

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTS-  
CHIRURGIE

PROF. DR. DR. T. E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Genstatus und prognostische Bedeutung von MDM4 und FGFR3 bei  
Karzinomen der Speicheldrüsen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stephanie Ach  
aus Neuhaus

2014



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTS-  
CHIRURGIE

PROF. DR. DR. T. E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Genstatus und prognostische Bedeutung von MDM4 und FGFR3 bei  
Karzinomen der Speicheldrüsen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stephanie Ach  
aus Neuhaus

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Tobias Ettl
2. Berichterstatter:	PD Dr. Sebastian Hahnel
Tag der mündlichen Prüfung:	22. September 2014

Meinen Eltern  
und  
meinem Mann Tobias  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet



# Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Maligne Speicheldrüsentumoren</b>	1
<b>1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie</b>	1
<b>1.1.2 Klinische Symptomatik</b>	2
<b>1.1.3 Diagnostik</b>	3
<b>1.1.4 Histologische Klassifikation</b>	4
1.1.4.1 Adenoid-zystisches Karzinom (ICD-O: 8200/3)	5
1.1.4.2 Azinuszellkarzinom (ICD-O: 8550/3)	6
1.1.4.3 Mukoepidermoidkarzinom (ICD-O: 8430/3)	8
1.1.4.4 Speichelgangkarzinom (ICD-O: 8500/3)	9
1.1.4.5 Sonstige	11
<b>1.1.5 Staging</b>	14
1.1.5.1 TNM-Klassifikation	14
1.1.5.2 C-Faktor	16
1.1.5.3 Grading	16
1.1.5.4 R-Klassifikation	18
<b>1.1.6 Therapie</b>	19
1.1.6.1 Resektive Verfahren	19
1.1.6.2 Strahlentherapie	24
1.1.6.3 Systemische Therapieformen	25
<b>1.1.7 Prognosefaktoren</b>	26
<b>1.2 Genetik</b>	26
<b>1.2.1 MDM4</b>	26
<b>1.2.2 FGFR3</b>	28

<b>2. Fragestellung</b>	30
<b>3. Patienten und Methoden</b>	31
<b>3.1 Patientenkollektiv</b>	31
<b>3.2 Datenerhebung</b>	31
<b>3.3 Histologische Untersuchungen</b>	32
<b>3.4 Tissue Microarray</b>	33
<b>3.5 Färbeprotokoll der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)</b>	33
<b>3.6 Verwendete Materialien und Reagenzien</b>	35
<b>3.7 FISH-Sonden</b>	36
<b>3.8 FISH-Analyse</b>	38
<b>3.9 Auswertungskriterien</b>	38
<b>3.10 Statistische Auswertung</b>	39
<b>4. Ergebnisse</b>	40
<b>4.1 Deskriptive Analyse – Klinisch-pathologische Parameter</b>	40
<b>4.1.1 Tumorentitäten</b>	40
<b>4.1.2 Alter und Geschlecht</b>	41
<b>4.1.3 Lokalisation</b>	42
<b>4.1.4 TNM-Klassifikation</b>	44
<b>4.1.5 Grading</b>	47
<b>4.1.6 Therapie</b>	50
<b>4.1.7 Rezidive</b>	52
<b>4.2 Deskriptive Analyse – FISH-Ergebnisse</b>	53
<b>4.2.1 MDM4</b>	53



<b>4.2.2 FGFR3</b>	58
<b>4.2.3 MDM4 und FGFR3</b>	63
<b>4.3 Überlebensrate und Prognose – Klinisch-pathologische Parameter</b>	64
<b>4.3.1 Tumorentitäten</b>	64
<b>4.3.2 Alter und Geschlecht</b>	66
<b>4.3.3 Lokalisation</b>	67
<b>4.3.4 TNM-Klassifikation</b>	68
<b>4.3.5 Grading</b>	72
<b>4.3.6 Therapie</b>	73
<b>4.3.7 Rezidive</b>	76
<b>4.4 Überlebensrate und Prognose – FISH-Ergebnisse</b>	77
<b>4.4.1 MDM4</b>	77
<b>4.4.2 FGFR3</b>	78
<b>4.5 Multivariate Überlebensrate</b>	80
<b>5. Diskussion</b>	81
<b>5.1 Diskussion der Methodik</b>	81
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse</b>	83
<b>5.2.1 Deskriptive Analyse – Klinisch-pathologische Parameter</b>	83
5.2.1.1 Tumorentitäten	83
5.2.1.2 Alter und Geschlecht	85
5.2.1.3 Lokalisation	86
5.2.1.4 TNM-Klassifikation	87
5.2.1.5 Grading	88
5.2.1.6 Therapie	89
5.2.1.7 Rezidive	91

<b>5.2.2 Deskriptive Analyse – FISH-Ergebnisse</b>	91
5.2.2.1 MDM4	91
5.2.2.2 FGFR3	93
5.2.2.3 MDM4 und FGFR3	94
<b>5.2.3 Überlebensrate und Prognose –</b>	
<b>Klinisch-pathologische Parameter</b>	95
5.2.3.1 Tumorentitäten	95
5.2.3.2 Alter und Geschlecht	96
5.2.3.3 Lokalisation	97
5.2.3.4 TNM-Klassifikation	98
5.2.3.5 Grading	99
5.2.3.6 Therapie	99
5.2.3.7 Rezidive	100
<b>5.2.4 Überlebensrate und Prognose – FISH-Ergebnisse</b>	101
5.2.4.1 MDM4	101
5.2.4.2 FGFR3	102
<b>5.2.5 Multivariate Überlebensrate</b>	103
<b>5.3 Ausblick</b>	104
<b>6. Zusammenfassung</b>	106
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	108



# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Speicheldrüsentumoren

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Tumoren der Speicheldrüsen sind sehr selten mit einer globalen Inzidenz von 0,4-2,6 pro 100 000 Personen [Eveson et al., 2005]. Etwa 80% der Tumoren der Gl. parotidea sind benigne, hingegen sind 50% der Tumoren sowohl in der Gl. submandibularis als auch in den kleinen Speicheldrüsen bösartig. Tumoren der Gl. sublingualis kommen in nur 1% der Fälle vor, sind aber fast ausschließlich maligne (90%) [Ehrenfeld et al., 2011]. Im Mittel treten benigne und maligne Speicheldrüsentumoren in der 5. Lebensdekade auf. Pleomorphe Adenome, Mukoepidermoid- und Azinuszellkarzinome werden am häufigsten in der 3. und 4. Lebensdekade diagnostiziert, einige weitere Entitäten wie etwa das Speichelgangkarzinom haben ihren Altersgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [Eveson et al., 2005]. Generell sind Frauen häufiger betroffen als Männer, jedoch kommen je nach Tumor-Typ Variationen vor. Das gutartige pleomorphe Adenom bildet die Hälfte aller epithelialen Speicheldrüsentumoren und ist damit die häufigste Entität. Das am weitesten verbreitete Malignom stellt das Mukoepidermoidkarzinom dar [Eveson et al., 2005].

Die Pathogenese der Speicheldrüsentumoren ist weitgehend unklar. Beim lymphoepithelialen Karzinom etwa konnte eine Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung durch humane Papillomaviren (HPV) wie z.B. bei Zervixkarzinomen konnte nicht bestätigt werden [Eveson et al., 2005]. Des Weiteren konnte eine Langzeitstudie belegen, dass ionisierende Strahlung die Entwicklung von Speicheldrüsenneoplasien begünstigt. Überlebende der Atombombendetonationen von Hiroshima und Nagasaki weisen ein elfmal höheres Risiko auf, an einem Malignom der

Speicheldrüsen, v.a. an einem Mukoepidermoidkarzinom zu erkranken. Ebenso steigt nach einer therapeutischen Bestrahlung im Kopf- und Halsbereich die Wahrscheinlichkeit, einen malignen Speicheldrüsentumor zu entwickeln. Auch für UV-Strahlung und zahnärztliche Röntgenstrahlung gilt ein erhöhtes Risiko [Eveson et al., 2005]. Bestimmte Berufsgruppen, die der Exposition von Stoffen wie Asbest, Zementstaub, Chrom, Nickel oder bestimmten Kosmetika ausgesetzt sind, erkranken häufiger an malignen Neoplasien der Speicheldrüsen. Hingegen konnte keine Assoziation zwischen Tabak- und Alkoholkonsum und der Entstehung von Speicheldrüsentumoren nachgewiesen werden [Eveson et al., 2005].

### **1.1.2 Klinische Symptomatik**

Zumeist werden Tumoren der Speicheldrüsen durch eine schmerzlose, langsam an Größe zunehmende Schwellung je nach Lokalisation präauriculär, submandibulär oder intraoral auffällig. Das klinische Erscheinungsbild eines bösartigen Tumors der Speicheldrüsen unterscheidet sich oftmals nicht von dem eines gutartigen Befundes. Gelegentlich gehen Speicheldrüsenkarzinome, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien, mit Schmerzen und Nervenausfällen einher. So kann ein Malignom im Bereich der Ohrspeicheldrüse durch Infiltration des N. facialis zu einer peripheren Parese des Nervs mit einhergehender Lähmung der entsprechenden mimischen Muskulatur führen. Eine Fazialisparese ist daher bei einem Befund in der Ohrspeicheldrüse nahezu beweisend für das Vorliegen einer malignen Neoplasie [Guzzo et al., 2009, Carlson et al., 2013]. Ein Ausfall des N. lingualis mit einhergehender Gefühlsstörung der Zunge deutet auf eine Infiltration durch ein Malignom der Gl. sublingualis hin [Ehrenfeld et al., 2011]. Weitere Symptome wie Fisteln, Ulzerationen der Haut und Kieferklemme treten meist erst in fortgeschrittenen Stadien auf. Maligne Veränderungen der kleinen Speicheldrüsen sind in 50% der Fälle intraoral zu lokalisieren und

gehen meist mit einer schmerzlosen submukösen Schwellung und einer möglichen Ulzeration einher. Befindet sich der Tumor in der Nasenhöhle oder dem Nasopharynx, klagen Patienten über Epistaxis, Schmerzen im Gesicht und Obstruktion der Nasenatmung. Bei Symptomen wie Heiserkeit, Atemnot und einer Veränderung der Stimme ist an einen Tumor im Bereich des Larynx zu denken [Guzzo et al., 2009, Carlson et al., 2013].

