniert waren (231 Patienten; $p < 0,001$; Abb. 20).

58,0% der Tumoren mit regelrechter Genkopie waren mit guter oder mäßiger Differenzierung assoziiert. Verglichen damit waren 70,4% der Fälle mit erhöhter Genexprimierung dem G3-Stadium zuzuordnen (233 Patienten; $p < 0,001$).

In der Untersuchung auf vorhandene Residualtumoren und eine Rezidivbildung zeigten sich keine statistisch signifikanten Verknüpfungen.

Tab. 17: c-Met-Genstatus und Assoziationen zu klinisch-pathologischen Parametern

| | c-Met | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | Disomie | Niedrige Polysomie | Hohe Polysomie | Amplifikation | Deletion |
| Geschlecht* | | | | | |
| männlich (n = 118) | 63 (53,4%) | 22 (18,6%) | 19 (16,1%) | 1 (0,8%) | 13 (11,0%) |
| weiblich (n = 115) | 81 (70,4%) | 20 (17,4%) | 8 (6,7%) | 1 (0,8%) | 5 (4,3%) |
| Alter* | | | | | |
| ≤ 70 (n = 152) | 105 (69,1%) | 23 (15,1%) | 13 (8,6%) | 2 (1,3%) | 9 (5,9%) |
| > 70 (n = 81) | 39 (48,1%) | 19 (23,5%) | 14 (17,3%) | 0 | 9 (11,1%) |
| T-Status** | | | | | |
| T1 + T2 (n = 131) | 93 (71,0%) | 23 (17,6%) | 9 (6,9%) | 1 (0,8%) | 5 (3,8%) |
| T3 + T4 (n = 98) | 48 (49,0%) | 18 (18,4%) | 18 (18,4%) | 1 (1,0%) | 13 (13,3%) |
| N-Status*** | | | | | |
| N0 (n = 153) | 112 (73,2%) | 19 (12,4%) | 12 (7,8%) | 2 (1,3%) | 8 (5,2%) |
| N1 - N3 (n = 73) | 27 (37,0%) | 21 (28,8%) | 15 (20,5%) | 0 | 10 (13,7%) |
| M-Status | | | | | |
| M0 (n = 206) | 129 (62,6%) | 34 (16,5%) | 25 (12,1%) | 2 (1,0%) | 16 (7,8%) |
| M1 (n = 24) | 12 (50,0%) | 8 (33,3%) | 2 (8,3%) | 0 | 2 (8,3%) |
| Stadium*** | | | | | |
| I + II (n = 102) | 82 (80,4%) | 12 (11,8%) | 5 (4,9%) | 1 (1,0%) | 2 (2,0%) |
| III + IV (n = 129) | 60 (46,5%) | 30 (23,3%) | 22 (17,1%) | 1 (0,8%) | 16 (12,4%) |

| Grading*** | | | | | |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| G1 + G2 (n = 115) | 93 (80,9%) | 15 (13,0%) | 6 (5,2%) | 0 | 1 (0,9%) |
| G3 (n = 118) | 51 (43,2%) | 27 (22,9%) | 21 (17,8%) | 2 (1,7%) | 17 (14,4%) |
| Residualtumor | | | | | |
| R0 (n = 177) | 113 (63,8%) | 30 (16,9%) | 20 (11,3%) | 2 (1,1%) | 12 (6,8%) |
| R1 + R2 (n = 54) | 30 (55,6%) | 12 (22,2%) | 7 (13,0%) | 0 | 5 (9,3%) |
| Rezidiv | | | | | |
| Nein (n = 164) | 110 (67,1%) | 22 (13,4%) | 18 (11,0%) | 2 (1,2%) | 12 (7,3%) |
| Ja (n = 60) | 33 (55,0%) | 16 (26,7%) | 7 (11,7%) | 0 | 4 (6,7%) |

Signifikante Assoziationen (Chi-Quadrat-Test): *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

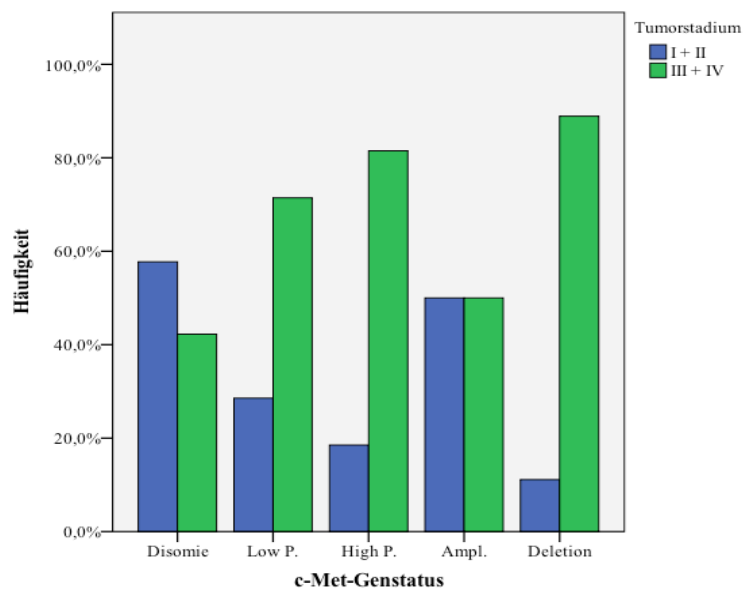


Abb. 20: c-Met-Genstatus und Tumorstadien (UICC)

4.2.3 PTEN und c-Met

Überschneidungen ergaben sich des Weiteren in der Untersuchung beider Gene auf simultan auftretende genetische Aberrationen. 71,3% der Tumoren mit Disomien bei PTEN gingen mit Disomien bei c-Met einher. Kam es bei PTEN zu genetischen Verlusten, so lagen zu 70,8% auch Abweichungen bei c-Met vor (212 Patienten; $p < 0,001$; Tab. 18 und Abb. 21).

Tab. 18: Korrelationen zwischen Deletionen bei PTEN und Aberrationen bei c-Met

| | | c-Met | |
|----------------------------|-----------------------|-------------|------------|
| | | Disomie | Aberration |
| P T E N | Keine Deletion | 117 (71,3%) | 47 (28,7%) |
| | Deletion | 14 (29,2%) | 34 (70,8%) |

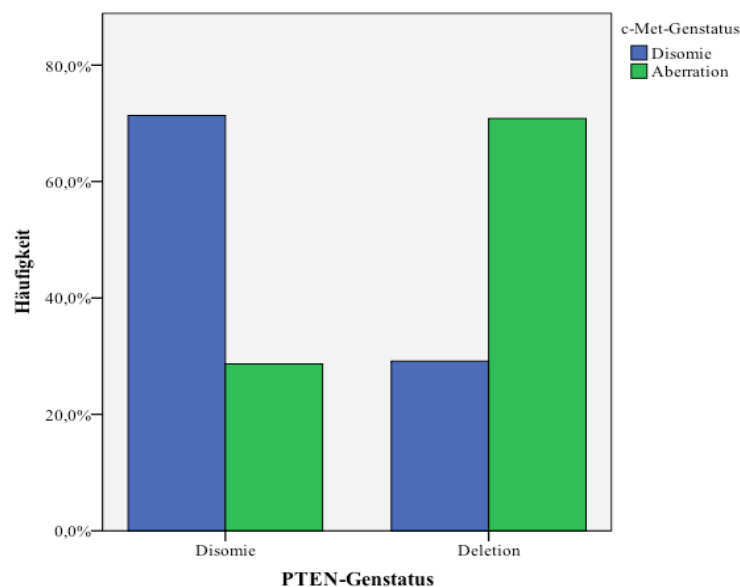


Abb. 21: PTEN- und c-Met-Genstatus

Bei detaillierter Aufspaltung des PTEN-Parameters *Deletion* sowie des c-Met-Faktors *Aberration* ergaben sich weitere signifikante Zusammenhänge: Hemizygote PTEN-Deletionen waren zu 28,1% mit niedrigen Polysomien, zu 21,9% mit hohen Polysomien

und zu 15,6% mit Deletionen bei c-Met vergesellschaftet. Lagen homozygote Deletionen vor, ergaben sich c-Met-Raten mit 25,0% für niedrige Polysomien, 31,3% für hohe Polysomien, 6,3% für Amplifikationen und 18,8% für Deletionen (212 Patienten; $p < 0,001$; Tab. 19).

Tab. 19: Abgleich zwischen Deletionen bei PTEN und Aberrationen bei c-Met

| | | c-Met | | | | |
|----------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| | | Disomie | Niedrige Polysomie | Hohe Polysomie | Amplifikation | Deletion |
| P T E N | Disomie | 117 (71,3%) | 24 (14,6%) | 13 (7,9%) | 1 (0,6%) | 9 (5,5%) |
| | Hemizygote Deletion | 11 (34,4%) | 9 (28,1%) | 7 (21,9%) | 0 | 5 (15,6%) |
| | Homozygote Deletion | 3 (18,8%) | 4 (25,0%) | 5 (31,3%) | 1 (6,3%) | 3 (18,8%)* |

*Signifikante Assoziation (Chi-Quadrat-Test): $p < 0,001$

4.3 Univariate Überlebensanalyse: Klinisch-pathologische Parameter

Im Durchschnitt wurden die Patienten 4,85 Jahre lang beobachtet, wobei das Minimum bei 0,1 und das Maximum bei 21,2 Jahren lag.

Im Gesamtkollektiv lag das tumorspezifische Überleben für fünf und zehn Jahre (5-/10-J-TSÜ) bei 74,8% bzw. 68,9% (Abb. 22).

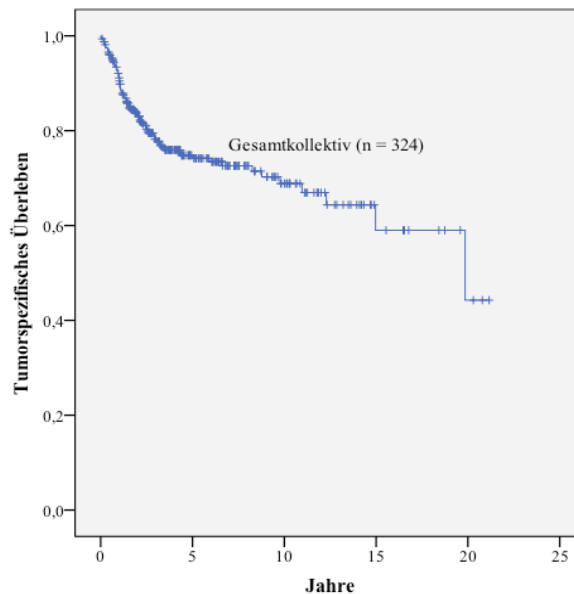


Abb. 22: Gesamtüberleben aller Tumorpatienten

Tabelle 20 liefert einen Überblick über das 5- und 10-J-TSÜ in absteigender Reihenfolge für die im untersuchten Kollektiv häufigsten Tumorentitäten, die wichtigsten klinisch-pathologischen Parameter sowie vorliegende statistische Signifikanzen.

Tab. 20: Univariate Überlebensanalyse: Die häufigsten Entitäten und klinisch-pathologische Parameter

| | Fallzahl | 5-J-TSÜ (%) | 10-J-TSÜ (%) |
|-----------------|----------|-------------|--------------|
| Entität* | | | |
| AZZK | 44 | 96,9 | 90,8 |
| PNMK | 13 | 87,5 | - |
| MEK | 51 | 83,2 | 75,0 |

| | | | |
|---------------------|------------|-------------|-------------|
| ADZK | 55 | 75,9 | 70,1 |
| PEK | 31 | 64,4 | 64,4 |
| MYEK | 21 | 59,4 | 59,4 |
| SGK | 35 | 59,1 | - |
| AKNOS | 37 | 59,0 | 59,0 |
| Geschlecht | | | |
| männlich | 153 | 71,8 | 65,5 |
| weiblich | 171 | 77,4 | 71,4 |
| Alter* | | | |
| ≤ 70 | 202 | 84,7 | 79,4 |
| > 70 | 122 | 56,8 | 45,6 |
| Lokalisation | | | |
| Gl. parotis | 229 | 71,6 | 64,6 |
| Gl. submandibularis | 46 | 73,5 | 73,5 |
| Kl. Speicheldrüsen | 47 | 90,3 | 80,5 |
| Gl. sublingualis | 2 | - | - |
| T-Stadium* | | | |
| T1 + T2 | 188 | 86,2 | 81,5 |
| T3 + T4 | 131 | 57,5 | 48,3 |
| N-Stadium* | | | |
| N0 | 215 | 84,9 | 80,1 |
| N1 - N3 | 101 | 52,1 | 42,7 |

| M-Stadium* | | | |
|-----------------------|------------|-------------|-------------|
| M0 | 288 | 80,9 | 75,9 |
| M1 | 33 | 26,0 | 21,7 |
| Tumorstadium* | | | |
| I + II | 143 | 91,3 | 87,5 |
| III + IV | 179 | 60,7 | 52,5 |
| Residualtumor* | | | |
| R0 | 248 | 83,4 | 76,5 |
| R1 + R2 | 73 | 46,3 | 43,0 |
| Rezidiv* | | | |
| Nein | 229 | 90,2 | 86,8 |
| Ja | 81 | 48,9 | 39,3 |

*Signifikante Assoziation (Chi-Quadrat-Test): $p < 0,001$;

AZZK = Azinuszellkarzinom, ADZK = Adenoid-zystisches Karzinom;

MEK = Mukoepidermoidkarzinom; SGK = Speicheldrangkarzinom; AKNOS = Adenokarzinom NOS;

PEK = Plattenepithelkarzinom; MYEK = Myoepitheliales Karzinom

4.3.1 Tumorentitäten, Geschlecht und Alter

Die beste Prognose konnte Patienten mit Azinuszellkarzinomen zugesprochen werden (5-J-TSÜ = 96,9%), gefolgt von den Raten für polymorphe niedrig-maligne Karzinome (87,5%) und Mukoepidermoidkarzinome (83,2%). Die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit hatten hingegen Patienten mit Speicheldrangkarzinomen (59,1%) oder Adenokarzinomen NOS (59,0%) ($p < 0,001$) (Abb. 23). Bezüglich des Geschlechts traten keine signifikanten Unterschiede auf. Lag der Diagnosezeitpunkt bei maximal 70 Jahren ($n = 202$), konnte von einem 5-J-TSÜ von 84,7% ausgegangen werden. Für Patienten, die älter als 70 Jahre alt waren ($n = 122$), ergab sich eine Rate von 56,8% ($p < 0,001$; Abb. 24).