### **1.1.3 Diagnostik**

Zur Diagnosefindung eines malignen Prozesses tragen mehrere Kriterien bei. Es sollten mögliche Differentialdiagnosen wie unspezifische Lymphadenopathien, Entzündungsprozesse oder auch Zysten mit in Betracht gezogen werden. Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung spielt die bildgebende Diagnostik eine wichtige Rolle. Hierbei sind insbesondere die Sonographie, die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) zu nennen. Mit Hilfe der Sonographie lassen sich intraglanduläre Läsionen von extraglandulären gut unterscheiden. Ein MRT ist für die korrekte Planung der chirurgischen Therapie von entscheidender Bedeutung, um die Begrenzungen des Tumors zu definieren [Guzzo et al., 2009]. Zur abschließenden Verifizierung eines Malignomverdachts ist jedoch in den meisten Fällen eine histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes erforderlich. Die Sicherung einer Probebiopsie bei Verdacht auf einen Speicheldrüsentumor gestaltet sich insbesondere im Bereich der Ohrspeicheldrüse schwierig, da eine Inzisionsbiopsie hier mit der Gefahr einer Verletzung des N. facialis verbunden ist. Mögliche Alternativen sind die Feinnadelaspirations-Biopsie (FNA-Biopsie) oder die intraoperative Sicherung der Diagnose mittels Schnellschnittuntersuchung [Khandekar et al., 2006, Zbären 2007].

### 1.1.4 Histologische Klassifikation

Nach der momentanen Klassifikation der WHO (Tab. 1) können über 20 maligne epitheliale Tumoren der Speicheldrüsen unterschieden werden [Barnes et al., 2005]. Im Folgenden sollen die wichtigsten Vertreter, insbesondere bezüglich des Tumorauftretens innerhalb des Patientenguts dieser Arbeit, beschrieben werden.

Tab. 1: Histologische Klassifikation der Speicheldrüsenmalignome (WHO 2005)

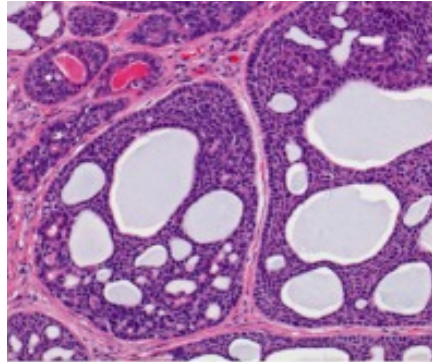
Tumorentität	ICD-O
<b>Azinuszellkarzinom</b>	8550/3
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	8430/3
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	8200/3
<b>Polymorphes low-grade Adenokarzinom</b>	8525/3
<b>Epitheliales-myoepitheliales Karzinom</b>	8562/3
<b>Klarzelliges Karzinom NOS (not otherwise specified)</b>	8310/3
<b>Basalzelladenokarzinom</b>	8147/3
<b>Talgdrüsenkarzinom</b>	8410/3
<b>Sebaziöses Lymphadenokarzinom</b>	8410/3
<b>Zystadenokarzinom</b>	8440/3
<b>Low-grade kribriiformes Zystadenokarzinom</b>	
<b>Muzinöses Adenokarzinom</b>	8480/3
<b>Onkozytäres Karzinom</b>	8290/3
<b>Duktales Adenokarzinom/Speichelgangkarzinom</b>	8500/3
<b>Adenokarzinom NOS (not otherwise specified)</b>	8140/3
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	8982/3
<b>Karzinom aus pleomorphen Adenom</b>	8941/3
<b>Karzinom aus Sarkom</b>	8980/3
<b>Metastasierendes pleomorphes Adenom</b>	8940/1
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	8070/3
<b>Kleinzelliges Karzinom</b>	8041/3
<b>Großzelliges Karzinom</b>	8012/3
<b>Lymphoepitheliales Karzinom</b>	8082/3
<b>Sialoblastom</b>	8974/1
ICD-O: International Classification of Diseases for Oncology Code /3: Malignom; Code /1: Borderline-Tumor	

#### **1.1.4.1 Adenoid-zystisches Karzinom (ICD-O: 8200/3)**

Bei ca. 15% aller malignen Speicheldrüsenneoplasien handelt es sich um ein adenoid-zystisches Karzinom [Ehrenfeld et al., 2011]. Der Tumor, der weder alters- noch geschlechtsspezifisch auftritt, kann sich in allen Speicheldrüsen manifestieren, betrifft aber oftmals die Gl. submandibularis und die kleinen Speicheldrüsen, insbesondere am Gaumen [Di Palma et al., 2006]. Dieser Tumor zeigt für eine maligne Neoplasie ein eher langsames Wachstum und kann aufgrund perineuraler Invasion zu früher Schmerzsymptomatik führen [Ehrenfeld et al., 2011]. Typisch für das adenoid-zystische Karzinom ist auch die Bildung von Fernmetastasen, wie z.B. in der Lunge oder den Knochen. Die Metastasierung in lokale Lymphknoten ist möglich, jedoch selten zu beobachten [Di Palma et al., 2006].

Das adenoid-zystische Karzinom besteht histopathologisch gesehen aus duktalem und myoepitheliale Zellen mit typischerweise hyperchromatischen, gewinkelten Zellkernen und klarem Zytoplasma und lässt sich in drei Wachstumstypen einteilen, wobei auch Mischformen vorkommen. Am häufigsten imponiert der kribriiforme Typ, der durch Zellnester und zylindromatöse mikrozystischen Hohlräume das für ihn typische „Schweizer-Käse-Muster“ (Abb. 1) formt. Der tubuläre Typ zeichnet sich durch kleine Tubuli aus, die im Inneren des Lumens mit Epithelzellen und außen mit Myoepithelzellen bedeckt sind [El-Naggar et al., 2005]. Zuletzt ist noch der solide Typ zu nennen, der sich durch inselartige Tumorzellnester mit gelegentlich komedoartiger zentraler Nekrose darstellt [Di Palma et al., 2006].





**Abb. 1: Adenoid-zystisches Karzinom: kribriiformes Wachstumsmuster mit multiplen Pseudozysten – Schweizer-Käse-Muster [Nagao et al., 2012]**

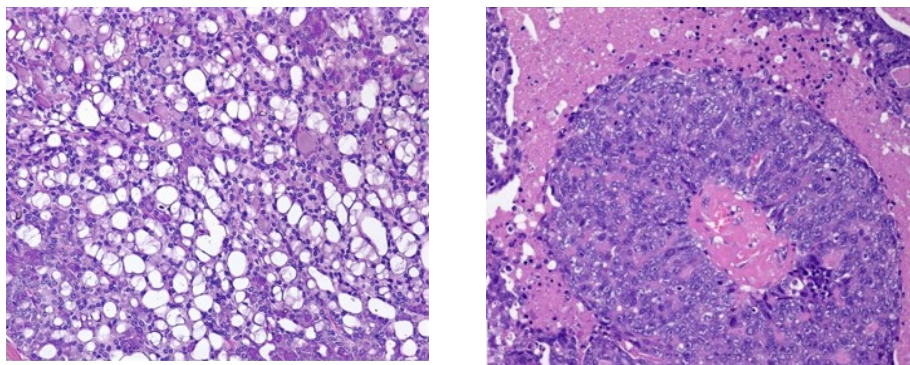
Bei einem adenoid-zystischen Karzinom liegt die 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) bei 62-88%, während die 15-JÜR hingegen nur noch bei 5-29% liegt, was dem langsamen Tumorwachstum und der Neigung zur späten Fernmetastasierung zuzuschreiben ist [Lang et al., 2005a]. Die histopathologischen Subtypen besitzen einen Einfluss auf die Prognose. Hierbei haben sowohl das tubuläre und kribriiforme Wachstumsmuster eine deutlich bessere Heilungschance als das aggressivere solide adenoid-zystische Karzinom [Di Palma et al., 2006].

#### **1.1.4.2 Azinuszellkarzinom (ICD-O: 8550/3)**

Das Azinuszellkarzinom ist eines der häufiger vorkommenden Malignome, das ca. 12-17% aller bösartigen Speicheldrüsentumoren repräsentiert und sich zu 92% in der Gl. parotidea manifestiert. Ein bilaterales Erscheinungsbild zeigt sich in 3% der Fälle [Di Palma et al., 2006]. Frauen sind tendenziell etwas häufiger betroffen als Männer mit einem Altersgipfel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr [Lang et al., 2005a]. Auch hier zeichnet sich der Tumor

wieder durch langsames, teils über Jahrzehnte andauerndes Wachstum aus, das gelegentlich durch eine periphere Fazialisparese und Schmerzen symptomatisch wird [Di Palma et al., 2006]. Die Metastasierung findet hier bevorzugt über den lymphogenen Weg statt. Fernmetastasen sind selten [Lang et al., 2005a].

Histopathologisch lässt sich eine Differenzierung in vier verschiedene Wachstumsmuster feststellen. Es handelt sich hierbei um solide (Abb. 2 rechts), mikrozystische (Abb. 2 links), follikuläre und papillär-zystische Formen, die keine gesicherte prognostische Bedeutung haben. Nicht selten findet man auch Blutungen, Nekrosen und (Pseudo)zysten [Lang et al., 2005a].



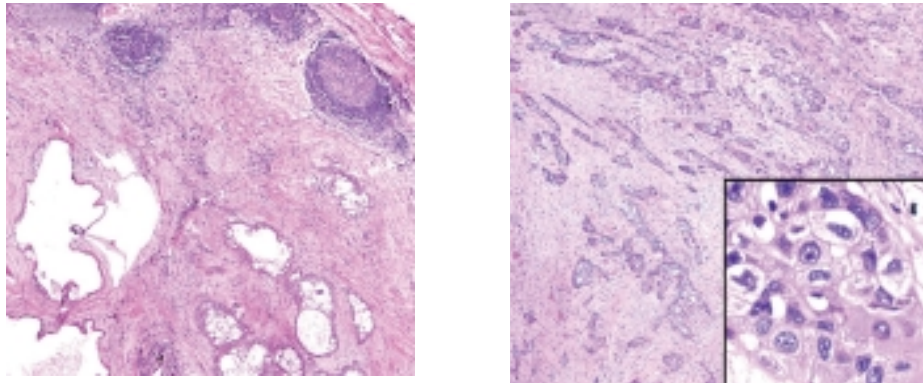
**Abb. 2: Azinuszellkarzinom: mikrozystisches (links) und solides Wachstumsmuster mit Nekrosen (rechts) [Nagao 2013]**

Die 5-JÜR wird beim Azinuszellkarzinom mit 78-100% angegeben, so dass die Tumoren zumeist als niedrig maligne bezeichnet werden können. Rezidive können in 12-44% der Fälle beobachtet werden. Die Sterberate liegt tumorbezogen bei ca. 16% [Ehrenfeld et al., 2011]. Prognostisch bedeutsam sind das Tumorstadium und eine vollständige Resektion. Ein langfristiges Follow-up ist wegen spät auftretender Lokalrezidive obligat [Lang et al., 2005a].

### 1.1.4.3 Mukoepidermoidkarzinom (ICD-O: 8430/3)

Das Mukoepidermoidkarzinom ist mit 22% aller malignen Speicheldrüsenneoplasien der am häufigsten vorkommende Tumor [Ehrenfeld et al., 2011]. 53% dieser Tumorentität betrifft die großen Speicheldrüsen, insbesondere die Gl. parotidea mit knapp der Hälfte aller Fälle, aber auch gelegentlich die Gl. submandibularis (7%) und Gl. sublingualis (1%). Bei Befall der kleinen Speicheldrüsen manifestiert sich das Mukoepidermoidkarzinom bevorzugt im Bereich des Gaumens und der bukkalen Mukosa. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 45 Jahre mit einer Bevorzugung des weiblichen Geschlechts (3:2), wobei auch Kinder und Jugendliche betroffen sein können. 60% aller Patienten, die Läsionen am Gaumen aufweisen, sind jünger als 40 Jahre [Goode et al., 2005]. Der Tumor imponiert als derbe, unverschiebliche Schwellung, die meist schmerzlos ist. Bei oberflächlichen intraoralen Läsionen ähnelt das Malignom durch seine bläulich-rote Färbung einer Retentionszyste oder einem vaskulären Defekt. Gelegentlich wird auch eine Arrosion der Kortikalis beobachtet. Klinisch zeigen sich Symptome wie Blutungen, Otorrhoe, Kieferklemme, Schluckstörungen, Parästhesien, Schmerzen und periphere Lähmungserscheinungen des N. facialis [Goode et al., 2005].

Beim Mukoepidermoidkarzinom lassen sich histopathologisch ein hoch und ein niedrig differenzierter Typ unterscheiden. Der hoch differenzierte Typ (low-grade) stellt sich in der Regel zystisch mit überwiegend reifen mukoiden, schleimbildenden Zellen dar. Kernpleomorphie und mitotische Aktivität sind nur gering ausgeprägt (Abb. 3 links). Der niedrig differenzierte Typ (high-grade) imponiert hingegen durch Blutungen und Nekrosen und zeigt vor allem epidermoide bzw. intermediäre Zelltypen mit deutlich erkennbarer Kernpleomorphie und erhöhter Mitoserate (Abb. 3 rechts) [Lang et al., 2005a]. Neuerdings wird zunehmend auch eine dreistufige Graduierung propagiert [Ellis und Auclair, 2003, Seethala, 2009].



**Abb. 3: Mukoepidermoidkarzinom: low-grade (links) mit zystischem Wachstumsmuster und high-grade (rechts) mit infiltrativem Wachstum [Seethala 2009]**

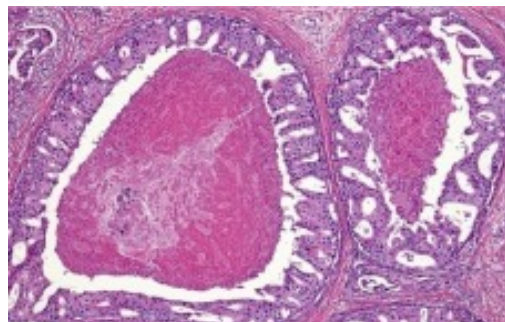
Je nach Differenzierungsgrad unterscheidet sich auch die Prognose. So hat ein Patient mit einem hoch differenzierten Mukoepidermoidkarzinom eine sehr gute 5-JÜR von über 90%, während die Prognose für ein niedrig differenziertes Malignom mit einer 5-JÜR von nur 49% deutlich schlechter ist. Auch die Rate an lokalen Rezidiven ist mit 74% beim niedrig differenzierten Mukoepidermoidkarzinom signifikant höher [Lang et al., 2005a].

#### **1.1.4.4 Speicheldrüsenkarzinom (ICD-O: 8500/3)**

Das Speicheldrüsenkarzinom (duktales Adenokarzinom) ist ein seltener, aber hochmaligner Tumor, der etwa 1-3% aller bösartigen Speicheldrüsenneoplasien darstellt und sich überwiegend in der Gl. parotidea manifestiert. Diese Entität kann entweder neu entstehen oder sich als maligne Variante aus einem pleomorphen Adenom (Karzinom ex pleomorphes Adenom) entwickeln [Kallianpur et al., 2012]. Die Mehrzahl der erkrankten Patienten ist männlich (Verhältnis 3:1) und über 50 Jahre alt [Di Palma et al., 2006]. Dieses Malignom

zeichnet sich durch ein schnelles und aggressives Wachstum aus, was zu früher Metastasierung sowohl in lokalen Lymphknoten als auch in entfernten Geweben wie Knochen, Leber und Lunge führt. Bei Lokalisation in der Gl. parotidea kommt es häufiger zu einer Infiltration des N. facialis [Kallianpur et al., 2012].

Histopathologisch besteht das Speichelgangkarzinom aus intraduktalen und invasiven Komponenten und zeigt eine auffallend starke Ähnlichkeit zum duktalem Mammakarzinom. Die intraduktalen Bestandteile imponieren kribriform (Abb. 4), papillär oder solide mit komedoartigen zentralen Nekrosen. Die invasive Fraktion ist durch größere Zellnester gekennzeichnet, die desmoplastische Reaktionen auslösen [Kallianpur et al., 2012].



**Abb. 4: Speichelgangkarzinom: erweiterter Duktus mit kribriformen Wachstumsmuster und komedoartigen Nekrosen [Nagao et al., 2012]**

Die Prognose bei einem diagnostizierten Speichelgangkarzinom ist als schlecht einzustufen, da aufgrund der Aggressivität des Tumors und der hohen Rezidivrate über 70% der erkrankten Patienten innerhalb von 3 Jahren versterben. Ein wichtiger Faktor zur Prognoseeinschätzung ist die Größe des Malignoms, da Tumordurchmesser unter 30 mm als prognostisch günstiger zu bewerten sind [Di Palma et al., 2006].

#### 1.1.4.5 Sonstige

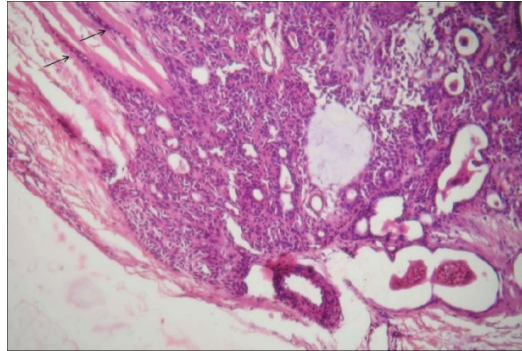
Weitere nennenswerte Entitäten bezüglich dieser Arbeit sind das myoepitheliale Karzinom (ICD-O: 8982/3), das Plattenepithelkarzinom (ICD-O: 8070/3) und das Karzinom ex pleomorphes Adenom (ICD-O: 8941/3).

Das myoepitheliale Karzinom oder auch malignes Myoepitheliom tritt durchschnittlich im Alter von 55 Jahren auf und ist nicht geschlechtsspezifisch. Vornehmlich ist dieser Tumor in der Gl. parotidea zu finden, kann sich aber auch in der Gl. submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen manifestieren. Die Hälfte aller Fälle entstehen aus benignen Neoplasien wie dem pleomorphen Adenom oder einem gutartigen Myoepitheliom [Di Palma et al., 2006]. Das myoepitheliale Karzinom wächst langsam und häufig perineural infiltrierend, eine Metastasierung ist sehr selten [Ehrenfeld et al., 2011, Di Palma et al., 2006]. Mikroskopisch lassen sich atypische myoepitheliale, mitotisch sehr aktive Zellen beobachten [Ehrenfeld et al., 2011]. 33% der Patienten versterben an diesem Malignom, ebenso viele entwickeln einen Residualtumor [Di Palma et al., 2006].

Bei weniger als 1% aller malignen Speicheldrüsenneoplasien handelt es sich um ein Plattenepithelkarzinom, das zu 80% in der Gl. parotidea und zu 20% in der Gl. submandibularis vorkommt. Die Patienten sind zu meist männlich und im Alter zwischen 60 und 80 Jahren mit einem Altersgipfel zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr. Eine vorausgegangene Strahlentherapie in der Kopf-Hals-Region kann eine Tumorentwicklung begünstigen [Lewis et al., 2005]. Das Plattenepithelkarzinom imponiert durch schnelle Größenzunahme, derbe Konsistenz und oftmals einer zentralen Nekrose sowie einer Infiltration von perineuralem Gewebe mit entsprechender Schmerz- und Lähmungssymptomatik. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der Tumor häufig schon weit

fortgeschritten. Histologisch gleicht das Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüsen den anderen im Kopf-Hals-Bereich vertretenden Plattenepithelkarzinomen [Lewis et al., 2005]. Mehr als die Hälfte der Patienten entwickelt ein Lokalrezidiv und in 20-45% der Fälle sind Lymphknotenmetastasen zu beobachten. Die 5-JÜR liegt bei 25% [Ehrenfeld et al., 2011]. Vor Diagnosestellung eines primären Plattenepithelkarzinoms der Speicheldrüsen muss immer eine Metastase eines Plattenepithelkarzinoms, z.B. eines kutanen Plattenepithelkarzinoms der Stirnregion, ausgeschlossen werden [Yilmaz et al., 2012].

Das Risiko der malignen Transformation eines pleomorphen Adenoms liegt bei knapp 5% und erhöht sich durch lange Bestehensdauer und häufige Rezidivierung [Ehrenfeld et al., 2011]. Ca. 12% aller maligner Speicheldrüsenneoplasien werden als Karzinom ex pleomorphes Adenom diagnostiziert, wobei die Mehrheit der Patienten männlich und über 60 Jahre alt ist [Gnepp et al., 2005]. Der Tumor ist in 70% der Fälle in der Gl. parotidea zu finden, 12% betreffen die Gl. submandibularis und 10% die kleinen Speicheldrüsen, insbesondere am Gaumen [Ehrenfeld et al., 2011]. Klinisch imponiert der Übergang in ein Karzinom durch eine plötzliche und schnelle Größenzunahme des vorher bestehenden benignen Tumors. Einen weiteren Hinweis auf eine maligne Transformation gibt das Auftreten einer peripheren Parese des N. facialis. Das Karzinom ex pleomorphes Adenom lässt sich in drei Gruppen unterteilen, die hinsichtlich der Prognose von Bedeutung sind. Bei der nicht-invasiven Form ist die Kapsel, die das pleomorphe Adenom begrenzt, nicht infiltriert. Die minimal invasive Form hingegen penetriert bis zu 1,5 mm in das umliegende extrakapsuläre Gewebe (Abb. 5). Die invasive Form dringt um mehr als 1,5 mm in die benachbarten Strukturen ein [Gnepp et al., 2005].