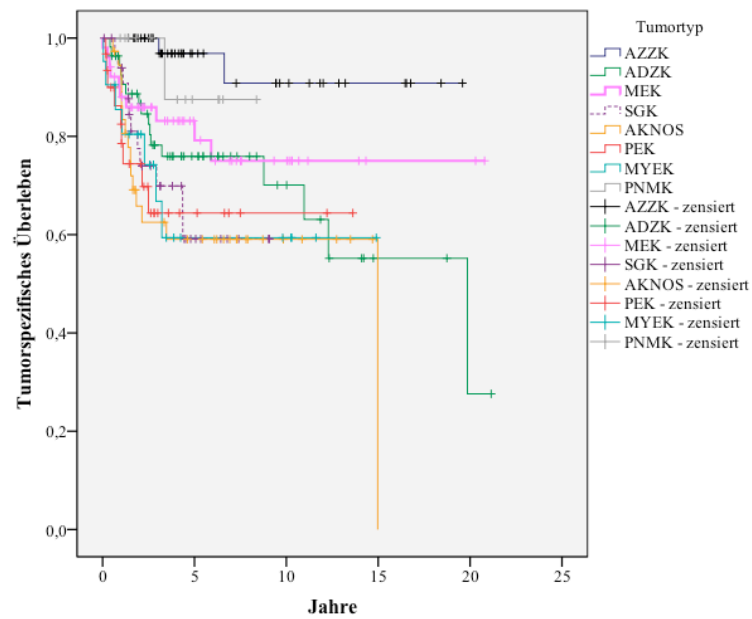


Abb. 23: Überlebensprognosen der im vorliegenden Kollektiv häufigsten Entitäten

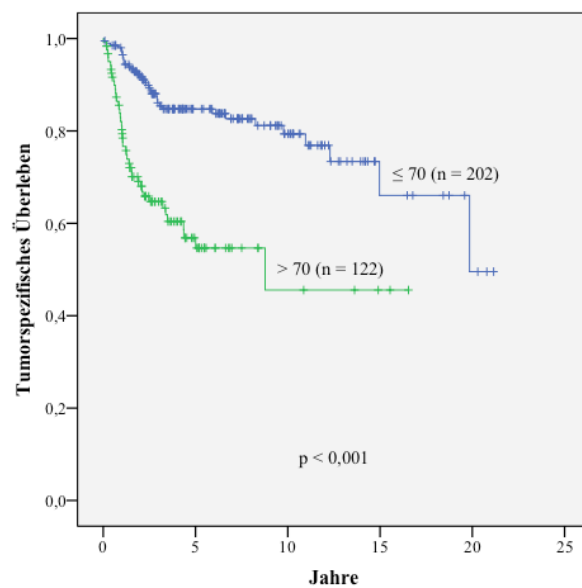


Abb. 24: Altersabhängiges Überleben

4.3.2 Lokalisation

Bezüglich der Lokalisation waren Karzinome der kleinen Speicheldrüsen ($n = 47$) mit einem 5-J-TSÜ von 90,3% vergesellschaftet. Für Tumoren der Gl. submandibularis ($n = 46$) lag dieses bei 73,5% und für Neoplasien der Gl. parotis ($n = 229$) bei 71,6%. Die beiden

Karzinome mit Lokalisation in der Gl. sublingualis schieden nach weniger als fünf Jahren aus der Beobachtung aus ($p = 0,131$; Abb. 25).

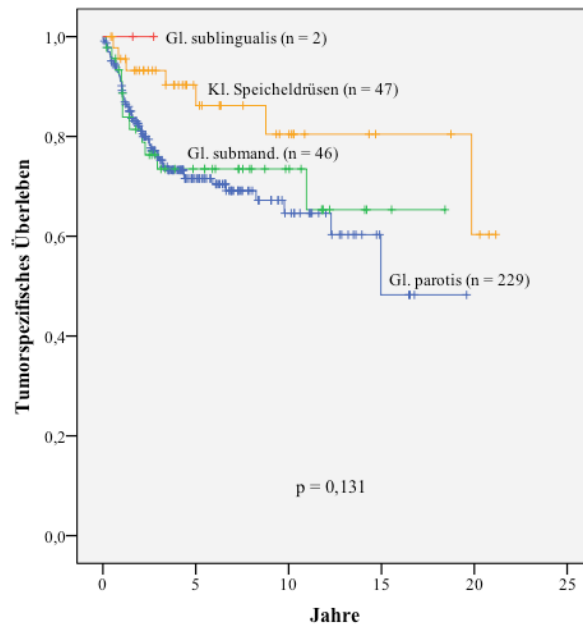


Abb. 25: Überleben und Tumorlokalisation

4.3.3 Grading

Im Grading zeigten gut differenzierte (G1, $n = 105$) Tumoren ein 5-J-TSÜ von 96,2%, wohingegen dieses bei G2- ($n = 54$) auf 85,6% und G3-Malignomen ($n = 165$) auf 57,0% sank. Die Überlebensprognose für schlecht differenzierte Neoplasien lag nach 15 Jahren bei 29,1% ($p < 0,001$; Abb. 26).

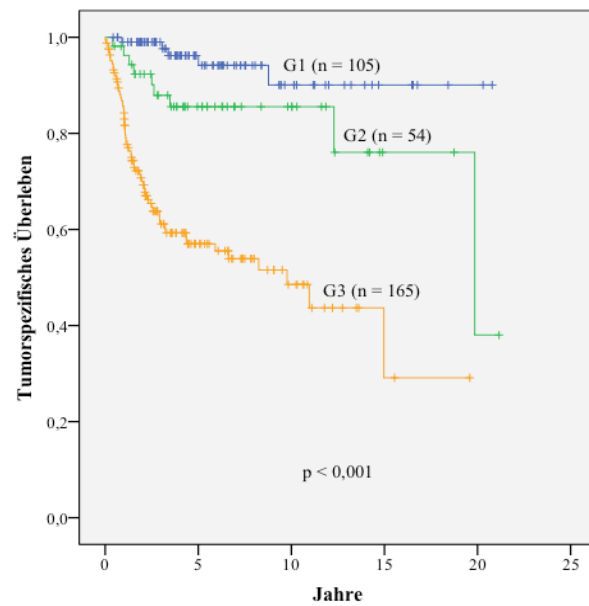


Abb. 26: Überleben und Malignitätsgrad

4.3.4 TNM-Klassifikation und Tumorstadium

Abbildung 27 zeigt das tumorspezifische Überleben in Abhängigkeit der T-Klassifikation. Für T1- und T2-Malignome (n = 188) ergab sich ein 5-J-TSÜ von 86,2%, wohingegen dieses für T3- und T4-Karzinome (n = 131) nach fünf Jahren bei 57,5% und nach zehn Jahren bei 48,3% einzuordnen war ($p < 0,001$).

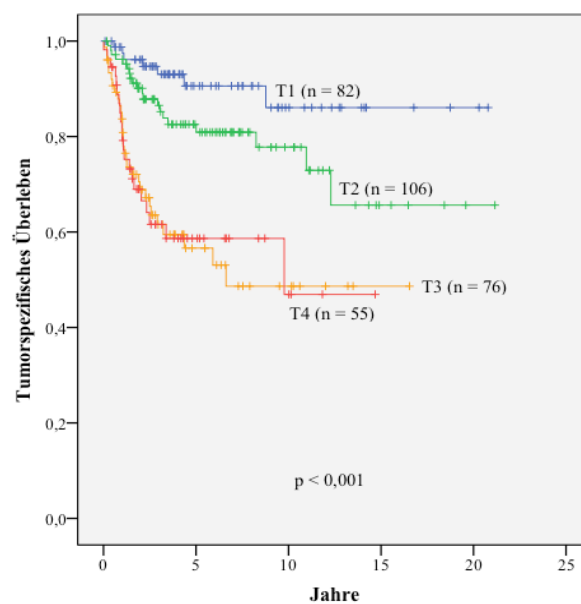


Abb. 27: Überleben und T-Status

Hinsichtlich des Lymphknotenstatus gingen nicht metastasierte Malignome ($n = 217$) mit einem 5-J-TSÜ von 85,0% einher. Demgegenüber verringerte sich dieses für N1-Tumoren ($n = 37$) auf 76,2% und für Tumoren mit einem N2-/N3-Status ($n = 62$) auf 37,2% ($p < 0,001$; Abb. 28). Denjenigen Tumoren, die nicht mit Fernmetastasen vergesellschaftet waren ($n = 288$), konnte ein 5-J-TSÜ von 80,9% zugerechnet werden. Gegenläufig dazu minimierte sich selbiges für diejenigen mit Fernmetastasen ($n = 33$) auf 26,0% ($p < 0,001$; Abb. 29).

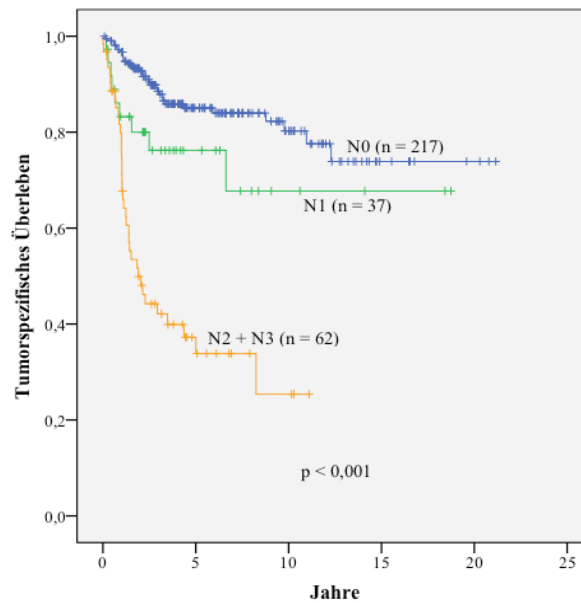


Abb. 28: Überleben und Nodalstatus

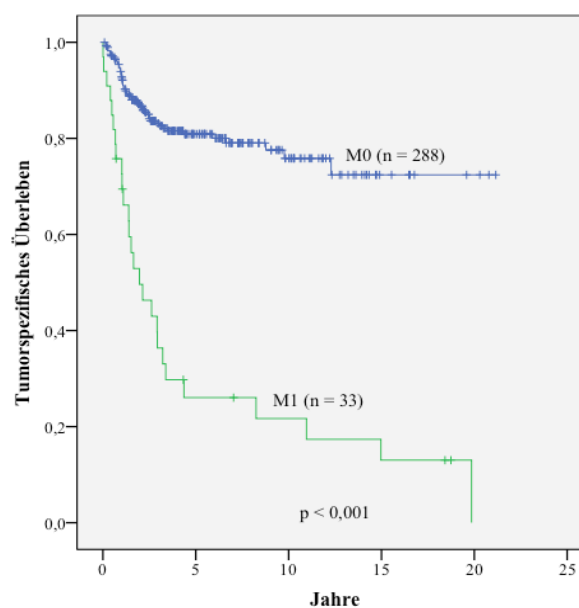


Abb. 29: Überleben und Fernmetastasierung

Signifikante Zusammenhänge ergaben sich ebenfalls im Hinblick auf die Tumorstadien (Abb. 30). Patienten im Stadium I ($n = 71$) hatten ein 5-J-TSÜ von 92,3%, diejenigen im Stadium II ($n = 73$) eine Fünfjahres-Prognose von 89,9%. Diese Rate verschlechterte sich für Stadium-III-Neoplasien ($n = 68$) auf 77,2% und für Stadium IV ($n = 110$) auf 50,8%. Für letztere Patientengruppe lag das Überleben nach 20 Jahren bei 0,0% ($p < 0,001$).

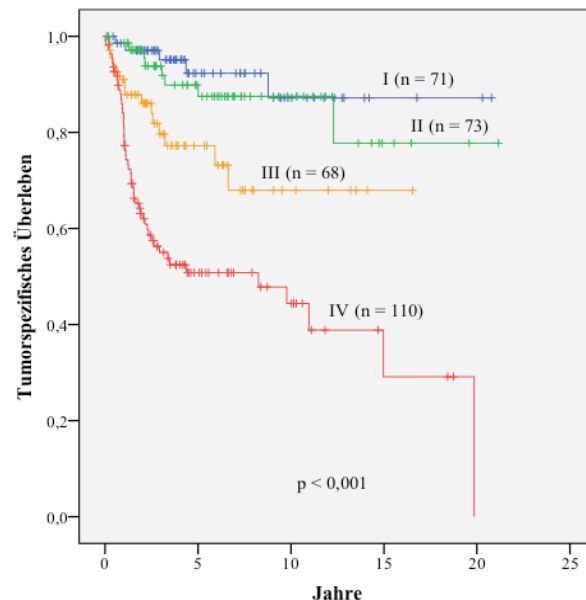


Abb. 30: Überleben und Tumorstadien (UICC)

4.3.5 Therapie und Resektionsstatus

Patienten, die ausschließlich chirurgisch therapiert wurden ($n = 132$), wiesen ein 5-J-TSÜ von 86,6% auf. Für diejenigen, die zusätzlich eine Radiatio/Radiochemotherapie erhielten ($n = 190$), ergab sich eine Rate von 68,1%. Zu einer drastischen Prognosesenkung kam es bei einer primären Radiatio/Radiochemotherapie bzw. beim Ausbleiben jeglicher Therapieformen ($p < 0,001$; Abb. 31).

War ein Residualtumor vorhanden ($n = 73$), lag das 5-J-TSÜ bei 46,3%, während bei Resektion im Gesunden ($n = 248$) eine Rate von 83,4% zu verzeichnen war. Mikroskopisch nachweisbare Residualtumoren ($n = 53$) ließen eine Fünfjahresprognose von 60,6%, makroskopische ($n = 20$) eine solche von lediglich 6,7% erkennen ($p < 0,001$; Abb. 32).