**Abb. 5: Karzinom ex pleomorphes Adenom: minimal invasive Infiltration der Kapsel [Kini et al., 2012]**

Histopathologisch handelt es sich häufig um niedrig differenzierte Speicheldrüsenkarzinome, undifferenzierte Karzinome und Adenokarzinome NOS [Gnepp et al., 2005]. Die Prognose des Karzinoms ex pleomorphes Adenom hängt zum einen vom Invasionsgrad, zum anderen von der entstandenen Tumorentität ab. Bei nicht-invasiven und minimal invasiven Formen ist die Prognose eher günstig. Beim invasiven Typ hingegen handelt es sich um eine sehr aggressive und hoch-maligne Form, bei der die betroffenen Patienten in bis zu 50% der Fälle ein Rezidiv und bis zu 70% sowohl lokale als auch Fernmetastasen entwickeln. Die 5-JÜR wird mit 25-65%, die 10-JÜR mit 18-50% angegeben [Gnepp et al., 2005]. Bezüglich des entstandenen Subtyps impliziert ein Speicheldrüsenkarzinom im pleomorphen Adenom eine wesentlich schlechtere Prognose als zum Beispiel ein entstandenes niedrig-malignes Mukoepithelkarzinom [Seethala, 2009]. Aus diesem Grund wird das Karzinom ex pleomorphes Adenom in manchen Untersuchungen nicht mehr als eigene Entität geführt, sondern dem entstandenen Subtyp zugeordnet [Ettl et al., 2012a].



## 1.1.5 Staging

### 1.1.5.1 TNM-Klassifikation

Um eine möglichst adäquate Therapie planen und durchführen zu können, ist eine genaue Erhebung der Anamnese des Patienten, sowie Bestimmung der Entität, Lokalisation, Ausdehnung und möglichen Metastasierung des Tumors unumgänglich. Mittels des sogenannten „Stagings“ lassen sich alle diese Informationen sammeln und mit Hilfe des TNM-Schemas der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) klassifizieren, welches aus drei Kategorien besteht:

T      Ausdehnung des Primärtumors

N      Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen

M      Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen

Die TNM-Klassifikation (Tab. 2) lässt sich noch in zwei Subtypen gruppieren. Die präoperative, klinische Einteilung wird durch ein kleines vorangestelltes „c“ gekennzeichnet, die postoperative, histopathologische dagegen erhält ein kleines „p“. Mit Hilfe der TNM-Klassifikation lässt sich für jedes Malignom eine entsprechende Tumorformel kreieren und dadurch eine Zuordnung zum entsprechenden Tumorstadium vornehmen (Tab. 3). Dies ist für eine suffiziente Therapieplanung und anschließende Prognosestellung von entscheidender Bedeutung [Ehrenfeld et al., 2011, Sobin et al., 2009].

Tab. 2: TNM-Klassifikation der großen Kopfspeicheldrüsen nach UICC von 2009

T-Status (Primärtumor)	
<b>TX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar
<b>T0</b>	Keine Anhaltspunkte für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	≤ 2 cm, keine Infiltration in umliegendes Gewebe
<b>T2</b>	2-4 cm, keine Infiltration in umliegendes Gewebe
<b>T3</b>	> 4 cm und/oder Infiltration in umliegendes Gewebe
<b>T4a</b>	Infiltration von Haut, Mandibula, äußeren Gehörgang oder N. facialis
<b>T4b</b>	Infiltration von Schädelbasis, Proc. pterygoideus oder A. carotis int.
N-Status (regionäre Lymphknoten)	
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden
<b>N1</b>	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten ≤ 3 cm
<b>N2a</b>	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten 3-6 cm
<b>N2b</b>	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
<b>N2c</b>	Metastase(n) in kontralateralem oder bilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
<b>N3</b>	Metastase(n) > 6 cm
M-Status (Fernmetastasen)	
<b>MX</b>	Fernmetastasen nicht beurteilbar
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen vorhanden
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden

Tab. 3: Stadieneinteilung

Stadieneinteilung			
<b>Stadium I</b>	T1	N0	M0
<b>Stadium II</b>	T2	N0	M0
<b>Stadium III</b>	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
<b>Stadium IVA</b>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>Stadium IVB</b>	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
<b>Stadium IVC</b>	Jedes T	Jedes N	M1

### 1.1.5.2 C-Faktor

Um eine akkurate Aussagekraft der Tumorformel zu gewährleisten, wurde diese um den sogenannten Sicherheitsfaktor oder C-Faktor (C = certainty) ergänzt. Durch dieses Hilfsmittel kann nun beurteilt werden, auf welchen diagnostischen Grundlagen die Tumorformel basiert (Tab. 4) [Ehrenfeld et al., 2011].

Tab. 4: Sicherheitsfaktor für Lippe, Mundhöhle, Oropharynx, Nasenhaupt- und –nebenhöhlen

C-Faktor	
<b>C1</b>	Standardverfahren, wie klinische Untersuchung, konventionelles Röntgen usw.
<b>C2</b>	Spezielle Maßnahmen, wie Sonographie, CT, MRT, Biopsie
<b>C3</b>	Ergebnisse der chirurgischen Exploration, Zytologie oder Biopsie
<b>C4</b>	Befund bei definitiven Eingriff (vollständige histopathologische Aufbereitung des Resektats; entspricht der pTNM-Klassifikation)
<b>C5</b>	Ergebnis nach Autopsie mit histopathologischer Untersuchung

### 1.1.5.3 Grading

Da sich maligne Neoplasien in ihrem Verhalten bezüglich Wachstum, Metastasierungseigung und Aggressivität unterscheiden, wurde zur besseren Beurteilung die histologische Graduierung eingeführt. Kriterien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades sind z.B. Mitoseaktivität, Atypie der Zellkerne, Zellreichtum, Veränderungen im Zytoplasma oder etwa das Vorhandensein von Nekrosen [Ehrenfeld et al., 2011]. Bei den Speicheldrüsenkarzinomen lassen sich zwei Graduierungssysteme unterscheiden. Zum einen die zweigliedrige Einteilung

in „low-grade“ und „high-grade“, zum anderen eine je nach Autor drei- bzw. viergliedrige Typisierung [Lang et al., 2005a].

Aufgrund des großen Spektrums der Speicheldrüsenkarzinome gibt es kein einheitliches Grading-System, d.h. die verschiedenen Entitäten müssen gesondert betrachtet werden [Lang et al., 2005a]. Einige Entitäten werden entsprechend oben genannter Kriterien zusätzlich graduiert, andere werden entsprechend ihres Wachstumsmusters und ihrer Prognose als Ganzes einem Malignitätsgrad zugeordnet (Tab. 5) [Schwarz-Furlan, 2011]. So werden z. B. Speicheldrüsenneoplasien wie das Azinuszellkarzinom, das gut differenzierte Mukoepidermoidkarzinom (G1 nach WHO) oder das polymorphe niedrig-maligne Karzinom als niedrig-maligne klassifiziert. Hingegen wird das Speichelgangkarzinom, das gering differenzierte Mukoepidermoidkarzinom (G3 nach WHO) oder das solide adenoid-zystische Karzinom der hoch-malignen Gruppe (G3) zugeteilt. Eine Zwischenstufe mit intermediärem Malignitätsgrad (G2) stellen das mittelgradig differenzierte Mukoepidermoidkarzinom (G2 nach WHO), das tubuläre und kribriforme adenoid-zystische Karzinom oder das myoepitheliale Karzinom dar. Für das Karzinom ex pleomorphes Adenom gibt es keine eigene Graduierung, es wird je nach malignem Tumorgewebe der entsprechenden Gruppe zugeordnet. Meist handelt es sich aber um den hoch-malignen Grad (G3) [Schwarz-Furlan, 2011].

Tab. 5: Dreistufiges Graduierungssystem [Schwarz-Furlan, 2011]

Differenzierungsgrad	
<b>Grad 1</b>	gut differenziertes MukoepidermoidCa (G1 nach WHO), AzinuszellCa, epithelial-myoepitheliales Ca, BasalzelladenoCa, polymorphes niedrig-malignes Ca, niedrig-malignes kribriiformes ZystadenoCa
<b>Grad 2</b>	mittelgradig differenziertes MukoepidermoidCa (G2 nach WHO), tubuläres und kribriiformes adenoid-zystisches Ca, myoepitheliales Ca
<b>Grad 3</b>	gering differenziertes MukoepidermoidCa (G3 nach WHO), duktales AdenoCa, AdenoCa NOS, onkozytäres Ca, solides adenoid-zystisches Ca, entdifferenziertes Azinus- und BasalzellCa

#### 1.1.5.4 R-Klassifikation

Von prognostisch wichtiger Bedeutung ist das postoperative Vorhandensein bzw. Fehlen von Restgewebe des Malignoms, welches durch die R-Klassifikation (Tab. 6) zum Ausdruck gebracht wird [Wittekind, 2010]. Auch im Hinblick auf die Notwendigkeit einer adjuvanten Strahlentherapie ist der R-Status von entscheidender Relevanz.

Tab. 6: R-Klassifikation [Wittekind, 2010]

R-Klassifikation	
<b>RX</b>	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
<b>R0</b>	Kein Residualtumor
<b>R1</b>	Mikroskopischer Residualtumor
<b>R2</b>	Makroskopischer Residualtumor

### **1.1.6 Therapie**

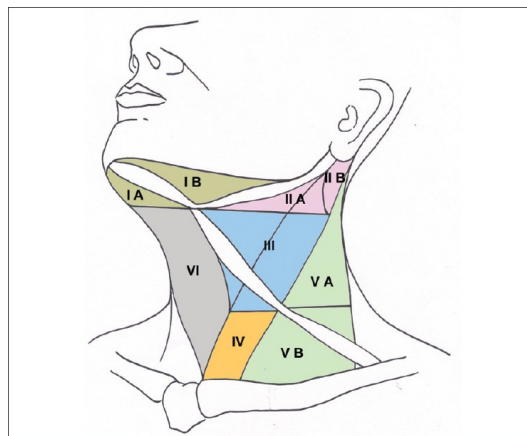
Bei malignen Speicheldrüsenneoplasien ist der Therapieansatz in Abhängigkeit von Tumorausdehnung und Lokalisation, histologischem Differenzierungsgrad, Vorhandensein von Metastasen und dem Allgemeinzustand des Patienten zu wählen. Man unterscheidet die kurative von der palliativen Therapie. Eine kurative Behandlung mit dem Ziel einer Heilung des Patienten ist vor allem dann anzustreben, wenn eine komplette Resektion des Malignoms bezüglich Größe und Lokalisation des Tumors und dem Allgemeinbefinden des Patienten realisierbar ist. Dem entgegen steht die Palliativtherapie, die aufgrund von ausgedehntem Tumorwachstum, Infiltration in lebenswichtige Strukturen, (Fern-)metastasen oder dem schlechten Allgemeinzustand des Erkrankten das Tumorleiden lediglich mildern kann [Ehrenfeld et al., 2011]. Im Folgenden soll näher auf die einzelnen Therapiemöglichkeiten eingegangen werden.