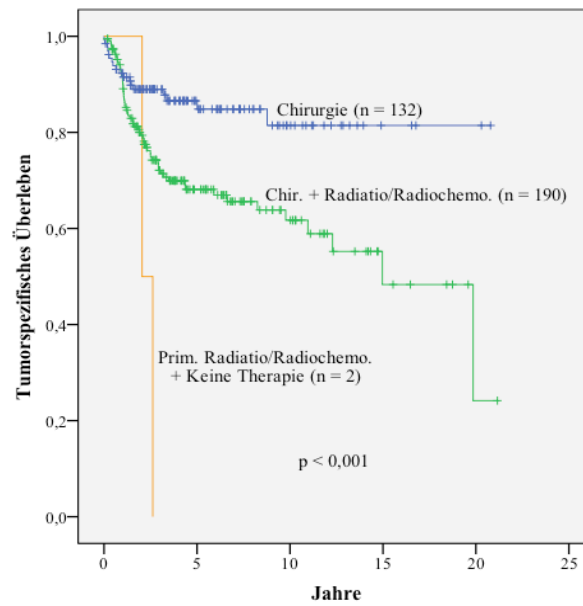


Abb. 31: Überleben und Therapieformen

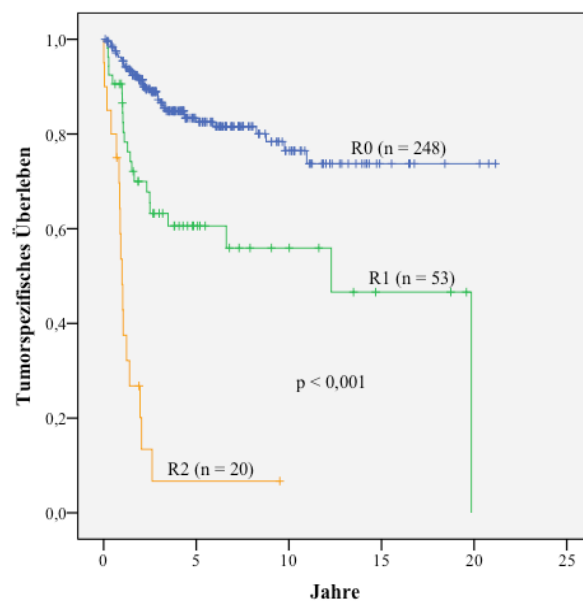


Abb. 32: Überleben und Residualtumor

4.3.6 Rezidive

Für Tumoren ohne Rezidiventwicklung ($n = 229$) zeigte sich ein 5-J-TSÜ von 90,2%, für diejenigen mit einem Rezidiv ($n = 81$) eines von 48,9% ($p < 0,001$; Abb. 33).

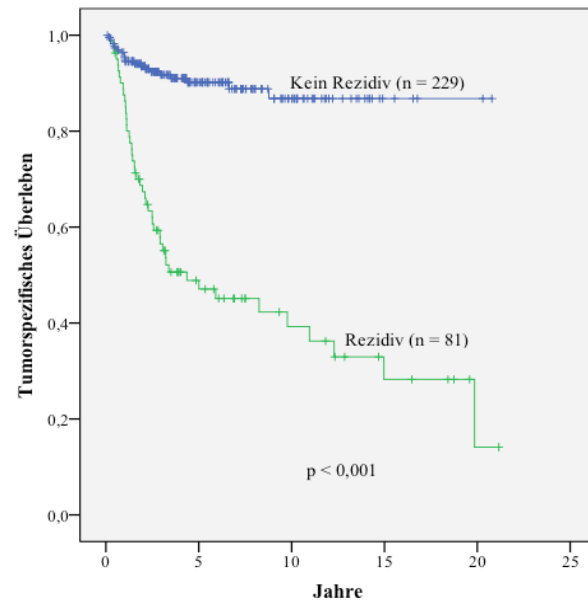


Abb. 33: Überleben und Rezidiventwicklung

4.4 Univariate Überlebensanalyse: Genstatus

4.4.1 PTEN

Auch im Hinblick auf den PTEN-Genstatus ließen sich signifikante Assoziationen nachweisen: Ergab sich für Disomien ($n = 180$) ein 5-J-TSÜ von 81,2%, so verringerte sich dieses für Tumoren mit einer PTEN-Deletion ($n = 52$) auf 43,6%. Dabei waren hemizygote Genverluste ($n = 35$) mit einer Fünfjahresprognose von 46,2% und homozygote Genverluste ($n = 17$) mit einer Quote von 36,1% assoziiert ($p < 0,001$; Abb. 34).

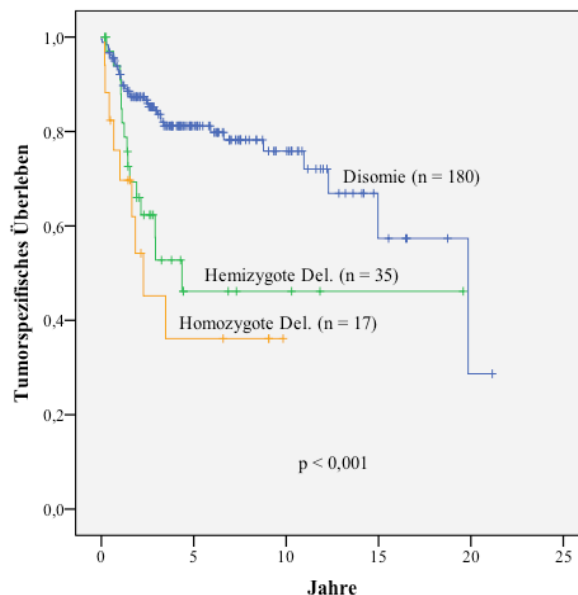


Abb. 34: Überleben und PTEN-Genstatus

4.4.2 c-Met

Hinsichtlich der Analyse von c-Met konnten signifikante Zusammenhänge bezüglich des Vorliegens von Disomien oder Aberrationen nachgewiesen werden. Tumoren, welche eine Disomie von c-Met aufwiesen ($n = 144$), präsentierten ein 5-J-TSÜ von 85,5%. Bei Karzinomen mit einer Aberration von c-Met ($n = 89$) verminderte sich die Prognose auf 60,0% ($p < 0,001$). Nach Aufspaltung der einzelnen Aberrationen fiel in besonderem Maße die schlechte Fünfjahresprognose für hohe Polysomien ($n = 27$) mit 55,7% und Deletionen ($n = 18$) mit 50,1% auf ($p < 0,001$; Abb. 35 und 36).

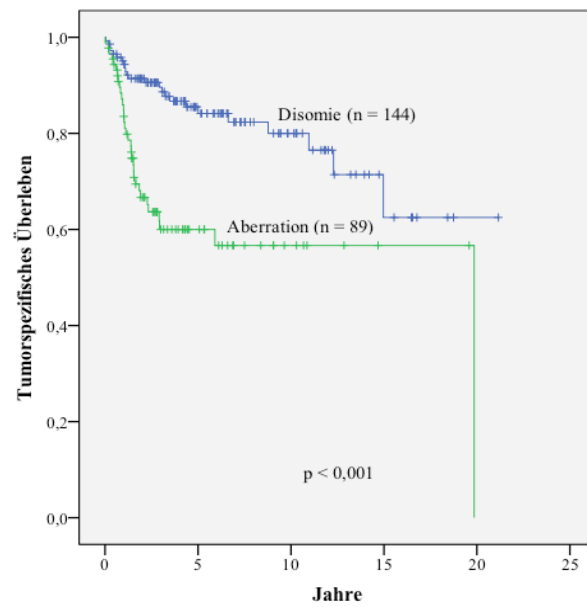


Abb. 35: Überleben und c-Met-Genstatus: Disomien vs. Aberrationen

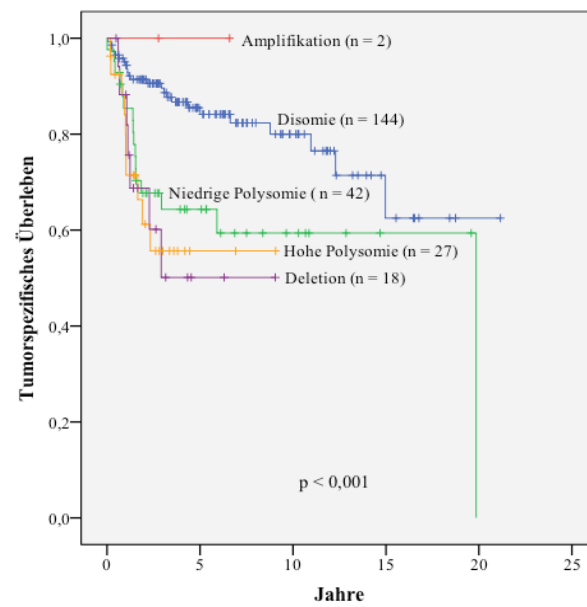


Abb. 36: Überleben und c-Met-Genstatus

4.5 Multivariate Überlebensanalyse

Tab. 20: Multivariate Zusammenhänge

| Parameter | Codierung | Signifikanz | Odds Ratio (95% KI) |
|----------------------|---------------------------------|-------------|------------------------|
| Alter | ≤ 70 J. vs. > 70 J. | 0,12 | 1,619 (0,876 – 2,992) |
| Grading | G1 + G2 vs. G3 + G4 | 0,001 | 4,785 (1,850 – 12,377) |
| T-Status | T1 + T2 vs. T3 + T4 | 0,038 | 2,085 (1,040 – 4,182) |
| N-Status | N0 vs. N1 + N2 + N3 | 0,006 | 2,503 (1,307 – 4,796) |
| Residualtumor | R0 vs. R1 + R2 | 0,002 | 2,460 (1,374 – 4,402) |
| PTEN-Status | Deletion vs. keine Deletion | 0,014 | 2,181 (1,168 – 4,071) |
| c-Met-Status | Aberration vs. keine Aberration | 0,631 | 0,851 (0,440 – 1,644) |

KI = Konfidenzintervall

In der multivariaten Analyse (Einschlussverfahren) erwies sich ein hoher Malignitätsgrad (G3) als schlechtester unabhängiger Prognosefaktor mit einem etwa 4,8 mal höheren Risiko, am Tumorleiden zu versterben ($p = 0,001$).

In, nach Signifikanzniveau, absteigender Reihenfolge wurde das Überleben des Weiteren durch einen tumorpositiven Resektionsrand (R1 oder R2; $p = 0,002$), Lymphknotenmetastasen ($p = 0,006$), PTEN-Deletionen ($p = 0,014$) und eine fortgeschrittene Größe des Primärtumors ($p = 0,038$) negativ beeinflusst.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Tumorentitäten und Fallzahl

Dadurch, dass gewisse Entitäten der ohnehin seltenen Speicheldrüsenmalignome sowohl in aktuellen Studien als auch im vorliegenden Kollektiv mit einer sehr geringen Fallzahl auftreten, müssen in der Literatur angegebene Werte sowie die Ergebnisse der eigenen Studie bezüglich ihrer Validität kritisch untersucht werden.

Viele Arbeiten, die sich mit Neoplasien der Speicheldrüsen beschäftigen, widmen sich ausschließlich einer der häufigeren Entitäten, wie z. B. dem adenoid-zystischen Karzinom [Godge et al., 2012; Min et al., 2012] oder dem Mukoepidermoidkarzinom [McHugh et al., 2012; Gong et al., 2012]. Daneben gibt es Studien, wie beispielsweise die von SUZUKI ET AL., die zwar ein mehrere Entitäten umfassendes Kollektiv bearbeiten, jedoch eine geringe Fallzahl (47 Patienten) aufweisen [SUZUKI et al., 2012]. Repräsentative Zahlen liefern Arbeiten wie z. B. von FONSECA ET AL., die Daten aus mehreren Zentren erhoben und eine klinisch-pathologische Analyse von 493 Patientenfällen in Südbrasilien durchführten [Fonseca et al., 2012].

Die Patientendaten des eigenen Kollektivs wurden ebenfalls multizentrisch gewonnen, wodurch sich eine aussagekräftige Fallzahl ergab ($n = 324$). Insgesamt traten 15 von 24 durch die WHO festgelegten histologischen Subtypen auf [Barnes et al., 2005]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich einerseits mit dem Gesamtkollektiv, andererseits mit dessen acht häufigsten Entitäten. Diese traten mit einer Fallzahl von maximal 55 (adenoid-zystisches Karzinom) bis minimal 13 (polymorphes niedrig-malignes Karzinom) auf und wurden, falls notwendig, bezüglich der verschiedenen Untersuchungsparameter jeweils gesondert ausgewertet, während die restlichen sieben Entitäten mit maximal 10 (onkozytäres Karzinom) und minimal 2 Patienten (großzelliges Karzinom) zu einer Restgruppe (11,4% des Gesamtkollektivs) zusammengefasst und gemeinsam analysiert wurden.

Die, wie bereits erwähnt, hohe Anzahl an histologischen Subtypen erschwert dem Pathologen bisweilen die eindeutige Zuordnung zu einer der verschiedenen Tumorentitäten. Im Hinblick darauf war es eine grundlegende Überlegung und ein vorrangiges Ziel dieser Untersuchung, mit Hilfe der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung genetische Analysen zu unternehmen, die die histologische Typisierung unterstützen, darüber hinaus jedoch eine enti-

tätenunabhängige prognostische Aussage erlauben.

5.1.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Für die in situ Hybridisierung kamen ursprünglich radioaktiv markierte Sonden zum Einsatz. Durch die Schwierigkeiten, die sich aufgrund strenger Bestimmungen im Bezug auf die Handhabung radioaktiver Substanzen, langer Strahlenexpositionszeiten und aufwendiger technischer Durchführung ergaben, waren der Anwendung dieser Sonden Grenzen gesetzt. Der Gebrauch von fluoreszenzmarkierten Gensonden bietet indes den Vorteil einer wesentlich leichteren Handhabung und größeren Effektivität, weshalb die Verwendung von radioaktiven Substanzen aus heutiger Sicht obsolet erscheint [Kearney und Shipley, 2012]. Als nachteilig zu wertende Aspekte können angefügt werden, dass es sich bei der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung zum einen um eine sehr teure Methode handelt und sich die Auswertung während der eigenen Untersuchung, insbesondere bei Kernüberlagerungen oder Split-Signalen, bisweilen als schwierig erwies.

5.1.3 Tissue Microarray

Gegenüber dem arbeits- und kostenintensiven konventionellen Verfahren der separaten Untersuchung einzelner Gewebeschnitte ermöglicht die Methode der Tissue Microarrays (TMAs) die Darstellung eines umfangreichen Kollektivs auf einem einzigen Objektträger. Somit können jegliche Formen der in situ-Analyse, z. B. die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung, Immunhistochemie, DNA-Ploidie oder Kern-Morphometrie für alle Gewebeproben in einem Durchlauf erfolgen [Paiva-Fonseca et al., 2012; Kononen et al., 1998].

Bedingt durch die bisweilen sehr kleinen Stanzendurchmesser (etwa 0,6 mm) sollte die Repräsentativität der einzelnen Tumorproben allerdings kritisch hinterfragt werden. So ist es in Praxi nicht auszuschließen, dass bei heterogenem Gewebe bestimmte Areale nicht erfasst werden. Dennoch können diese Kritikpunkte dadurch entschärft werden, dass der Nutzen der TMAs eben nicht in der Begutachtung individueller Biopsien, sondern in der Reihenuntersuchung ganzer Tumorphpopulationen liegt [Moch et al., 2001]. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit Stenzen mit einem Durchmesser von 2 mm verwendet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Deskriptive Analyse: Klinisch-pathologische Parameter

5.2.1.1 Tumorhistologie

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 324 Fälle, die durch histopathologische Untersuchung 15 verschiedenen Entitäten zugeordnet wurden. Drei Karzinome mit rhabdoidem Wachstumsmuster konnten keinem von der WHO definierten Tumortyp zugeteilt werden und wurden deshalb in die Kategorie des onkozytären Karzinoms eingegliedert.

Das adenoid-zystische Karzinom trat mit 17% im vorliegenden Kollektiv zwar am häufigsten, im Vergleich zu üblichen Werten (20%) jedoch leicht verringert auf. Auch das Mucoepidermoidkarzinom, laut PEEL UND SEETHALA das zahlreichste Speicheldrüsenmalignom (30%), machte im eigenen Kollektiv nur 15,7% aus [Peel und Seethala, 2007].

Das Azinuszellkarzinom lag mit 13,6% im mittleren Bereich des von DI PALMA ET AL. publizierten Anteils von 12-17% [Di Palma et al., 2006] und auch die Quote der Speicheldrüsengangkarzinome in der vorliegenden Arbeit (10,8%) entsprach in etwa dem von BRANDWEIN-GENSLER ET AL. angegebenen Wert von 9% [Brandwein-Gensler et al., 2005].

Das Adenokarzinom NOS trat mit 11,4% seltener auf als in der Literatur beschrieben (17%). Bei dieser Entität muss allerdings berücksichtigt werden, dass dessen Quote in der Vergangenheit höher beziffert wurde und Fälle beinhaltete, die aus heutiger Sicht passender in eine der spezifischeren Untergruppen, wie z. B. in die Kategorien Speicheldrüsengangkarzinom oder polymorphes niedrig-malignes Adenokarzinom, eingeteilt werden sollten [Auclair und Van der Wal, 2005].

Zu stärkeren Abweichungen kam es beim myoepithelialen Karzinom, das regulär 0,2% aller Speicheldrüsentumoren ausmacht und im untersuchten Patientenstamm mit 6,5% vertreten war [Peel und Seethala, 2007], sowie beim Plattenepithelkarzinom, dessen Häufigkeit von der WHO unter 1% beschrieben wird, im vorliegenden Kollektiv jedoch mit einem Anteil von 9,6% auftrat [Lewis und Olsen, 2005]. Bei der Diagnose eines primären Plattenepithelkarzinoms der Speicheldrüsen sollte generell an eine Metastase, z. B. eines Plattenepithelkarzinoms der Haut, gedacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Fälle erst dann als primäre Plattenepithelkarzinome deklariert, wenn ein Primarius alio loco mit Hilfe von Staging-Untersuchungen (inklusive CT-Hals, Röntgen-Thorax, gegebenen-

falls PET-CT) ausgeschlossen werden konnte.

5.2.1.2 Lokalisation, Geschlechts- und Altersverteilung

Im vorliegenden Patientenkollektiv waren 70,7% der Tumoren in der Gl. parotidea, 14,2% in der Gl. submandibularis, 14,5% in den kleinen Speicheldrüsen und 0,6% in der Gl. sublingualis lokalisiert. In etwa übereinstimmende Werte gibt die WHO für Parotistumoren (64-80%), Malignome der kleinen Speicheldrüsen (9-23%) und der Gl. sublingualis (1%) an, wohingegen üblicherweise nur 7-11% Tumoren in der Gl. submandibularis auftreten [Eveson et al., 2005].

Bezüglich der einzelnen Tumorentitäten kam es beim Speichelgangkarzinom zu Abweichungen, das in der Literatur zu 78% in der Parotis, zu 12% in der Gl. submandibularis und zu 10% in den kleinen Speicheldrüsen lokalisiert ist [Peel und Seethala, 2007]. In der eigenen Studie kamen die Anteile für Parotismalignome und Tumoren der Gl. submandibularis diesen Werten nahe, allerdings fanden sich nur 2,9% der Speichelgangkarzinome in den kleinen Speicheldrüsen.

Laut LEWIS UND OLSEN sind 80% der Plattenepithelkarzinome in der Gl. parotis und 20% in der Gl. submandibularis lokalisiert [Lewis und Olsen, 2005]. Im eigenen Patientengut zeigten sich mit Quoten über 96,8% (Gl. parotidea) und 3,2% (Gl. submandibularis) geringe Differenzen.

Die Geschlechtsverteilung betreffend bestätigte sich die in der Literatur beschriebene leicht höhere Erkrankungsrate für Frauen [Eveson et al., 2005], die im untersuchten Kollektiv einen Anteil von 52,8% einnahmen. Auffälligkeiten zeigten sich beim Speichelgangkarzinom: Im Vergleich zu DI PALMA ET AL., die von einem Überwiegen des männlichen Geschlechts im Verhältnis von 3 : 1 ausgehen [Di Palma et al., 2006] und zur WHO, die dieses mit 4 : 1 angeben [Brandwein-Gensler et al., 2005], waren im vorliegenden Kollektiv Männer nur in geringem Maße öfters betroffen (54,3%).

Im Hinblick auf das adenoid-zystische Karzinom berichten einige Studien, dass Frauen etwas öfters betroffen sind, andere gehen hingegen von einem ausgeglichenen Geschlechtsverhältnis oder sogar von einer erhöhten männlichen Quote aus [Peel und Seethala, 2007]. In der eigenen Untersuchung fanden sich mehr als doppelt so viele adenoid-zystische Karzinome bei Frauen als bei Männern.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag in dieser Studie mit 60,8 Jahren etwa im Be-

reich anderer größerer Kollektive, z. B. des *Dänischen Krebsregisters* mit 952 Speicheldrüsenkarzinomen, welches ein Durchschnittsalter von 62 Jahren angibt [Bjørndal et al., 2011].

5.2.1.3 Grading

Die Aussagekraft und Bedeutung des Gradings wird in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert. SEETHALA gibt an, die Tumorgraduierung sei nicht immer notwendig, da einige Tumoren, wie z. B. das Speicheldrangkarzinom, üblicherweise mit hoher Malignität einhergehen, während andere, beispielsweise das polymorphe niedrig-maligne Karzinom, in der Regel als gering maligne zu werten sind. Allerdings ergeben sich diverse Schwierigkeiten, da es sowohl high-grade Varianten der ursprünglich niedrig-malignen Neoplasien als auch low-grade Modifikationen von typischerweise hoch-malignen Tumoren gibt [Seethala, 2009].

SCHWARZ-FURLAN betont indes den großen Stellenwert des Gradings, da die alleinige Diagnose einer bestimmten Tumorentität häufig nicht ausreiche, um die Karzinome einerseits untereinander vergleichen und andererseits adäquate (postoperative) Therapieentscheidungen sowie prognostische Aussagen treffen zu können. Ferner stelle das Grading einen entitätsübergreifenden Parameter dar [Schwarz-Furlan, 2011].

Generell besteht in der Literatur keine Übereinstimmung, ob ein zwei- (*low-grade, high-grade*) oder dreigeteiltes Graduierungssystem (*low-, intermediate-, high-grade*) zur Anwendung kommen sollte. Das eigene Patientengut wurde mit Hilfe eines dreigliedrigen Systems, modifiziert nach THERKILDTSEN ET AL., analysiert [Therkildsen et al., 1998]. Insgesamt wurde bei 50,9% der Tumoren ein G3-Stadium diagnostiziert, was dem von MAHMOOD ET AL. für ein Kollektiv von 2170 Patienten angegebenen Anteil von 51,0% entspricht [Mahmood et al., 2011]. Das ermittelte Ergebnis, dass 29,5% der G1-, jedoch 52,1% der G3-Malignome mit größeren Primärtumoren (T3/T4) sowie nur 14,4% der G1- im Vergleich zu 47,5% der G3-Tumoren mit Lymphknotenmetastasen einhergingen, bestätigte die von SEETHALA beschriebenen Korrelationen zwischen dem Malignitätsgrad, der Tumorgröße sowie einer Lymphknotenmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose [Seethala, 2011].

Für das adenoid-zystische Karzinom liegen unterschiedliche Graduierungsmuster vor. Während LÖNING UND JÄKEL tubuläre, kribriforme oder solide Wachstumsmuster in

ein entsprechend dreigeteiltes System eingliedern [Löning and Jäkel, 2004], sind laut SCHWARZ-FURLAN sowohl tubuläre als auch kribriforme Tumoren in der G2-Gruppe einzuordnen [Schwarz-Furlan, 2011]. Im eigenen Kollektiv erfolgte eine Dreiteilung mit Überwiegen des G2-Stadiums mit 69,1%.

In den Patientengruppen z. B. des *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) oder des *Hamburger Speicheldrüsenregisters* sind mehr als zwei Drittel der Mukoepidermoidkarzinome im G1-Stadium anzusiedeln, wohingegen diese Rate in der vorliegenden Arbeit bei lediglich 58,8% lag [Löning and Jäkel, 2004].

86,4% der Azinuszellkarzinome waren gut differenziert. Auch SEETHALA beschreibt, dass diese Tumoren typischerweise mit einem niedrigen Malignitätsgrad vergesellschaftet sind, in vielen Studien jedoch auffällig häufig mit Lymphknotenmetastasen einhergehen [Seethala, 2011]. Diese Aussage konnte allerdings im eigenen Kollektiv nicht bestätigt werden, da 93,0% mit einem N0-Status kombiniert waren.

Karzinome, entstanden in pleomorphen Adenomen, wurden in der Vergangenheit häufig als eigene Entität eingestuft, der zumeist ein hoher Malignitätsgrad zugeteilt wurde. Die histologische Komponente entspricht tatsächlich häufig einem schlecht differenzierten Adenokarzinom (Speichelgangkarzinom bzw. Adenokarzinom NOS), jedoch gibt es auch niedrig- oder mäßig-maligne Karzinome wie z. B. low-grade Mukoepidermoid- oder myoepitheliale Karzinome, die in einem pleomorphen Adenom entstehen können und somit eine weitaus bessere Prognose besitzen. Aus diesem Grund wurden die Karzinome in pleomorphen Adenomen in der vorliegenden Arbeit – entsprechend den Empfehlungen der aktuellen Literatur – gemäß der jeweiligen Subtypen eingeteilt und graduiert [Gnepp et al., 2005; Schwarz-Furlan, 2011]. Das eigene Patientengut beinhaltete fünf Patienten mit einem primären malignen Misch tumor, die allesamt eine geringe Differenzierung (G3) aufwiesen.

Generell lag für G3-Malignome ein signifikant höheres Risiko für Lymphknotenmetastasen vor als für Tumoren im G2- oder G1-Stadium (47,5% versus 18,0% bzw. 14,4%), was in etwa den von GILLESPIE ET AL. angegebenen Werten entspricht (G1: Lymphknotenmetastasen zu < 15%; G2: 15 - 30%; G3: > 30%) [Gillespie et al., 2012].

5.2.1.4 TNM-Klassifikation

Hinsichtlich der Verteilung der T-Stadien im Gesamtkollektiv fanden sich Übereinstim-

mungen sowie Abweichungen im Vergleich zu aktuellen Studien [Liang et al., 2012; Piao et al., 2012; McHugh et al., 2012].

Ein hohes T-Stadium war signifikant häufig mit einem positiven Nodalstatus vergesellschaftet, was durch Literaturangaben gestützt wird [Wang et al., 2012]: Bei T1-/T2-Tumoren kam es in 23,4% der Fälle zu tumorpositiven Lymphknoten, für T3-/T4-Malignome erhöhte sich diese Rate auf 44,5%.

Insgesamt konnte bei 31,3% der Patienten ein positiver Lymphknotenstatus festgestellt werden, was den Werten vergleichbarer Studien entspricht (30,3%) [Schwarz et al., 2008]. Bei genauerer Analyse der einzelnen Entitäten zeigten sich allerdings Differenzen zu anderen Studien: Die in der vorliegenden Studie ermittelte hohe lymphogene Metastasierungsrate der Speicheldrüsenkarzinome (71,4%) lag etwas über den in der Literatur angegebenen Werten (51-59%) [Barnes et al., 1994; Jaehne et al., 2005; Piao et al., 2012]. Auch beim Mukoepidermoidkarzinom, das zu 25,5% mit einem positiven N-Status einherging, als auch beim adenoid-zystischen Karzinom, welches in 18,0% der Fälle zu Lymphknotenmetastasen führte, zeigten sich geringgradige Unterschiede (16,7% bzw. 10,1%) [Kokemüller et al., 2004; Min et al., 2012]. LIN ET AL. konnten in einer Analyse von 25 Patienten mit Azinuszellkarzinomen keinen positiven Nodalstatus feststellen [Lin et al., 2010]. Im eigenen Kollektiv traten hingegen 7,0% dieser Tumoren in Kombination mit Lymphknotenmetastasen auf.