#### **1.1.6.1 Resektive Verfahren**

Die Therapie der Wahl bei Speicheldrüsenmalignomen ist die komplette (radikale) Resektion des tumorösen Gewebes und erfolgt in der Regel en bloc und „in sano“ [Metelmann et al., 2007]. Tumorfremde Ränder sind dann zu erreichen, wenn je nach Entität ein Sicherheitsabstand im Gesunden in alle Richtungen eingehalten wird. Um dies zu überprüfen, werden intraoperativ häufig Schnellschnitte der Resektionsgrenzen angefertigt und vom Pathologen befundet. Eine entsprechende Markierung der Präparate zur sicheren Orientierung ist obligat. Anschließend kann bei Bedarf nachreseziert werden.

Besteht der Verdacht auf Metastasen in den regionären Lymphknoten bzw. wurden diese bereits diagnostiziert, so ist eine Lymphadenektomie angezeigt [Ehrenfeld et al., 2011]. Zur

topographischen Orientierung lassen sich die regionären Halslymphknoten in sechs Level und sechs Sublevel einteilen (Abb. 6). Level I lässt sich in eine submentale (Level Ia) und eine submandibuläre (Level Ib) Region aufteilen. Die kraniojuguläre Lymphknotengruppe (Level II) wird durch den N. accessorius separiert. Der obere Part entspricht dem Level Iib, der untere dem Level Iia. Level III enthält die mediojugulären und Level IV die kaudojugulären Lymphknoten. Level V entspricht dem hinteren Halsdreieck und wird auf Höhe des Ringknorpels in das oberhalb liegende Sublevel Va und das untere Sublevel Vb unterteilt. Die Lymphknoten des vorderen Kompartiments werden dem Level VI zugeordnet [Robbins et al., 2002, Reichert et al., 2012].



**Abb. 6: Lokalisation der Halslymphknoten [Pitak-Arnop et al., 2012]**

Die Ausräumung der Level, auch Neck Dissection genannt, wird wie folgt klassifiziert [Robbins et al., 2002]:

- Radikale Neck Dissection
- Modifizierte radikale Neck Dissection
- Selektive Neck Dissection
- Erweiterte radikale Neck Dissection

Bei einer radikalen Neck Dissection werden nicht nur alle Lymphknotenlevel I-V ausgeräumt, sondern auch die angrenzenden Strukturen M. sternocleidomastoideus, N. accessorius und V. jugularis interna mit entfernt. Aufgrund von gesteigerten Morbiditätsraten und der begrenzten Option einer beidseitigen radikalen Neck Dissection ist diese Operation selten indiziert. Sollte dennoch ein bilateraler Eingriff unumgänglich sein, muss die zweite Seite in einer weiteren Operation nach 4-6 Wochen ausgeräumt werden [Reichert et al., 2012].

Im Unterschied dazu wird bei der modifizierten radikalen Neck Dissection zwar auch eine Entfernung der Lymphknotengruppen der Level I-V durchgeführt, aber es bleibt mindestens eine der drei nicht-lymphatischen Strukturen erhalten (Tab. 7) [Maurer et al., 2010].

*Tab. 7: Einteilung der modifizierten radikalen Neck Dissection [Maurer et al., 2010]*

Modifizierte radikale Neck Dissection	
Typ	Erhaltene Struktur
<b>I</b>	N. accessorius
<b>II</b>	N. accessorius, V. jugularis interna
<b>III</b>	N. accessorius, V. jugularis interna, M. sternocleidomastoideus

Zwischen zwei und vier Level werden bei der selektiven Neck Dissection ausgeräumt und zugleich werden alle nicht-lymphatischen Strukturen geschont. Welche Level operativ behandelt werden, hängt von der Tumorentität und dem zugehörigen lymphogenen Metastasierungsmuster ab [Robbins et al., 2002].

Werden zusätzlich zu den im Rahmen einer radikalen Neck Dissection zu entfernenden Strukturen weitere Gruppen von Lymphknoten (z.B. parapharyngeal) oder nicht-lymphatische Gewebe wie der N. hypoglossus reseziert, handelt es sich um eine erweiterte radikale Neck Dissection [Robbins et al., 2002].



Die Notwendigkeit einer Lymphadenektomie bei malignen Speicheldrüsenneoplasien hängt von Faktoren wie Entität, Differenzierungsgrad, Lokalisation und Größe des Tumors ab [Ettl et al., 2012a]. Im Allgemeinen ist die lymphogene Metastasierung bei Speicheldrüsenmalignomen mit 14-20% relativ gering und betrifft vor allem high-grade (G3) Tumoren (Metastasierung bis zu 60%) und solche mit fortgeschrittener Tumorgöße [Guzzo et al., 2009].

Sobald der Verdacht auf eine Lymphknotenmetastasierung besteht, wird eine therapeutische Neck Dissection durchgeführt [Ettl et al., 2012a]. Bei präoperativ eindeutiger Lymphknotenmetastasierung kommt dabei eine radikale oder modifiziert-radikale Lymphknotenausräumung zur Anwendung [Zbären et al., 2011].

Gibt es präoperativ keinerlei Hinweise auf mögliche Lymphknotenmetastasen (cN0-Situation) kann eine elektive bzw. prophylaktische Neck Dissection in Betracht gezogen werden, was in der Literatur aber kontrovers diskutiert wird [Zbären et al., 2011]. Aufgrund von okkulten Metastasen, die sich in 12-53% der Fälle nachweisen lassen, ist ein solcher Eingriff mit Ausräumung der Level I-III dennoch sinnvoll [Carlson et al., 2013]. Die elektive Neck Dissection ist besonders bei duktalem Adenokarzinomen zu empfehlen, da hier mit erhöhter lymphogener Metastasierung von 60-80% zu rechnen ist [Bootz et al., 2008]. Bei Karzinomen, die in der Gl. parotidea lokalisiert sind, sollte zusätzlich die Ausräumung der Level IV und V in Erwägung gezogen werden [Guzzo et al., 2009].

Davon abzugrenzen ist die chirurgische Therapie des Karzinoms. Die Resektion von Malignomen der kleinen Speicheldrüsen entspricht dabei etwa dem operativen Procedere bei oralen Plattenepithelkarzinomen [Ettl et al., 2012a].

Ist der maligne Tumor in der Gl. sublingualis lokalisiert, so wird dieser samt Drüse entfernt. Der Zugang erfolgt in der Regel von intraoral und wenn möglich unter Schonung des N. lingualis und Ductus submandibularis [Ehrenfeld et al., 2011]. Eine Infiltration des N. lingualis und der Mandibula ist dennoch häufig. Bei der Resektion müssen dementsprechend

diese Strukturen mit entfernt werden ebenso wie die Gl. submandibularis der ipsilateralen Seite. Zusätzlich ist eine selektive funktionelle Lymphknotenausräumung der Level I-III vorteilhaft [Rinaldo et al., 2004].

Maligne Neoplasien, die sich in der Gl. submandibularis manifestieren, werden von extraoral mit besonderer Berücksichtigung der nervalen Strukturen (R. marginalis mandibulae des N. facialis, N. lingualis, N. hypoglossus) en Bloc mit der Drüse entfernt. Dieser Vorgang wird Submandibulektomie genannt [Ehrenfeld et al., 2011]. Eine Neck Dissection der Level I-III ist auch hier zu befürworten [Ettl et al., 2012a].

Die Parotidektomie lässt sich in drei Modifikationen einteilen. Der am wenigsten invasive Eingriff ist die laterale Parotidektomie. Die Gl. parotidea wird durch den N. facialis in zwei Teile separiert, ein kleineres mediales und ein größeres laterales Kompartiment. Bei der lateralen Parotidektomie, die bei benignen Neoplasien zum Einsatz kommt, wird nur der laterale Anteil unter Darstellung und Erhalt des N. facialis entfernt [Ehrenfeld et al., 2011].

Wurde ein Malignom der Gl. parotidea diagnostiziert, so wird in der Regel entweder eine totale oder eine radikale Parotidektomie durchgeführt. Bei gut abgekapselten niedrig-malignen Karzinomen ist eine partielle Parotidektomie möglich, vorausgesetzt der Tumor befindet sich im lateralen Parotis-Lappen [Moore et al., 2007].

Zeigt der Patient noch keine paralytischen Symptome im Versorgungsgebiet des N. facialis, so kann davon ausgegangen werden, dass keine Infiltration vorliegt. Ein Erhalt des Nervs ist somit anzustreben (totale Parotidektomie) [Lang et al., 2005b]. Bei der totalen operativen Entfernung der Gl. parotidea müssen die Äste des N. facialis dargestellt und freipräpariert werden [Ehrenfeld et al., 2011]. Als Folge des operativen Eingriffs tritt dennoch bei knapp der Hälfte aller Patienten eine temporäre, in 6% eine dauerhafte Fazialisparese auf [Baghi et al., 2009].

Ist der N. facialis bereits infiltriert oder werden dessen Äste vom Malignom vollständig umschlossen, ist eine radikale Parotidektomie unter Mitnahme und ggf. Rekonstruktion des

N. facialis unumgänglich. Eine erweiterte Resektion ist nötig, wenn umliegend Strukturen wie der M. masseter, der Jochbogen oder der aufsteigenden Ast der Mandibula von tumorösen Zellen infiltriert werden [Eckel et al., 2011]. Bei Parotiskarzinomen wird eine Lymphadenektomie der Level I-V empfohlen, da eine Metastasierung häufig auch die Level IV (38%) und Level V (42%) betrifft [Chisholm et al., 2011].