Wie bereits unter Punkt 5.2.1.3 beschrieben, kam es in Übereinstimmung zu Angaben von FEINSTEIN ET AL. auch im eigenen Kollektiv zu Assoziationen zwischen einem fortgeschrittenen Malignitätsgrad und der Präsenz eines positiven Lymphknotenstatus [Feinstein et al., 2011].

Zu Fernmetastasierungen kam es in 10,3% der Fälle, was in etwa der von YU UND MA ermittelten Quote (11,1%) entspricht [Yu und Ma, 1987].

5.2.1.5 Therapie und Residualtumor

Bei 99,4% der Patienten wurde eine chirurgische Therapie durchgeführt, bei 92,3% in kurativer Intention. 72,7% der Patienten erhielten eine Neck Dissection.

Die Notwendigkeit einer Lymphadenektomie basiert zunächst auf der Präsenz klinisch oder radiologisch nachweisbarer tumorpositiver Lymphknoten (therapeutische Neck Dissection). Als schwierig erweist sich die Frage, wann eine chirurgische Lymphknotenthera-

pie durchgeführt werden soll, wenn präoperativ keine auffälligen Lymphknoten darstellbar sind (elektive Neck Dissection). Bisher gelten in der Literatur eine fortgeschrittene Tumorgroße sowie ein hoher Malignitätsgrad als Indikatoren für eine notwendige Neck Dissection bei Speicheldrüsenkarzinomen [Armstrong et al., 1992; Ettl et al., 2012b]. Bezüglich der Tumorlokalisation gehen 35-62% der high-grade Neoplasien der Parotis und 40% derjenigen der kleinen Speicheldrüsen mit einem positiven N-Status einher. Dagegen liegt die Rate der Lymphknotenmetastasierung für low-grade Tumoren der großen und kleinen Speicheldrüsen bei lediglich 0-15% [Ettl et al., 2012b]. Da es in der Literatur Hinweise gibt, dass bei einem Parotis-Malignom sogenannte zervikale Skip-Metastasen (Metastasierungen in Level IV oder V, während Level I-III metastasenfrei sind) auftreten können, scheint gerade bei Parotiskarzinomen mit schlechter Differenzierung eine Lymphknotenausräumung der Level I bis V indiziert [Ettl et al., 2012b]. So wurde auch im eigenen Kollektiv bei 81,7% aller G3-Malignome eine Lymphadenektomie durchgeführt.

Im Vergleich zu Literaturangaben konnte bezüglich des R-Status ein relativ erfolgreiches Ergebnis erzielt werden: 77,3% der Tumoren wurden im Gesunden entfernt. In 16,5% der Fälle lag ein R1-, in 6,2% der Fälle ein R2-Status vor. THERKILDSSEN ET AL. geben indes Werte über 43,4%, 27,1% bzw. 10,8% an [Therkildsen et al., 1998]. Begründbar durch die erschwerten Möglichkeiten einer radikalen Tumorentfernung ließen sich bei fortgeschrittenen Stadien (III oder IV) etwa dreimal häufiger tumorpositive Resektionsränder als bei Stadium I oder II nachweisen. Zudem wurden vorhandene Fernmetastasen als R2-Status definiert.

Patienten mit Tumoren höherer Stadien (III oder IV) erhielten zu 73,7% und somit signifikant häufiger als diejenigen im Stadium I oder II eine adjuvante Radiatio oder Radiochemotherapie. Dieser Wert ist deckungsgleich mit zahlreichen in der Literatur genannten Angaben zur Anwendung adjuvanter Therapieformen bei fortgeschrittenem Gesamtstadium oder aggressivem Tumorverhalten [McHugh et al., 2012; Min et al., 2012].

5.2.1.6 Rezidive

Insgesamt kam es bei 26,1% der Patienten zu einem Rezidiv, was im mittleren Bereich der von LIMA ET AL. (16,7%) und THERKILDSSEN ET AL. (40,7%) ermittelten Werte liegt [Lima et al., 2005; Therkildsen et al., 1998]. Andere Literaturangaben divergieren in Abhängigkeit des ausgewerteten Kollektivs zwischen 15-80%, innerhalb von fünf Jahren lo-

koregional oder an entfernter Stelle ein Rezidiv zu entwickeln [Gillespie et al., 2012]: Die Rezidivbildungsrate beim adenoid-zystischen Karzinom wird mit 16-85% angegeben [El-Naggar und Huvos 2005]. Im vorliegenden Patientenkollektiv trat bei 20 von 52 Patienten mit einem adenoid-zystischen Karzinom (38,5%) ein Rezidiv auf.

Bei den Azinuszellkarzinomen kommt es in der Literatur zu 10-35% zu Rezidiven [Peel und Seethala, 2007], für die eigenen Patienten ergab sich eine Rate von 20,5%.

Unterhalb des in der Literatur angegebenen Rezidivwertes für Speicheldrüsenkarzinome (33%) [Brandwein-Gensler et al., 2005] lag das ermittelte Ergebnis im eigenen Kollektiv mit 24,2%.

Die Rezidivquote für das polymorphe niedrig-maligne Karzinome (15,4%) bestätigt den von LUNA UND WENIG publizierten Wert (9-17%) [Luna und Wenig, 2005].

LEWIS UND OLSEN beschreiben die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Plattenepithelkarzinomen mit mindestens 50%, in der vorliegenden Arbeit war diese niedriger angesiedelt (31,0%) [Lewis und Olsen, 2005].

Patienten mit Mukoepidermoidkarzinomen entwickelten in 16,3% der Fälle ein Rezidiv, was eine ähnliche Quote zu vergleichbaren Arbeiten ergab (19,4%) [McHugh et al., 2012].

Der, ebenfalls von GILLESPIE ET AL. beschriebene, Einfluss des Tumorstadiums auf das Risiko für eine Rezidivierung verifiziert sich im eigenen Kollektiv [Gillespie et al., 2012]: Während 16,8% der Patienten mit einem Tumorstadium I oder II ein Rezidiv entwickelten, steigerte sich diese Quote für Stadium III und IV auf 34,5%.

5.2.2 Deskriptive Analyse: FISH-Ergebnisse

5.2.2.1 PTEN

Negative Auswirkungen durch PTEN-Genverluste wurden bereits für Prostata- und kolorektale Karzinome sowie Brustkrebs und high-grade Gliome beschrieben [Yoshimoto et al., 2007; Frattini et al., 2007; Fujita et al., 2006; Korshunov et al., 2004].

Anhand von in vivo Studien mit Knockout-PTEN-Mäusen konnte illustriert werden, dass hemizygoten Deletionen und eine dadurch bedingte Haploinsuffizienz des verbliebenen Gens in einer genetischen Instabilität sowie hyper-, dys- oder präneoplastischen Läsionen verschiedener Gewebe resultieren können [Di Cristofano et al., 1998]. Ferner besteht die Annahme, dass homozygote Deletionen durch eine komplette Inaktivierung von PTEN ei-

ne wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen und in besonderem Maße die Entdifferenzierung, das Tumorwachstum und die Metastasierung fördern [Verhagen et al., 2006]. Bei Geweben mit unauffälligem Genzustand (Disomien) lagen in der vorliegenden Arbeit zu 77,5% metastasenfremde Lymphknoten vor, wohingegen 54,3% der Malignome mit hemizygoten und 58,8% mit homozygoten Deletionen in Kombination mit tumorpositiven Lymphknoten auftraten. Zudem verifizierten sich Korrelationen mit den Tumorstadien: 88,2% der Tumoren mit homozygoten Deletionen befanden sich in einem Gesamtstadium III oder IV. Eine weitere Assoziation ergab sich bezüglich des Malignitätsgrads, da nahezu alle Tumoren, die eine homozygote Deletion aufwiesen, histologisch als hochmaligne eingestuft wurden.

SNIETURA ET AL. konnten darüber hinaus in einer Studie Zusammenhänge zwischen einer verringerten PTEN-Expression und dem männlichen Geschlecht feststellen, was in der eigenen Untersuchung allerdings nicht bestätigt werden konnte [Snietura et al., 2012].

5.2.2.2 c-Met

Wie in aktuellen Studien untersucht wird, gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, dass ein verändertes Expressionsmuster des c-Met-Gens eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese zahlreicher Krebsarten, wie z. B. des Pankreas- oder kolorektalen Karzinoms, des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Ovarialkarzinoms oder des Osteosarkoms, spielt [Gardian et al., 2012; Garouniatis et al., 2012; Sgambato et al., 2012; Furuse et al., 2010]. Auch für Speicheldrüsenkarzinome, insbesondere high-grade Malignome, wurden bereits Zusammenhänge diskutiert: Genetische Veränderungen von c-Met scheinen mit einem erhöhten Risiko für invasives Tumorwachstum, lokoregionale Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasierung einherzugehen [Tsukinoki et al., 2004]. Diese Angaben korrelieren größtenteils mit den Ergebnissen der eigenen Analysen: Aberrationen (sowohl Gen-Deletionen als auch Gen-Zugewinne) waren in 56,8% der Fälle mit einem T3- oder T4-Stadium sowie zu 52,9% mit einem positiven Nodalstatus vergesellschaftet. Allerdings konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der Entwicklung von Fernmetastasen aufgezeigt werden.

Im Hinblick auf das Gesamtstadium waren 77,5% der Tumoren mit Genaberrationen in fortgeschrittene Stadien (III oder IV) einzuordnen sowie 75,3% der Tumoren mit genetischer Veränderung schlecht differenziert (G3).

5.2.2.3 PTEN und c-Met

Es liegen einige Studien vor, die sich mit Zusammenhängen zwischen den Genstatus von PTEN und c-Met beschäftigen. Bei Glioblastomen scheint es häufig zu simultanen genetischen Veränderungen beider Gene sowie PTEN-Interaktionen mit c-Met abhängigen Signalwegen zu kommen: So beschreiben LI ET AL. eine durch PTEN-Deletionen verursachte Malignitätssteigerung c-Met induzierter Glioblastome. Im Gegenzug soll durch Wiederherstellung eines regelrechten PTEN-Status eine Hemmung der HGF-induzierten Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Migration und Invasion bewirkt werden [Li et al., 2009]. GOODWIN ET AL. berichten im Hinblick auf therapeutische Konsequenzen, dass der Erfolg einer Unterdrückung des HGF/c-Met Signalwegs in Kombination mit anderen antiproliferativen oder proapoptotischen Substanzen maßgeblich vom PTEN-Genstatus abhängt [Goodwin et al., 2011].

Oben genannte Überschneidungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: Ein regelrechter c-Met-Genstatus ging überwiegend mit Disomien bei PTEN einher (89,3%). PTEN-Genverluste, vor allem homozygote Deletionen, traten in hohem Maße in Kombination mit c-Met-Aberrationen auf (81,3%).

5.2.3 Überleben und Prognose: Klinisch-pathologische Parameter

5.2.3.1 Histologischer Subtyp

Aktuelle Studien geben – bezogen auf ein verschiedene Entitäten umfassendes Patientenkollektiv – ein mittleres 5-J-TSÜ von ca. 85% und ein 10-J-TSÜ von ca. 75% an [Oliveira et al., 2011; Wang et al., 2012]. Eine andere Arbeit mit Malignomen in überwiegend höheren Tumorstadien ergab hierfür ein wesentlich schlechteres 5-J-TSÜ von 59% und 10-J-TSÜ von 49% [Mariano et al., 2011]. Generell kommt es aufgrund der unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen der einzelnen Entitäten zu sehr divergierenden Überlebensraten [Ettl et al., 2012b].

Literaturstellen geben für das Azinuszellkarzinom ein 5-J-TSÜ von 76-89% an [Spiro et al., 1978; Eneroth et al., 1966]. Das 10-Jahresüberleben liegt laut LIN ET AL. bei 88% [Lin et al., 2010]. In der eigenen Untersuchung manifestierte sich das 5-J-TSÜ höher (96,9%), das 10-J-TSÜ entsprach in etwa dem von LIN ET AL. angegebenen Wert

(90,8%), womit dieser Entität insgesamt die beste Prognose zugesprochen werden konnte. Ebenfalls sehr gute 5-Jahres-Überlebensraten präsentierten Patienten mit einem polymorphen niedrig-malignen Karzinom (87,5%). Diese Daten entsprechen den Angaben der Literatur: SEETHALA ET AL. beschreiben für diese Tumoren ein krankheitsfreies Intervall von durchschnittlich 12,8 Jahren [Seethala et al., 2010]. Dennoch kann es – oftmals erst nach vielen Jahren – zu Rezidiven kommen, was die Aufnahme in ein lebenslanges Recall-System obligat macht [Krishnamurthy et al., 2011].

Das 5-J-TSÜ des Mukoepidermoidkarzinoms lag insgesamt bei 83,2%, jedoch sank die Überlebensrate mit zunehmendem Malignitätsgrad, was die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Prognose vom Malignitätsgrad widerspiegelt: So werden Werte zwischen 92-100% für niedrig-maligne und 0-43% für hoch-maligne Tumoren angegeben [Peel und Seethala, 2007].

Das 5-J-TSÜ des adenoid-zystischen Karzinoms wird von LANG ET AL. mit 62,4-88,2%, das 15-J-TSÜ mit nur 5-29% beschrieben [Lang et al., 2005]. Andere Literaturstellen sprechen von einem 5-J-TSÜ von lediglich 35% und einer signifikanten Prognoseverschlechterung bei Fernmetastasierung [El Naggar und Huvos, 2005]. Im vorliegenden Kollektiv lagen diese Überlebensraten nach fünf Jahren bei 75,9% bzw. nach 15 Jahren bei 55,2%, was das besondere Risiko des adenoid-zystischen Karzinoms, selbst noch nach vielen Jahren Rezidive oder Fernmetastasen zu entwickeln, verdeutlicht.

LEWIS UND OLSEN geben für Plattenepithelkarzinome ein 5-J-TSÜ von etwa 25-30% an [Lewis und Olsen, 2005]. Die vorliegende Arbeit ermittelte für diese Tumoren eine vergleichsweise positive Überlebensrate von 64,4%.

SKÁLOVÁ UND JÄKEL berichten, dass von den Patienten mit myoepithelialen Karzinomen, einer Entität mit lokal aggressivem Wachstum und sehr unterschiedlichen Entwicklungsformen, etwa ein Drittel aufgrund seines Tumorleidens verstirbt, ein Drittel Rezidive entwickelt und ein Drittel eine vollständige Genese erfährt [Skálová und Jäkel, 2005]. Andere Studien weisen auf eine Sterblichkeit von 29% nach 32 Monaten hin [Ren et al., 2011]. Im eigenen Kollektiv ergab sich ein 5- und 10-J-TSÜ von konstant 59,4% und damit eine – im Vergleich zu den anderen Entitäten – eher schlechtere Prognose.

PEEL UND SEETHALA berichten über die hohe Sterblichkeit bei Patienten mit Speicheldrangkarzinomen (ca. 66% innerhalb von vier Jahren), die hauptsächlich durch die starke Tendenz zur Fernmetastasierung (Lunge und Knochen) begründet ist [Peel und Seethala, 2007]. Literaturangaben sprechen von einem 5-J-TSÜ von 41% [Salovaara et al., 2012], im eigenen Patientenstamm lag diese Rate bei 59,1%. Dennoch bedeutete dies insgesamt

eine der schlechtesten Prognosen im Vergleich aller untersuchten Entitäten.

Für das Adenokarzinom NOS finden sich nur wenige Informationen in aktuellen Arbeiten. AUCLAIR UND VAN DER WAL geben je nach Malignitätsgrad (G1, G2, G3) ein 15-J-TSÜ von 54,0%, 31,0%, und 3,0% an [Auclair und Van der Wal, 2005]. Die eigenen Untersuchungen erbrachten ein 5- und 10-J-TSÜ von 59,0% sowie ein 15-J-TSÜ von 0%, womit Patienten mit einem Adenokarzinom NOS im vorliegenden Kollektiv die schlechteste Prognose hatten.

5.2.3.2 Lokalisation, Geschlecht und Alter

Tumoren der kleinen Speicheldrüsen hatten im eigenen Patientenkollektiv die beste Prognose (5-J-TSÜ = 90,3%). IYER ET AL. ermitteln in einer vergleichbaren Studie eine Überlebensrate von 80% [Iyer et al., 2010]. Wesentlich schlechter ergaben sich in der vorliegenden Arbeit die Prognosen für Malignome der Gl. submandibularis (73,5%) und Gl. parotis (71,6%). Das 10-J-TSÜ für Parotistumoren lag bei lediglich 64,6%. Andere Autoren bringen Karzinome der Gl. submandibularis mit der schlechtesten Prognose in Verbindung, was durch die starke Tendenz zur Fernmetastasierung begründet wird: So wird für Karzinome der Gl. submandibularis von einer Fernmetastasierungsrate von 42% berichtet, während diese für die Gl. parotis bei 20% und für die Gl. sublingualis bei 17% liegt [Mariano et al., 2011].

Obgleich die untersuchten Patienten keinen geschlechtsabhängigen Überlebensvorteil zu haben schienen, gibt es in der Literatur einzelne Hinweise auf eine schlechtere Prognose für Männer [Sultan et al., 2011; McHugh et al., 2012; Wang et al., 2012]. Ein Patientenalter über 70 erwies sich im eigenen Kollektiv als negativer Prognosefaktor. In der Literatur werden die Variablen Lokalisation, männliches Geschlecht und hohes Alter jedoch kontrovers diskutiert und nur von wenigen Autoren als ausschlaggebend bewertet [Lang et al., 2005].

5.2.3.3 Grading

SEETHALA berichtet über ein relativ hohes 5-J-TSÜ für gut und mäßig differenzierte Malignome (85-90%), wohingegen diese Überlebensrate für schlecht differenzierte Neopla-

sien auf 40% sinkt [Seethala, 2009]. Im eigenen Kollektiv zeigte sich ein 5-J-TSÜ von 96,2% für G1-Tumoren, 85,6% für G2- sowie 57,0% für G3-Karzinome, was somit im Vergleich eine günstigere Prognose ergab.

Wie an anderer Stelle bereits aufgeführt, herrscht in der aktuellen Forschung Uneinigkeit über ein allgemein gültiges Graduierungssystem. Sowohl eine Zwei- (G1 + G2, G3) als auch Dreiteilung (G1, G2, G3) führte jedoch in der vorliegenden Arbeit zu signifikanten Ergebnissen ($p < 0,001$) bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit. SEETHALA stellt ferner fest, dass die Beurteilung des Malignitätsgrades einerseits als unabhängiger Prognoseindikator dienen kann, andererseits aber auch mit anderen Variablen wie Tumorgroße oder Nodalstatus korreliert, was in der eigenen Arbeit verifiziert werden konnte [Seethala, 2009].

5.2.3.4 TNM-Klassifikation

In der Literatur finden sich Zusammenhänge zwischen dem tumorspezifischen Überleben und klinisch-pathologischen Gegebenheiten. MARIANO ET AL. berichten über ein 5-J-TSÜ von 77,6% für kleinere Malignome und 46,0% für T3- und T4-Tumoren [Mariano et al., 2011]. Für erstere Gruppe lag diese Rate im eigenen Kollektiv bei 86,2%, für größere Tumoren bei 57,5%, womit sich eine insgesamt bessere Prognose ergab.

Selbige Autoren ermittelten in ihrer Arbeit ein 5-J-TSÜ von 70% für Patienten mit einem negativen Nodalstatus und 31,2% für Patienten mit Lymphknotenmetastasen [Mariano et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich mit 84,9% (N0-Status) und 52,1% (vorliegende Metastasierung) auch hier eine generell bessere Prognose. Zudem konnten signifikante Zusammenhänge bezüglich des herabgesetzten Überlebens bei Fernmetastasierung, z. B. in einer Studie von SULTAN ET AL. beschrieben, in der eigenen Untersuchung bestätigt werden [Sultan et al., 2011].

Weitere Assoziationen manifestierten sich im Bezug auf das Gesamtstadium: Verschiedene Arbeiten berichten von Fünfjahresprognosen zwischen 93-83% für die Stadien I und II und einer drastischen Verschlechterung auf 63-45% für fortgeschrittene Tumorstadien (III und IV) [Mariano et al., 2011; Oliveira et al., 2011]. Die eigenen Ergebnisse lagen bei 91,3% (Stadium I und II) bzw. 60,7% (III und IV).

5.2.3.5 Therapie und Resektionsstatus

In der vorliegenden Arbeit verschlechterte sich das 5-J-TSÜ bei Vorliegen eines Residualtumors auf 46,3% (vgl. R0-Status: 83,4%). Vor allem makroskopisch nachweisbare Tumoren, inklusive Fernmetastasierungen, gingen mit einem stark herabgesetzten 5-J-TSÜ von nur 6,7% einher. Der Zusammenhang zwischen einem positiven Marginalstatus nach Tumorresektion und einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit ist hinlänglich beschrieben [Wittekind et al., 2002; Kokemüller et al., 2005; Roh et al., 2008].

5.2.3.6 Rezidive

Fortgeschrittene hoch-maligne Tumoren laufen besonders häufig Gefahr, ein Rezidiv zu entwickeln, was ein stark herabgesetztes 5-J-TSÜ von etwa 35% bedeutet [Gillespie et al., 2012]. Im eigenen Patientenkollektiv ergab sich bei diesen Patienten eine etwas höhere Überlebensrate von 48,9% (vgl. 5-J-TSÜ bei Rezidivfreiheit: 90,2%). Im Falle eines Lokalrezidivs scheint eine radikale Tumorresektion der nicht-chirurgischen Therapieoption Bestrahlung mit oder ohne Chemotherapie überlegen zu sein (5-J-TSÜ von 60% zu 27%) [Gillespie et al., 2012].

5.2.4 Überleben und Prognose: FISH-Ergebnisse

5.2.4.1 PTEN

Untersuchungen von TANIC ET AL. mit Brustkrebsgewebe ergaben, dass der Verlust der Heterozygotie von PTEN der wichtigste genetische Mechanismus für eine reduzierte oder komplett fehlende Expression dieses Tumorsuppressorgens sei. Darüber hinaus konnten sie Zusammenhänge zwischen genetischen Verlusten von PTEN und der Neigung zur Rezidivbildung sowie einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit nachweisen [Tanic et al., 2012]. Auch für Leberzellkarzinome ließen sich Assoziationen zwischen PTEN-Deletionen und einer schlechteren Prognose feststellen [Zhu et al., 2012]. SNIETURA ET AL. kamen in einer Untersuchung von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen zu der Schlussfolgerung, dass die lokoregionale Tumorkontrollrate mit abnehmender PTEN-

Expression sinke und der PTEN-Genstatus somit als prognostischer Index dienen könne [Snietura et al., 2012].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von PTEN erstmals an einem großen Kollektiv maligner Speicheldrüsentumoren untersucht. Auch hier bestätigten sich die oben genannten Zusammenhänge: Während Patienten, deren Tumorgewebe dem genetischen Muster *Disomie* zugeordnet werden konnte, ein 5-J-TSÜ von 81,2% hatten, verringerte sich diese Prognose für hemizygote auf 46,2% und für homozygote Deletionen auf 36,1%.

In der aktuellen Forschung wird der signifikante Einfluss des PTEN-Genstatus auf den Erfolg einer zielgerichteten Therapie im Sinne einer Antagonisierung des PI3K-AKT-Signalwegs (Anti-HER2- oder Anti-EGFR-Therapie) betont. Beim invasiven duktalem Adenokarzinom der Brust kann bei einem regulären PTEN-Status von einem guten Ansprechen auf Trastuzumab ausgegangen werden, wohingegen es bei PTEN-Gendeletionen zu Resistenzen auf eine Anti-HER2-Therapie kommt [Courtney et al., 2010; Fujita et al., 2006]. FRATTINI ET AL. beschreiben für kolorektale Karzinome mit PTEN-Genverlusten ein Nichtansprechen auf Anti-EGFR-Therapien (Cetuximab) und auch bei Glioblastomen stellt PTEN einen wichtigen Biomarker für den erfolgreichen Einsatz der EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib oder Gefitinib dar [Frattini et al., 2007, Mellinghoff et al., 2005]. Folglich könnten Resistenzen auf zielgerichtete Therapien gegen HER2 oder EGFR – trotz Rezeptorüberexpression – auch bei Speicheldrüsenkarzinomen in PTEN-Genverlusten begründet sein.

5.2.4.2 c-Met

In der aktuellen Forschung finden sich zahlreiche Arbeiten, die sich mit Assoziationen zwischen einer erhöhten c-Met-Expression und klinisch-pathologischen Faktoren, der prognostischen Validität und Aussagekraft sowie dem therapeutischen Nutzen beschäftigen.

Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Genanzahl und einem signifikant herabgesetzten tumorspezifischen Überleben werden z. B. für das nicht-kleinzellige Lungenzellkarzinom, das Magenkarzinom oder das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region beschrieben [Go et al., 2010; Park et al., 2012; Graziano et al., 2011; Chau et al., 2011]. Auch für Speicheldrüsenkarzinome konnten negative prognostischen Einflüsse erhöhter c-Met-Genkopien nachgewiesen werden [Tsukinoki et al., 2004].

Die durch FISH-Analysen am eigenen Tumorgewebe erhobenen Daten korrelierten mit den oben genannten Ergebnissen: Eine erhöhte Genkopienzahl von c-Met ging mit einem signifikant geringeren 5-J-TSÜ im Vergleich zum regulären Genstatus (Disomie) einher, was die Bedeutung der c-Met-Aktivierung für das Tumorwachstum, insbesondere die Entdifferenzierung und Metastasierung, verdeutlicht. Interessanterweise wurden in der vorliegenden Arbeit auch Genverluste in Form von Deletionen, vor allem bei den Speicheldrüsenkarzinomen, beobachtet, die ebenfalls mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert waren. Es scheint also nicht nur eine erhöhte Gen-Expression, sondern auch ein Gen-Verlust von c-Met für die Tumorprogression verantwortlich zu sein.

Multiple Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einfluss des c-Met-Genstatus auf den Erfolg von zielgerichteten Therapien. Sowohl bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen als auch bei gastroösophagealen Karzinomen mit c-Met-Amplifikationen, einer kleinen Untergruppe mit einem sehr aggressiven klinischen Verhalten, zeigten sich nach Behandlung mit Crizotinib, einem Met-Tyrosinkinaseinhibitor, partielle Remissionen [Tanizaki et al., 2011; Lennerz et al., 2011]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die Beeinflussung der Effizienz von Anti-EGFR-Therapien durch den c-Met-Status: So führen c-Met-Amplifikationen zu Resistenzen auf EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib. Der simultane Einsatz von c-Met-Inhibitoren führt hingegen zur Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber der Anti-EGFR-Therapie [Engelman et al., 2007]. Interessanterweise kommt es auch umgekehrt durch eine Aktivierung des EGFR-Signaltransduktionswegs zu Resistenzen auf c-Met-Inhibitoren. Folglich wird davon ausgegangen, dass Patienten von einer Kombinationstherapie (c-Met- und zusätzliche EGFR-Tyrosinkinaseinhibition) profitieren [Qi et al., 2011].

5.2.4.3 Multivariate Überlebensanalyse

Der hohe prädiktive Wert der Tumorgröße, des Malignitätsgrads sowie des Vorliegens eines Residualtumors gilt auch für Speicheldrüsenkarzinome und wurde bereits wiederholt postuliert [Vaidya et al., 2012; Bjørndal et al., 2011]. Die vorliegende Arbeit ist jedoch die erste, die den unabhängigen prognostischen Einfluss von PTEN bei malignen Speicheldrüsentumoren zeigt.

Bei verschiedenen soliden Malignomen wurde bereits eine prädiktive Bedeutung von PTEN festgestellt. So beobachteten SNIETURA ET AL. bei Plattenepithelkarzinomen des

Kopf-Hals-Bereichs, dass sich in der multivariaten Analyse – neben dem positiven Lymphknotenstatus – eine veränderte PTEN-Expression als stärkste überlebensbeeinflussende Variable für die Patienten präsentiert [Snietura et al., 2012]. Auch eine Studie von YOSHIMOTO ET AL. mit Prostatakarzinompatienten zeigt, dass PTEN-Deletionen, insbesondere die homozygoten, unabhängig eine stark herabgesetzte Prognose bewirken [Yoshimoto et al., 2007]. In multivariaten Analysen mehrerer Variablen bei Patienten mit Glioblastomen durch CARICO ET AL. ergeben sich dagegen keine signifikanten Auswirkungen auf das Überleben bei genetischen PTEN-Verlusten [Carico et al., 2012].