### **1.1.6.2 Strahlentherapie**

Ziel der postoperativen adjuvanten Strahlentherapie ist es, eine lokoregionäre Rezidiventwicklung zu verhindern. Deshalb ist diese Form der Therapie besonders bei Patienten mit ausgedehntem Tumorwachstum ( $\geq T3$ ), diagnostizierten Lymphknotenmetastasen, perineuralem Wachstum und Infiltration von angrenzenden knöchernen Strukturen und/oder des N. facialis indiziert. Konnte der geforderte Sicherheitsabstand nicht eingehalten werden ( $< 5\text{mm}$ ) oder sind sogar tumoröse Zellen an den Rändern des Resektats vorhanden (R1-Status), so ist ebenfalls eine anschließende Bestrahlung sinnvoll [Terhaard, 2011]. Auch bei Rezidiven, high-grade (G3) Tumoren und adenoid-zystischen Karzinomen empfiehlt sich die postoperative Radiatio [Lang et al., 2005b]. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Strahlentherapie im Anschluss an die operative Behandlung bei oben genannten Indikationen zu einer verbesserten lokalen Tumorkontrolle führt [Carlson et al., 2013]. Trifft bei Patienten keiner dieser negativen Prognosefaktoren zu, so ist eine rein chirurgische Therapie bei einer damit zur erreichenden lokoregionären Tumorkontrolle von 90% ausreichend [Terhaard, 2011].

Davon abzugrenzen ist die alleinige primäre Radiatio bzw. Radiochemotherapie ohne vorherige operative Therapie des Speicheldrüsenmalignoms, wobei diesem Behandlungsschema eine kurative oder auch palliative Intention zu Grunde liegen kann. Eine

kurative Zielsetzung gilt als Möglichkeit für Patienten, für die ein chirurgischer Eingriff mit zu hohem Komplikationsrisiko verbunden ist. Auch bei inoperablen Tumoren und bei Patienten, die eine Operation ablehnen, ist die primäre Strahlentherapie anwendbar.

Eine palliative Bestrahlung kann ausschließlich zur Symptomkontrolle eingesetzt werden [Terhaard, 2011].

### **1.1.6.3 Systemische Therapieformen**

Die Systemtherapie im Sinne einer Chemotherapie kommt hauptsächlich zur Palliativbehandlung von Patienten zur Anwendung, die aufgrund von Metastasen und Rezidiven nicht mehr durch chirurgische Eingriffe oder Bestrahlung kurativ therapiert werden können [Harrington et al., 2011]. Nicht alle Entitäten sprechen gleich gut auf Chemotherapeutika an [Bootz et al., 2008]. Es zeigt sich, dass sowohl bei der Mono- als auch bei der Kombitherapie platinbasierende Präparate von Vorteil sind. So sprechen beispielsweise adenoid-zystische Karzinome, Azinuszellkarzinome und duktale Adenokarzinome ähnlich gut auf die Kombination aus Cyclophosphamid, Doxorubicin und Cisplatin an. Mukoepidermoidkarzinome sind hingegen mit Präparaten zu behandeln, die auch wirksam gegen Plattenepithelkarzinome sind. Beispiele hierfür sind Methotrexat, Cisplatin und 5-Fluorouracil. Dennoch ist unklar, ob die kombinierte Therapie der Monotherapie überlegen ist [Carlson et al., 2013].

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit im Rahmen einer systemischen Therapie stellt während der letzten Jahre die Antikörpertherapie dar. Imatinib ist ein biologischer Wirkstoff, der als Tyrosinkinase-Inhibitor gegen das in adenoid-zystischen Karzinomen erhöht exprimierte C-KIT wirkt. Gefitinib und Cetuximab hemmen die EGFR-Expression, Lapatinib die von EGFR und HER-2. Weitere Agentien sind Trastuzumab und Bortezomib. Ersteres ist ein

monoklonaler Antikörper, der die Überexpression von HER-2 blockiert. Bei Bortezomib handelt es sich um einen Proteasomen-Inhibitor, der in den Zellstoffwechsel eingreift und dadurch das Tumorwachstum reduziert. Bisher ist das Ansprechen auf diesen relativ neuen Therapieansatz noch wenig aussagekräftig. Dennoch konnte z.B. bei 36% aller Patienten, die mit Lapatinib behandelt wurden, eine Tumorstagnation für mehr als sechs Monate beobachtet werden [Harrington et al., 2011].

### **1.1.7 Prognosefaktoren**

Maligne Neoplasien der Speicheldrüsen sind sehr selten und zeigen unterschiedliche Eigenschaften, was die Bestimmung prognostischer Faktoren erschwert. Die aussagekräftigsten Merkmale sind derzeit Tumorgroße, lymphogene und hämatogene Metastasierung, Resektionsstatus, histologischer Subtyp und Differenzierungsgrad bzw. Malignitätsgrad und eine Invasion des N. facialis. Zusätzlich spielt auch das Alter der Patienten eine Rolle hinsichtlich der Prognose [Guzzo et al., 2009, Carlson et al., 2013].

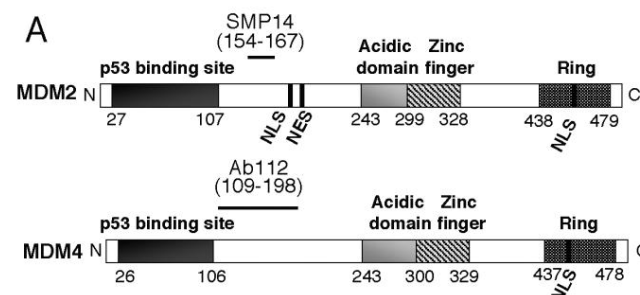
## **1.2 Genetik**

### **1.2.1 MDM4**

Sowohl MDM2 (Mouse double minute 2) als auch MDM4 (Mouse double minute 4) spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Tumorsuppressors p53 [Xiong 2013]. Beide besitzen ähnliche Grundstrukturen (Abb. 7) und binden an die Transaktivator-Domäne des p53-Proteins. Es kommt zur Hemmung der Transkriptionsaktivität, was die Tumorentstehung

begünstigt [Li et al., 2013, Yu et al., 2012]. Der Zusammenhang zwischen MDM2/MDM4 und p53 konnte durch Knockout-Mäuse bewiesen werden. Durch gezielte Manipulation des entsprechenden Gens in Mäusestammzellen, wie beispielsweise dem Verlust von MDM4, kam es zur embryonalen Letalität. Ist jedoch zugleich ein Verlust des p53-Proteins vorhanden, wurde keine erhöhte Letalität beobachtet [Li et al., 2013, Xiong 2013].

Das MDM4 Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1q32 lokalisiert und kodiert für ein p53-bindendes Protein. In vielen kanzerösen Geweben u.a. in Glioblastomen, Mammakarzinomen und oralen Plattenepithelkarzinomen konnten gehäuft Bindungen an den p53 Wildtyp, Amplifikationen oder auch Überexpression von MDM4 beobachtet werden [Yu et al., 2012, Mancini et al., 2009]. YU ET AL beschrieben außerdem, dass eine vermehrte Expression nicht nur die Tumorprogression fördert, sondern auch mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Yu et al., 2011]. VALENTIN-VEGA ET AL stellten in der Hälfte aller Fälle von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich eine MDM4 Überexpression und in 82% der Fälle eine erhöhte Aktivität von MDM4 im dysplastischen Epithel fest. Im gesunden Plattenepithel konnte keine MDM4 Expression nachgewiesen werden [Valentin-Vega et al., 2007].



**Abb. 7: Schematische Strukturen von MDM2 und MDM4 [Valentin-Vega et al., 2007]**

### 1.2.2 FGFR3

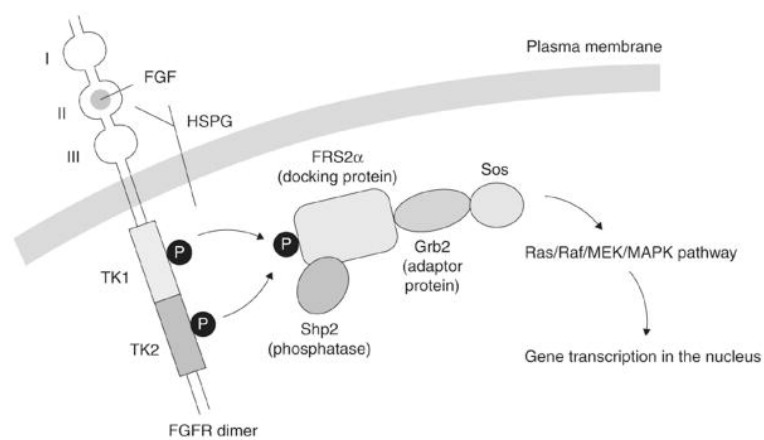
Bei den FGFR (Fibroblast growth factor receptor) Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine mit Tyrosinkinaseaktivität. Sie bestehen aus drei extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen und lassen sich in vier Subtypen (FGFR1 - FGFR4) unterscheiden [Korc et al., 2009]. Wird durch Ligandenbindung ein Rezeptor aktiviert (Abb.: 8), können verschiedene Reaktionswege initiiert werden, die letztendlich in einer Modifikation der Genexpression enden. Auf diesem Weg beeinflussen FGF-Rezeptoren maßgeblich verschiedenste Abläufe in Zusammenhang mit embryonaler Entwicklung und Gewebshomöostase bis hin zur Karzinogenese [Vairaktaris et al., 2006].

Da sich diese Arbeit u.a. auf FGFR3 fokussiert (siehe Fragestellung), wird im Folgenden nur auf FGFR3 eingegangen.

Das FGFR3 Protein wird von einem Gen kodiert, das auf dem Chromosom 4 in der Region 4p16.3 lokalisiert ist [Lafitte et al., 2013]. So bald ein FGF (Fibroblast growth factor) an den extrazellulären Teil des FGFR3-Rezeptors bindet, starten mehrere Transduktionskaskaden wie z.B. die MAP-Kinase (mitogen activated protein), die PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ) und die PI3-Kinase (Phosphoinositid-3). Diese initiieren Wachstum, Migration und Proliferation der Zellen [Tomlinson et al., 2012]. In manchen Zellentypen konnte allerdings festgestellt werden, dass durch die FGFR3-Aktivierung die Proliferation gehemmt wird, eine Differenzierung der Zellen stattfindet und die Apoptose induziert wird. Somit hat das FGFR3 die Eigenschaften eines Tumorsuppressors. Bei Mutationen oder Überexpression, sind Störungen im Zellzyklus die Folge und FGFR3 zeigt onkogene Eigenschaften [Lafitte et al., 2013].

Auslösende Mutationen von FGFR3 wurden als erstes in Blasen- und Zervixkarzinomen festgestellt. Später konnten auch in seborrhoischen Keratosen, epidermalen Nävi sowie in gutartigen Hauttumoren Mutationen von FGFR3 nachgewiesen werden [Lafitte et al., 2013].