6 Zusammenfassung und Fazit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetischen Expressionsmuster des Tumorsuppressorgens PTEN sowie des Tyrosinkinaserzeptors c-Met in einem repräsentativen Kollektiv maligner Speicheldrüsentumoren zu untersuchen und mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Langzeitüberleben der Patienten zu korrelieren.

Insgesamt wurden Daten von 324 Patienten mit primären Speicheldrüsenkarzinomen retrospektiv analysiert. Alle Tumoren wurden entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation histologisch eingeteilt und gemäß der UICC einem TNM-Stadium zugeordnet. Zur Dokumentation des Malignitätsgrades kam ein dreigeteiltes System zur Anwendung [Therkildsen et al., 1998].

Für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung wurden Tissue Microarrays hergestellt und mit DNA-Sonden für PTEN und c-Met inkubiert. Die Analyse der Gensignale erfolgte in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Kriterien (siehe Kapitel 3.2.7 und 3.2.8). Mittels statistischer Auswertungsverfahren konnten Assoziationen zwischen verschiedenen Variablen, deren Auswirkungen auf das Langzeitüberleben und entsprechende Signifikanzen erarbeitet werden.

In der univariaten Analyse erwiesen sich aggressive Tumorentitäten wie das Speicheldrüsenkarzinom, Plattenepithelkarzinom oder Adenokarzinom NOS als signifikant häufig mit hemi- oder homozygoten PTEN-Gendeletionen vergesellschaftet ($p < 0,001$). Deletionen waren zudem auffällig stark mit einem positiven Nodalstatus, hohem Malignitätsgrad ($p < 0,001$) sowie fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,01$) verknüpft.

Auch in der Auswertung der c-Met-Aberrationen waren eben genannte Tumorentitäten in hohem Maße betroffen ($p < 0,001$). Weitere signifikante Zusammenhänge ergaben sich mit fast allen klinisch-pathologischen Parametern wie männlichem Geschlecht ($p < 0,05$), Alter über 70 Jahren ($p < 0,05$), einem hohen T-Status ($p < 0,01$), vorliegenden Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$), einem fortgeschrittenen Gesamtstadium ($p < 0,001$) und einer histologischen Entdifferenzierung ($p < 0,001$).

Bei Betrachtung beider Gene kam es zu Überschneidungen zwischen Deletionen von PTEN und Aberrationen von c-Met ($p < 0,001$).

Unter den klinisch-pathologischen Parametern erwiesen sich die Tumorentität, das Alter, das TNM- und Gesamtstadium, ein Residualtumor und Rezidive als signifikante Prognoseindikatoren ($p < 0,001$). Das Geschlecht und die Tumorlokalisation nahmen hingegen keinen relevanten prognostischen Stellenwert ein.

Disomien bei PTEN gingen mit einem wesentlich besseren Langzeitüberleben einher wie Deletionen. Eine sehr schlechte Prognose musste vor allem Tumoren mit homozygoten Deletionen zugesprochen werden ($p < 0,001$).

Unter den c-Met-Aberrationen waren hauptsächlich die Faktoren hohe Polysomie und Deletion mit einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ($p < 0,001$).

Die multivariate Überlebensanalyse erbrachte, dass sich ein schlechter Differenzierungsgrad am stärksten auf das Überleben auswirkte ($p = 0,001$). Es folgten ein vorhandener Residualtumor ($p = 0,002$) sowie Lymphknotenmetastasen ($p = 0,006$). Auch das Vorliegen von PTEN-Deletionen korrelierte in diesem Auswertungsverfahren mit einer signifikant ungünstigeren Prognose ($p = 0,014$).

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich, dass genetische Aberrationen sowohl des Tumorsuppressorgens PTEN als auch der Rezeptortyrosinkinase c-Met bei Speicheldrüsenkarzinomen, insbesondere bei hochmalignen Varianten, auftreten und die Prognose des Patienten maßgeblich mit beeinflussen. Darüber hinaus besitzen beide Gene eine Bedeutung für aktuelle, innovative Therapiekonzepte mittels zielgerichteter Antikörpertherapien gegen verschiedene Onkogene, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Dieser Aspekt war jedoch nicht primärer Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Literaturverzeichnis

Ach T, Zeitler K, Schwarz-Furlan S, Baader K, Agaimy A, Rohrmeier C, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Brockhoff G, Ettl T (2012). Aberrations of MET are associated with copy number gain of EGFR and loss of PTEN and predict poor outcome in patients with salivary gland cancer. *Virchows Arch* 462: 65-72.

Armstrong JG, Harrison LB, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Fass DE, Zelefsky MJ, Shah JP, Strong EW, Spiro RH (1992). The indications for elective treatment of the neck in cancer of the major salivary glands. *Cancer* 69: 615-619.

Auclair P, Van der Wal JE (2005). Adenocarcinoma, not otherwise specified. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours*. IARC Press, Lyon. Pp. 238-239.

Barnes L, Rao U, Krause J, Contis L, Schwartz A, Scalamogna P (1994). Salivary duct carcinoma. Part I. A clinicopathologic evaluation and DNA image analysis of 13 cases with review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 64-73.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005). *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours*. IARC Press, Lyon. Pp. 210-211.

Bell D, Bell A, Roberts D, Weber RS, El-Naggar AK (2012). Developmental transcription factor EN1 – a novel biomarker in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 118: 1288-1292.

Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, Homøe P, Sørensen CH, Andersen E, Bundgaard T, Primdahl H, Lambertsen K, Andersen LJ, Godballe C (2011). Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol* 47: 677-682.

Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, Homøe P, Sørensen CH, Andersen E, Bundgaard T, Primdahl H, Lambertsen K, Andersen LJ, Godballe C (2012). Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: outcome and prognostic factors. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol* 48: 179-185.

Brandwein-Gensler MS, Skalova A, Nagao T (2005). Salivary duct carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours*. IARC Press, Lyon. Pp. 236-237.

Buselmaier W (2012). *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

Cappuzzo F, Jänne PA, Skokan M, Finocchiaro G, Rossi E, Ligorio C, Zucali PA, Terracciano L, Toschi L, Roncalli M, Destro A, Incarbone M, Alloisio M, Santoro A, Varella-Garcia M (2009). MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 20: 298-304.

Carico C, Nuño M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG (2012). Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* 7: e33684. DOI: 10.1371/journal.pone.0033684.

Carty SE, Cooper DS, Doherty GM, Duh QY, Kloos RT, Mandel SJ, Randolph GW, Stack BC Jr., Steward DL, Terris DJ, Thompson GB, Tufano RP, Tuttle RM, Udelsman R (2009). Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid* 19: 1153-1158.

Chau NG, Perez-Ordóñez B, Zhang K, Pham NA, Ho J, Zhang T, Ludkovski O, Wang L, Chen EX Tsao MS, Kamel-Reid S, Siu LL (2011). The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 3:11.

Cho HW, Kim J, Choi J, Choi HS, Kim ES, Kim SH, Choi EC (2011). Sonographically guided fine-needle aspiration biopsy of major salivary gland masses: a review of 245 cases. *AJR Am J Roentgenol* 196: 1160-1163.

Conde-Perez A, Larue L (2012). PTEN and melanomagenesis. *Future Oncol* 8: 1109-1120.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 28: 1075-1083.

Dias FL, Lima RA, Cernea CR (2007). Management of Tumors of the Submandibular and Sublingual Glands. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) *Salivary Gland Disorders*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York. Pp. 360-366.

Dhiwakar M, Robbins KT, Rao K, Vieira F, Malone J (2011). Efficacy of selective neck dissection for nodal metastasis with involvement of nonlymphatic structures. *Head Neck* 33: 1099-1105.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19: 348-355.

Di Palma S, Simpson RHW, Skalova A, Leivo I (2006). Major and Minor Salivary Glands. In Cardesa A, Slootweg PJ (Eds.) *Pathology of the Head and Neck*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 144-159.

Ellis G, Simpson RHW (2005). Acinic cell carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 216-218.

El-Naggar AK, Huvos AG (2005). Adenoid cystic carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 221-222.

Elston CW, Ellis IO (1991). Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410.

Eneroth CM, Jakobsson PA, Blanck C (1966). Acinic cell carcinoma of the parotid gland. *Cancer* 19: 1761-1772.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316: 1039-1043.

Ettl T, Schwarz S, Kleinsasser N, Hartmann A, Reichert TE, Driemel O (2008). Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas. *Histopathology* 53: 567-577.

Ettl T, Baader K, Stiegler C, Müller M, Agaimy A, Zenk J, Kühnel T, Gosau M, Zeitler K, Schwarz S, Brockhoff G (2012a). Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer. *Br J Cancer* 106: 719-726.

Ettl T, Schwarz-Furlan S, Gosau M, Reichert TE (2012b). Salivary gland carcinomas. *Oral Maxillofac Surg* 16: 267-283.

Ettl T, Stiegler C, Zeitler K, Agaimy A, Zenk J, Reichert TE, Gosau M, Kühnel T, Brockhoff G, Schwarz S (2012c). EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis. *Hum Pathol* 43: 921-931.

Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK (2005). Tumours of the salivary glands: Introduction. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 212-215.

Falbo V, Floridia G, Censi F, Marra M, Foschini MP, Taruscio D (2011). Three cases of rare salivary gland tumours: a molecular study of TP53, CDKN2A/ARF, RAS, BRAF, PTEN, MAPK2 and EGFR genes. *Oncol Rep* 26: 3-11.

Feinstein TM, Lai SY, Lenzner D, Gooding W, Ferris RL, Grandis JR, Myers EN, Johnson JT, Heron DE, Argiris A (2011). Prognostic factors in patients with high-risk locally advanced salivary gland cancers treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Head Neck* 33: 318-323.

Fonseca FP, Carvalho Mde V, De Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, Vargas PA (2012). Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 114: 230-239.

Frattoni M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L (2007). PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 97: 1139-1145.

Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, Tsukuda K, Ogasawara Y, Shimizu N (2006). PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer* 94: 247-252.

Furuse C, Miguita L, Rosa AC, Soares AB, Martinez EF, Altemani A, De Araújo VC (2010). Study of growth factors and receptors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* 39: 540-547.

Gardian K, Janczewska S, Olszewski WL, Durlik M (2012). Analysis of pancreatic cancer microenvironment: role of macrophage infiltrates and growth factors expression. *J Cancer* 3: 285-291.

Garouniatis A, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG (2012). FAK, CD44v6, c-Met and EGFR in colorectal cancer parameters: tumour progression, metastasis, patient survival and receptor crosstalk. *Int J Colorectal Dis* 28: 9-18.

Gendron KB, Ferris RL (2007). Management of the Neck in Cancer of the Salivary Glands. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) Salivary Gland Disorders. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York. Pp. 421-434.

Gillespie MB, Albergotti WG, Eisele DW (2012). Recurrent salivary gland cancer. *Curr Treat Options Oncol* 13: 58-70.

Gnepp DR, Brandwein-Gensler MS, El-Naggar AK, Nagao T (2005). Carcinoma ex pleomorphic adenoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 242-243.

Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH (2010). High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5: 305-313.

Godge P, Sharma S, Yadav M (2012). Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. *Contemp Clin Dent* 3: 223-226.

Gong X, Xiong P, Liu S, Xu Q, Chen Y (2012). Ultrasonographic appearances of mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 114: 382-387.

Goode RK, El-Naggar AK (2005). Mucoepidermoid carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. P. 219-220.

Goodwin CR, Lal B, Ho S, Woodard CL, Zhou X, Taeger A, Xia S, Laterra J (2011). PTEN reconstitution alters glioma responses to c-Met pathway inhibition. *Anticancer Drugs* 22: 905-912.

Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S, Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nictolis M, Cappuzzo F, Magnani M (2011). Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 29: 4789-4795.

Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L (2009). Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 74: 134-148.

Henshall S (2003). Tissue Microarrays. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 347-358.

Iyer NG, Kim L, Nixon IJ, Palmer F, Kraus D, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I (2010). Factors predicting outcome in malignant minor salivary gland tumors of the oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 1240-1247.

Jaehne M, Roeser K, Jaekel T, Schepers JD, Albert N, Löning T (2005). Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases. *Cancer* 103: 2526-2533.

Jaspers HC, Verbist BM, Schoffelen R, Mattijssen V, Slootweg PJ, van der Graaf WT, van Herpen CM (2011). Androgen receptor-positive salivary duct carcinoma: a disease entity with promising new treatment options. *J Clin Oncol* 29: 473-476.

Kearney L, Shipley J (2012). Fluorescence in situ hybridization for cancer-related studies. *Methods Mol Biol* 878: 149-174.

Kokemüller H, Swennen G, Brüggemann N, Brachvogel P, Eckardt A, Hausamen JE (2004). Epithelial malignancies of the salivary glands: clinical experience of a single institution – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33: 423-432.

Kokemüller H, Brüggemann N, Swennen G, Eckardt A (2005). Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands – clinical review of 42 cases. *Oral Oncol* 41: 3-10.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A (2004). Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 10: 7820-7826.

Krishnamurthy A, Vaidhyanathan A, Majhi U (2011). Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the parotid gland. *J Cancer Res Ther* 7: 84-87.

Lang S, Rotter N, Lorenzen A, Ihrler S, Eckel R, Hölzel D, Rasp G, Wollenberg B, Sommer K (2005). Salivary gland carcinomas. 1. Epidemiology, etiology, malignancy criteria, prognostic parameters and classification. *HNO* 53: 817-826.

Laurie SA, Argiris A (2007). Chemotherapy in the Management of Malignant Tumors of Salivary Gland Origin. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) *Salivary Gland Disorders*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York. Pp. 477-494.

Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, Lauwers GY, Christensen JG, Wilner KD, Haber DA, Salgia R, Bang YJ, Clark JW, Solomon BJ, Iafrange AJ (2011). MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol* 29: 4803-4810.

Leo C, Sala V, Morello M, Chiribiri A, Riess I, Mancardi D, Schiaffino S, Ponzetto C, Crepaldi T (2011). Activated Met signalling in the developing mouse heart leads to cardiac disease. *PLoS One* 6: e14675. DOI: 10.1371/journal.pone.0014675.

Lewis JE, Olsen KD (2005). Squamous cell carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 245-246.

Li Y, Guessous F, DiPierro C, Zhang Y, Mudrick T, Fuller L, Johnson E, Marcinkiewicz L, Engelhardt M, Kefas B, Schiff D, Kim J, Abounader R (2009). Interactions between PTEN and the c-Met pathway in glioblastoma and implications for therapy. *Mol Cancer Ther* 8: 376-385.

Liang LZ, Ma B, Liang YJ, Liu HC, Zheng GS, Zhang TH, Chu M, Xu PP, Su YX, Liao GQ (2012). High expression of the autophagy gene Beclin-1 is associated with favorable prognosis for salivary gland adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* 41: 621-629.

Lima RA, Tavares MR, Dias FL, Kligerman J, Nascimento MF, Barbosa MM, Cernea CR, Soares JR, Santos IC, Salviano S (2005). Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg* 133: 702-708.

Lin WN, Huang HC, Wu CC, Liao CT, Chen IH, Kan CJ, Huang SF (2010). Analysis of acinic cell carcinoma of the parotid gland – 15 years experience. *Acta Otolaryngol* 130: 1406-1410.

Löning T, Jäkel KT (2004). Salivary gland tumors – tumor typing and grading. *Pathologe* 25: 38-45.

Lujan B, Hakim S, Moyano S, Nadal A, Caballero M, Diaz A, Valera A, Carrera M, Cardesa A, Alos L (2010). Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Br J Cancer* 103: 510-516.

Luna MA, Wenig BM (2005). Polymorphous low-grade adenocarcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. P. 223-224.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grénman R (2006). Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta Oncol* 45: 669-675.

Ma X, Ziel-van der Made AC, Autar B, Van der Korput HA, Vermeij M, Van Duijn P, Cleutjens KB, De Krijger R, Krimpenfort P, Berns A, Van der Kwast TH, Trapman J (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res* 65: 5730-5739.

Mahmood U, Koshy M, Goloubeva O, Suntharalingam M (2011). Adjuvant radiation therapy for high-grade and/or locally advanced major salivary gland tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 137: 1025-1030.

Manganaris A, Patakiouta F, Xirou P, Manganaris T (2007). Lymphoepithelial carcinoma of the parotid gland: is an association with Epstein-Barr virus possible in non-endemic areas? *Int J Oral Maxillofac Surg* 36: 556-559.

Mariano FV, Da Silva SD, Chulan TC, De Almeida OP, Kowalski LP (2011). Clinicopathological factors are predictors of distant metastasis from major salivary gland carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40: 504-509.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS, Kupferman ME (2012). Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 118: 3928-3936.

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353: 2012-2024.

Min R, Siyi L, Wenjun Y, Ow A, Lizheng W, Minjun D, Chenping Z (2012). Salivary gland adenoid cystic carcinoma with cervical lymph node metastasis: a preliminary study of 62 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41: 952-957.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G (2001). Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8: 14-20.

Moore EJ, Olsen KD (2007). Total Parotidectomy. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) Salivary Gland Disorders. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York. Pp. 247-266.

Mulisch M, Welsch U (¹⁸2010). Romeis Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Pp. 419-447.

Müller-Hermelink HK, Papadopoulos T (2010). Einteilung und Klassifikation maligner Erkrankungen. In Hiddemann W, Bartram CR (Eds.) Die Onkologie. Springer-Verlag, Heidelberg. Pp. 38-40.

Oliveira LR, Soave DF, Oliveira-Costa JP, Zorretto VA, Ribeiro-Silva A (2011). Prognostic factors in patients with malignant salivary gland neoplasms in a Brazilian population. Asian Pac J Cancer Prev 12: 363-368.

O'Neill ID (2009). t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. Oral Oncol 45: 2-9.

Paiva-Fonseca F, De Almeida OP, Ayroza-Rangel AL, Agustin-Vargas P (2012). Tissue microarray construction for salivary gland tumors study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 18: e1-6. DOI 10.4317/medoral.18204.

Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, Ahn JS, Park K, Shin YK, Erkin OC, Song K, Kim J, Shim YM, Han J (2012). High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. Histol Histopathol 27: 197-207.

Pederson AW, Salama JK, Haraf DJ, Witt ME, Stenson KM, Portugal L, Seiwert T, Villafior VM, Cohen EE, Vokes EE, Blair EA (2011). Adjuvant chemoradiotherapy for locoregionally advanced and high-risk salivary gland malignancies. Head Neck Oncol 3: 1-6.

Peel RL, Seethala RR (2007). Pathology of Salivary Gland Disease. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) Salivary Gland Disorders. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp. 59-81.

Piao S, Zhao S, Guo F, Xue J, Yao G, Wei Z, Huang Q, Sun Y, Zhang B (2012). Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 627-635.

Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Jänne PA, Engelman JA (2011). Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res* 71: 1081-1091.

Ren J, Liu Z, Liu X, Li Y, Zhang X, Li Z, Yang Y, Yang Y, Chen Y, Jiang S (2011). Primary myoepithelial carcinoma of palate. *World J Surg Oncol* 9: 104.

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT, American Head and Neck Society, American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (2002). Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128: 751-758.

Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA, Committee for Neck Dissection Classification, American Head and Neck Society (2008). Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134: 536-538.

Roh JL, Choi SH, Lee SW, Cho KJ, Nam SY, Kim SY (2008). Carcinomas arising in the submandibular gland: high propensity for systemic failure. *J Surg Oncol* 97: 533-537.

Salovaara E, Hakala O, Bäck L, Koivunen P, Saarilahti K, Passador-Santos F, Leivo I, Mäkitie AA (2012). Management and outcome of salivary duct carcinoma in major salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270: 281-285.

Sansal I, Sellers WR (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22: 2954-2963.

Schwarz S, Ettl T, Kleinsasser N, Hartmann A, Reichert TE, Driemel O (2008). Loss of Maspin expression is a negative prognostic factor in common salivary gland tumors. *Oral Oncol* 44: 563-570.

Schwarz S, Stiegler C, Zenk J, Iro H, Agaimy A (2009). Salivary gland mucoepidermoid carcinoma: unusual variants with detection of the t(11,19)(q21;p13) translocation. *Pathologie* 30: 472-477.

Schwarz-Furlan S (2011). Speicheldrüsenkarzinome. Pathologie und Prognose. *Pathologie* 32: 310-315.

Schwarz S, Stiegler C, Müller M, Ettl T, Brockhoff G, Zenk J, Agaimy A (2011). Salivary gland mucoepidermoid carcinoma is a clinically, morphologically and genetically heterogeneous entity: a clinicopathological study of 40 cases with emphasis on grading, histological variants and presence of the t(11;19) translocation. *Histopathology* 58: 557-570.

Schwenzer N, Ehrenfeld M (2011). Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York. Pp. 70-161.

Seethala RR (2009). An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol* 3: 69-77.

Seethala RR, Johnson JT, Barnes EL, Myers EN (2010). Polymorphous low-grade adenocarcinoma: the University of Pittsburgh experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 385-392.

Seethala RR (2011). Histologic grading and prognostic biomarkers in salivary gland carcinomas. *Adv Anat Pathol* 18: 29-45.

Sgambato A, Casaluce F, Maione P, Rossi A, Rossi E, Napolitano A, Palazzolo G, Bareschino MA, Schettino C, Sacco PC, Ciardiello F, Gridelli C (2012). The c-Met inhibitors: a new class of drugs in the battle against advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Pharm Des* 18: 6155-6168.

Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, Koumakpayi IH, Katz RL, Khanna A, Alvarez K, Chen G, Darnel AD, Aprikian AG, Saad F, Bismar TA, Squire JA (2009). PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* 218: 505–513.

Skálová A, Jäkel KT (2005). Myoepithelial carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. Pp. 240-241.

Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, Goraj-Zajac A, Piglowski W, Lange D, Wozniak G, Nowara E, Suwinski R (2012). PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS ONE* 7: e33396. Doi:10.1371/journal.pone.0033396.

Sobin LH, Wittekind C (2002). *TNM: Classification of Malignant Tumours* (6th Edition). John Wiley & Sons, New York.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2009). *TNM Classification of Malignant Tumours* (7th Edition). Wiley-Blackwell, Hoboken NJ, USA.

Spiro RH, Huvos AG, Strong EW (1978). Acinic cell carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 67 cases. *Cancer* 41: 924-935.

Staibano S, Mascolo M, Rocco A, Lo Muzio L, Ilardi G, Siano M, Pannone G, Vecchione ML, Nugnes L, Califano L, Zamparese R, Bufo P, De Rosa G (2011). The proliferation marker Chromatin Assembly Factor-1 is of clinical value in predicting the biological behaviour of salivary gland tumours. *Oncol Rep* 25: 13-22.

Sultan I, Rodriguez-Galindo C, Al-Sharabati S, Guzzo M, Casanova M, Ferrari A (2011). Salivary gland carcinomas in children and adolescents: a population-based study, with comparison to adult cases. *Head Neck* 33: 1476-1481.

Suzuki K, Cheng J, Watanabe Y (2003). Hepatocyte growth factor and c-Met (HGF/c-Met) in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *J Oral Pathol Med* 32: 84-89.

Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A (2012). EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Arch* 461: 271-282.

Tanic N, Milovanovic Z, Tanic N, Dzodic R, Juranic Z, Susnjar S, Plesinac-Karapandzic V, Tatic S, Dramicanin T, Davidovic R, Dimitrijevic B (2012). The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 13: 1165-1174.

Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nakagawa K (2011). MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows differential antitumor effects in non-small cell lung cancer according to MET alterations. *J Thorac Oncol* 6: 1624-1631.

Therkildsen MH, Christensen M, Andersen LJ, Schiødt T, Hansen HS (1998). Salivary Gland Carcinomas: Prognostic Factors. *Acta Oncol* 37: 701-713.

Tsukinoki K, Yasuda M, Mori Y, Asano S, Naito H, Ota Y, Osamura RY, Watanabe Y (2004). Hepatocyte growth factor and c-Met immunoreactivity are associated with metastasis in high grade salivary gland carcinoma. *Oncol Rep* 12: 1017-1021.

Vaidya AD, Pantvaidya GH, Metgudmath R, Kane SV, D'Cruz AK (2012). Minor salivary gland tumors of the oral cavity: a case series with review of literature. *J Cancer Res Ther* 8: 111-115.

Varella-Garcia M (2006). Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol* 1:19.

Verhagen PC, Van Duijn PW, Hermans KG, Looijenga LH, Van Gurp RJ, Stoop H, Van der Kwast TH, Trapman J (2006). The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol* 208: 699-707.

Wang SJ, Eisele DW (2007). Superficial Parotidectomy. In Myers EN, Ferris RL (Eds.) *Salivary Gland Disorders*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York. Pp. 237-246.

Wang YL, Li DS, Gan HL, Lu ZW, Li H, Zhu GP, Huang CP, Zhu YX, Chen TZ, Wang Y, Sun GH, Wang ZY, Shen Q, Wu Y, Ji QH (2012). Predictive index for lymph node management of major salivary gland cancer. *Laryngoscope* 122: 1497-1506.

Weitz J, Vogelsang HE, Siewert JR (2010). Prinzipien der onkologischen Chirurgie. In Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V (Eds.) *Praxis der Viszeralchirurgie. Onkologische Chirurgie*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp. 213-223.

Williams MD, Roberts DB, Kies MS, Mao L, Weber RS, El-Naggar AK (2010). Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: empirical and therapeutic significance. *Clin Cancer Res* 16: 2266-2274.

Wittekind C (2010). Tumorklassifikationen. In Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V (Eds.) *Praxis der Viszeralchirurgie. Onkologische Chirurgie*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp. 24-27.

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94: 2511-2516.

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Torres CH, Soares FA, Squire JA (2007). FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 97: 678-685.

You WK, McDonald DM (2008). The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 41: 833-839.

Yu GY, Ma DQ (1987). Carcinoma of the salivary gland: a clinicopathologic study of 405 cases. *Semin Surg Oncol* 3: 240-243.

Zhu X, Qin X, Fei M, Hou W, Greshock J, Bachman KE, Wooster R, Kang J, Qin CY (2012). Combined Phosphatase and Tensin Homolg (PTEN) Loss and Fatty Acid Synthase (FAS) Overexpression Worsens the Prognosis of Chinese Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 13: 9980-9991.

Internetquellen

<http://www.zytovision.com/productinfo/ZytoLight/fe018.pdf>, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

<http://www.zytovision.com/productinfo/ZytoLight/fe024.pdf>, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

http://www.zytovision.com/zytolightmanuals/ZytoLight_Manuals_Deutsch/Z-2078-CE-IVD-Deu.pdf, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

http://www.zytovision.com/zytolightmanuals/ZytoLight_Manuals_Deutsch/Z-2087-CE-IVD-Deu.pdf, zuletzt aufgerufen am 16.12.2012.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich vielmals bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Tobias Ettl für die Betreuung dieser Promotionsarbeit, seine fachliche und konzeptionelle Unterstützung sowie seine Ratschläge bei der statistischen Auswertung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert bedanke ich mich für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gero Brockhoff danke ich für seine Beratung sowie die Bereitstellung der labortechnischen Räumlichkeiten und Utensilien.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Sebastian Hahnel für die Zweitkorrektur bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Stephan Schwarz-Furlan für die histopathologische Begutachtung und Diagnostik der zu untersuchenden Gewebeschnitte.

Zudem gilt mein Dank den pathologischen Instituten sowie den Kliniken und Polikliniken für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Klinikums Nürnberg sowie der Universitätskliniken Erlangen-Nürnberg und Regensburg für die Bereitstellung der klinischen Patientendaten.

Bei Herrn Rudolf Jung möchte ich mich für die Anfertigung der Tissue Micorarrays bedanken.

Frau Maria Bock und Frau Anja Reck danke ich herzlich für die Anfertigung der FISH-Färbungen und ihre Ratschläge bei labortechnischen Fragen.