Laut HENSON UND GOLLIN bewirkt FGFR3 eine Zunahme der Zellproliferation von Tumorzellen bei Mundhöhlenkarzinomen [Henson et al., 2010]. Auch VAIRAKTARIS ET AL. beschreiben eine Überexpression von FGFR3 bei dysplastischen und frühinvasiven Stadien des oralen Plattenepithelkarzinoms [Vairaktaris et al., 2006].



**Abb. 8: FGF/FGFR Komplex [Korc et al., 2009]**



## 2. Fragestellung

Im Hinblick auf diese Arbeit sollen folgende Aspekte berücksichtigt werden:

- Retrospektive Auswertung von klinischen Daten bezüglich Patienten, die aufgrund von Speicheldrüsenkarzinomen in der Zeit von 1990 bis 2008 in den Universitätskliniken Regensburg und Erlangen, sowie im Klinikum Nürnberg in den Abteilungen für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Behandlung waren.
- Analyse der genetischen Veränderung von MDM4 und FGFR3 mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH).

Daraus ergeben sich nachfolgende Fragen:

- Sind im oben genannten Patientenkollektiv genetische Aberrationen bei MDM4 und FGFR3 festzustellen?
- Bestehen Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern, Tumorentität, Malignitätsgrad und Genexpression?
- Sind Aberrationen obiger Gene für die Prognose der Tumorpatienten bedeutsam?

## **3. Patienten und Methoden**

### **3.1 Patientenkollektiv**

Das Gesamtkollektiv besteht aus 324 Patienten der Abteilungen für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie sowie für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätskliniken Regensburg und Erlangen und des Klinikums Nürnberg. Am gleichen Kollektiv wurden in der Vergangenheit bereits Datenanalysen und experimentelle Untersuchungen von Gewebeproben durchgeführt [Schwarz et al., 2011a, Schwarz et al., 2011b, Schwarz et al., 2012, Ettl et al., 2012a, Ettl et al., 2012b, Ettl et al., 2013, Müller et al., 2013]. Die Diagnose eines Speicheldrüsenkarzinoms wurde im Zeitraum von 1990 bis 2008 durch die zugehörigen pathologischen Institute gestellt. Die weiterführenden Therapien wurden an den oben genannten Kliniken durchgeführt.

Insgesamt konnten 234 Gewebeschnitte für MDM4 und 211 für FGFR3 durch Fluoreszenz in Situ Hybridisierung untersucht und ausgewertet werden.

### **3.2 Datenerhebung**

Alle Daten bezüglich Anamnese, Diagnose und Therapie wurden den Patientenakten entnommen. Die Überlebensdaten konnten mit Hilfe des Tumorzentrums Regensburg erhoben werden. Die malignen Speicheldrüsentumoren wurden gemäß der TNM-Klassifizierung der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) eingeordnet [Sobin et al., 2009]. Wurde eine chirurgische Therapie durchgeführt, so erfolgte die Einteilung analog des pathologischen Befundes als pTNM, andernfalls war das klinische Stadium (cTNM) ausschlaggebend. Konnten Primärtumoren nicht operiert werden oder wurden nach Tumorresektion

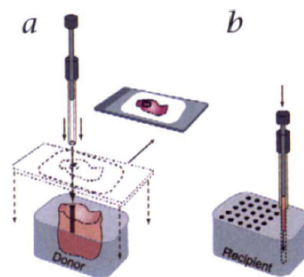
Fernmetastasen diagnostiziert, so wurde dieser Fall als makroskopischer Residualtumor (R2) bewertet. Weitere wichtige Daten für die Auswertung waren u.a. Alter und Geschlecht der Patienten, Ausdehnung und Lokalisation des Malignoms sowie Art der Therapie.

### **3.3 Histologische Untersuchungen**

Vorab wurden alle für diese Arbeit untersuchten Speicheldrüsenmalignome in Formalin fixiert, mittels Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung von zwei unabhängigen Pathologen untersucht und laut aktueller WHO-Klassifikation eingeteilt [Barnes et al., 2005]. Bei allen Patienten entsprach die Klassifizierung der Speicheldrüsenkarzinome dem TNM-Schema der UICC [Sobin et al., 2009]. Des Weiteren wurden die Entitäten in ihrer Malignität unterteilt. Hierfür kam ein dreiteiliges Graduierungssystem zum Einsatz. Als niedrig-maligne (G1 bzw. low-grade) wurden Azinuszellkarzinome, gut differenzierte Mukoepidermoidkarzinome (G1 nach WHO), polymorphe low-grade Karzinome, epitheliale-myoeitheliale Karzinome, Zystadenokarzinome und Basalzelladenokarzinome gewertet. Intermediate-grade (G2) Tumoren sind beispielsweise tubuläre und kribriiforme adenoid-zystische Karzinome, mittelgradig differenzierte Mukoepidermoidkarzinom (G2 nach WHO) und myoeitheliale Karzinome. Speichelgangkarzinome, Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome NOS, solide adenoid-zystische Karzinome, entdifferenzierte Azinuszellkarzinome und gering differenzierte Mukoepidermoidkarzinome (G3 nach WHO) wurden als high-grade (G3 bzw. hoch-maligne) Tumoren gezählt.

### 3.4 Tissue Microarray

Von allen Malignomen wurde für die Herstellung von Tissue Microarrays (TMAs) ein charakteristischer Bereich bestimmt, formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde jeweils eine zwei Millimeter durchmessende Stanze aus den Gewebeblöckchen entnommen und in einen Empfängerblock aus Paraffin übertragen (Abb. 9). Der Empfängerblock konnte hinsichtlich dieser Arbeit bis zu 60 Gewebestanzen aufnehmen. Aus diesem Paraffinblock wurden Schnitte angefertigt, die zum einen mit den jeweiligen DNA-Sonden für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung und zum anderen mit Hämatoxylin-Eosin als Referenzhistologie gefärbt wurden [Baader Diss, 2013].



**Abb. 9: Schema Herstellung TMA: a: Entnahme des Tumorgewebes mittels Stanze, b: Übertragung des Gewebes auf Empfängerblock [Kononen et al., 1998]**

### 3.5 Färbeprotokoll der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Das hier angewendete Färbeprotokoll für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung ist das Standardverfahren des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Regensburg [Baader Diss, 2013].

## **Erster Tag**

### **Entparaffinieren und Rehydrieren**

Um die Präparate zu entparaffinieren wurden SuperFrost® Plus-Objektträger für 35 Minuten bei 72°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 10 Minuten bei Raumtemperatur in Xylol getaucht. Nach einer jeweils zweiminütigen Behandlung mit Ethanol von 100%, 80% und 70% erfolgte eine ebenfalls zweiminütige Waschung mit Millipore-Wasser.

### **Vorbehandlung**

Die Präparate wurden mit einer Natriumcitratlösung im Wasserbad bei 95°C für 40 Minuten inkubiert. Im Anschluss folgte die Proteolyse durch eine Pepsinlösung. Hierfür wurden die Objektträger für vier Minuten bei 37°C im Wasserbad belassen.

### **Waschen**

Um den Verdauungsprozess aufzuhalten, erfolgte ein kurzes Waschen der Schnitte mit raumtemperierten zweifachen Natriumcitratpuffer (2xSSC) und Millipore-Wasser. Danach wurden die Objektträger jeweils für eine Minute in 70-, 80- und 100%iges Ethanol getaucht und getrocknet.

### **Gewebe-Denaturierung und Hybridisierung**

Das Auftragen der jeweiligen DNA-Sonde auf die Gewebeschnitte musste in einem abgedunkelten Raum stattfinden. Anschließend wurden die Präparate mit einem Deckglas versehen und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Dann wurden die Objektträger bei 73°C für fünf Minuten auf die Heizplatte gelegt.

Die Objektträger wurden letztlich in eine feuchte Kammer gelegt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## Zweiter Tag

Zu Beginn wurden Fixogum und Deckglas vorsichtig entfernt. Darauf folgten jeweils zehnminütige Behandlungen der Schnitte von vierfachen, zweifachen und einfachen Sodiumcitrat (4xSSC, 2xSSC, 1xSSC) im 50°C warmen Wasserbad. Zum Schluss wurden die Präparate nochmal mit Millipore-Wasser gereinigt. Nach der Trocknung wurden die Schnitte mit Deckgläsern und Entellan (Eindeckmedium) versehen und anschließend kühl (4°C) und dunkel gelagert.

### 3.6 Verwendete Materialien und Reagenzien

Tab.8: Materialien und Hersteller

Material	Hersteller
<b>Dapi-Einfachbandpassfilter</b>	AHF, Tübingen
<b>Filterset Sp. Green</b>	AHF, Tübingen
<b>HQ-Filterset TRITC/TAMARA</b>	AHF, Tübingen
<b>Glasküvetten</b>	Dako Diagnostika, Hamburg
<b>Deckgläser 24x50 mm</b>	Engelbrecht GmbH, Edermünde
<b>Brutschrank B6060</b>	Heraeus Sepatech, Osterode
<b>Heizplatte</b>	Ika Labortechnik, Staufen im Breisgau
<b>Wasserbad Lo-boy</b>	Lab-Line Instruments, Illinois/USA
<b>Gefrierschrank</b>	Liebherr, Kirchdorf a. d. Iller
<b>Fixogum</b>	Marabu, Tamm
<b>Objektträger: SuperFrost®Plus</b>	Menzel-Gläser, Braunschweig
<b>Entellan</b>	Merck, Darmstadt
<b>Schlittenmikrotom</b>	Mikrom, Heidelberg
<b>Millipore-Wasser: Filteranlage Milli-Q UF Plus</b>	Millipore, Billerica/USA
<b>Vectashield mounting medium with Dapi</b>	Vector Laboratories, Burlingame/USA
<b>Metallständer</b>	Wagner & Munz, München
<b>Fluoreszenz-Mikroskop: AxioImager Z1</b>	Zeiss, Oberkochen
<b>Handstanze</b>	Zytomed, Berlin
<b>Zytolight SPEC FGFR3/CEN 4 Dual Color</b>	Zytovision, Bremerhaven
<b>Zytolight SPEC MDM4/1p12 Dual Color Probe</b>	Zytovision, Bremerhaven

Tab. 9: Reagenzien und Hersteller

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

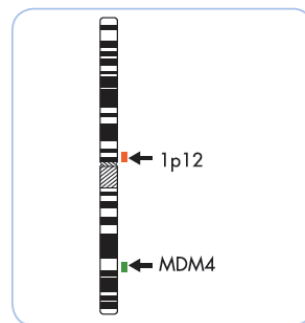
Tab. 10: Reagenzien und Inhaltsstoffe

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

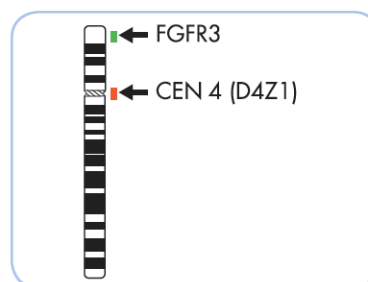
### 3.7 FISH-Sonden

Zur Färbung der Gewebeschnitte wurden DNA-Sonden der Firma ZytoVision® verwendet. Für die Auswertung von MDM4 kam die Sonde ZytoLight® SPEC MDM4/1p12 Dual Color Probe (PL39) und für FGFR3 ZytoLight® SPEC FGFR3/CEN 4 Dual Color Probe (PL41)

zum Einsatz. Beide Sonden enthalten orange- und grünmarkierte Polynukleotide (ZyGreen: Absorption bei 503 nm, Emission bei 528 nm; ZyOrange: Absorption bei 547 nm und Emission bei 572 nm), um entsprechende Gensignale zum Leuchten zu bringen. Bei MDM4 werden zum einen Sequenzen, die das MDM4-Gen flankieren (grünes Signal), und zum anderen Sequenzen, die gegen Region 1p12 des Chromosoms 1 (oranges Signal) gerichtet sind, nachgewiesen (Abb. 10). Analog dazu erscheint ein grünes Leuchtsignal bei Sequenzen gegen das FGFR3-Gen, ein oranges zum Nachweis von alpha-Satelliten-Sequenzen des Zentromers von Chromosom 4 (Abb. 11).\*/\*\*



**Abb. 10: Lokalisation der Hybridisierung an Chromosom 1 \***



**Abb. 11: Lokalisation der Hybridisierung an Chromosom 4 \*\***

### Quelle:

\*<http://www.zytovision.com/index.php/zytolight/17-zytolight-fish-products/202-z-2080>

\*\*<http://www.zytovision.com/index.php/zytolight/17-zytolight-fish-products/204-z-2082>



### **3.8 FISH-Analyse**

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager Z1) der Firma Zeiss ausgewertet. Zur Differenzierung der Leuchtsignale wurden drei Filter der Firma AHF verwendet. Zum einen zur Beurteilung der Übersicht (Dapi-Einfachbandpassfilter) und zum anderen zur Auswertung der grünen (Filterset Sp. Green) und orangen Signale (HQ-Filterset TRITC/TAMARA).

Pro Stanze wurden 25 Zellkerne mittels vorgefertigten Auszählungsbögen des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Regensburg ausgewertet. Zur ersten Übersicht und Beurteilung der Tumorzellen wurde der Dapi-Filter in fünf- bis 20-facher Vergrößerung verwendet. Anschließend wurde Immersionsöl aufgetragen und die Zellkerne mittels 63-facher Vergrößerung beurteilt. Für die Auswertung wurden nur Zellkerne mit gut sichtbaren Grenzen ohne Überlagerungen berücksichtigt. Es folgte die Auszählung der grünen und orangen Leuchtsignale. Hierbei wurde jede Farbe einzeln begutachtet. Gewertet wurden nur eindeutige Signale. Zwei Signale in einer Entfernung von weniger als einem Signaldurchmesser wurde als ein Leuchtpunkt angesehen (Split-Signale). Unter Zuhilfenahme des Feintriebs konnten Zellkerne in verschiedenen Ebenen beurteilt werden.

### **3.9 Auswertungskriterien**

Im Normalfall enthalten Zellkerne einen diploiden Chromosomen- und Gensatz. Wurden für eine Stanze Nuklei mit je zwei grünen (Gensignal) und orangen (Zentromersignal) Leuchtsignalen in mehr als 50% der untersuchten Zellkerne beobachtet, so wurde dies als *Disomie* gewertet. Waren jedoch Aberrationen erkennbar, so wurden diese wie folgt ausgewertet. Drei erkennbare Zentromersignale in mehr als 40% der untersuchten Zellkerne

wurden als *niedrige Polysomie*, vier oder mehr Zentromersignale in mehr als 40% der untersuchten Zellkerne wurden als *hohe Polysomie* gezählt. Eine *Amplifikation* lag vor bei einem Gen- zu Zentromerverhältnis von mindestens 2:1 oder einem Gen-Cluster in mehr als 30% der Zellkerne. Hierfür war die Summe aller gewerteten Gene und Zentromere ausschlaggebend. War bei zwei sichtbaren Zentromersignalen nur ein Gensignal zu erkennen, so wurde dies als *hemizygote Deletion* gezählt. Als *relative Deletion* wurde, umgekehrt zur Amplifikation, ein Gen- zu Zentromerverhältnis von maximal 1:2 - z.B. 2 Gen-, 4 Zentromersignale oder 2 Gen, 5 Zentromersignale – in mehr als 30% der Zellkerne bewertet. Auch hier wurde wieder die gesamte Anzahl der gewerteten Gen- und Zentromersignale berücksichtigt. Die Auswertungskriterien waren sowohl für MDM4 als auch für FGFR3 identisch.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Mit Hilfe des Programms SPSS (Version 20.0 für Mac) der Firma IBM wurden alle Daten statistisch verarbeitet. Das Chi-Quadrat-Testverfahren kam zur Anwendung um einen Bezug zwischen den unterschiedlichen Parametern herzustellen (Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ). Die univariate Analyse bezüglich des Überlebens wurde mittels Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Test (Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ) ausgeführt, die multivariate Überlebensanalyse unter Zuhilfenahme der Cox-Regression (Einschlussverfahren; Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ). Das tumorspezifische Überleben (TSÜ) wurde durch das Datum der Diagnosestellung und des tumorbedingten Todes bzw. der letzten Information zum Lebensstatus bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Analyse – Klinisch-pathologische Parameter

#### 4.1.1 Tumorentitäten

Insgesamt konnten 16 Unterarten von Speicheldrüsenkarzinomen im Patientenkollektiv (n=324) unterschieden werden (Tab. 11). Die drei häufigsten waren das adenoid-zystische Karzinom mit 55 Fällen, das Mukoepidermoidkarzinom mit 51 Fällen und das Azinuszellkarzinom mit 44 Fällen. Die Häufigkeitsverteilungen aller Entitäten kann Tabelle 11 und Abbildung 12 entnommen werden.

Tab. 11: Einteilung der Tumorentitäten bezüglich des Patientenkollektivs

Entität	Häufigkeit	Prozentualer Anteil (%)
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	55	17,0
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	51	15,7
<b>Azinuszellkarzinom</b>	44	13,6
<b>Adenokarzinom NOS</b>	37	11,4
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	35	10,8
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	31	9,6
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	21	6,5
<b>Polymorphes niedrig-malignes Karzinom</b>	13	4,0
<b>Basalzelladenokarzinom</b>	9	2,8
<b>Onkozytäres Karzinom</b>	7	2,0
<b>Epitheliales myoepitheliales Karzinom</b>	5	1,5
<b>Primär maligner Misch tumor</b>	5	1,5
<b>Undifferenziertes Karzinom</b>	4	1,2
<b>Rhabdoides Karzinom</b>	3	0,9
<b>Zystadenokarzinom</b>	2	0,6
<b>Großzelliges Karzinom</b>	2	0,6
<b>Gesamt</b>	<b>324</b>	<b>100</b>

Für alle folgenden klinisch-pathologischen Parameter wurden die Entitäten mit einer Häufigkeitsverteilung von  $\geq 5\%$  einzeln tabellarisch aufgelistet, die restlichen Tumortypen wurden als sonstige Malignome zusammengefasst.

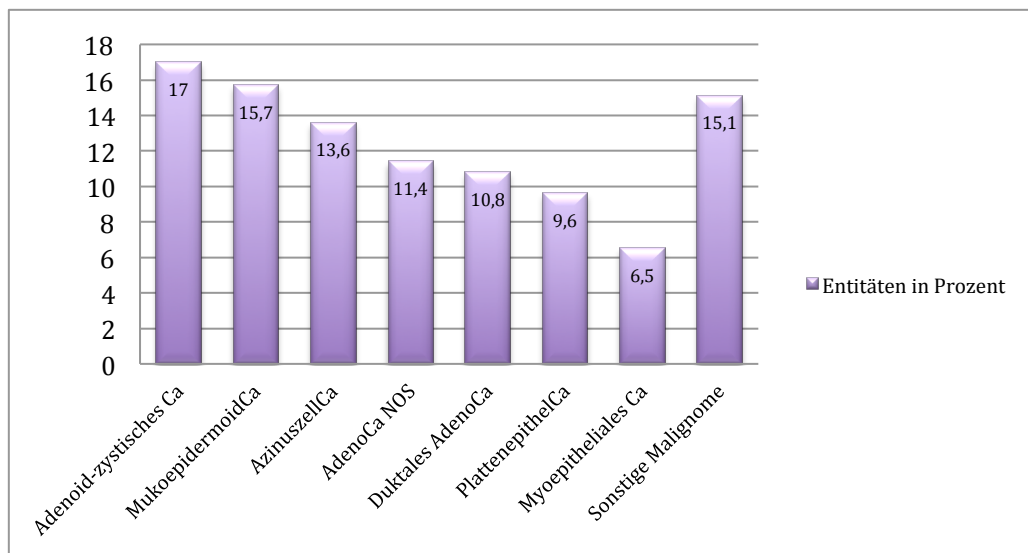


Abb. 12: Häufigkeitsverteilung der Speicheldrüsenkarzinome

#### 4.1.2 Alter und Geschlecht

Hinsichtlich der Altersverteilung waren die Patienten zum Diagnosezeitpunkt im Mittel 60,8 Jahre alt. 60,4% der Erkrankten waren bei Diagnosestellung  $\leq 70$  Jahre. Hier wurden am häufigsten Mukoepidermoid- (18,3%), adenoid-zystische (17,8%) und Azinuszellkarzinome (17,3%) festgestellt. Bei Patienten  $>70$  Jahre war mit 19,7% das Plattenepithelkarzinom das meist vorkommende, gefolgt vom duktalem Adenokarzinom und dem adenoid-zystischen Karzinom mit jeweils 15,6% ( $p < 0,001$ ).

Bezüglich des gesamten Patientenkollektivs erkrankten Männer mit 47,2% tendenziell etwas weniger häufig an einem malignen Speicheldrüsentumor als Frauen mit 52,8%. Betrachtet man aber die einzelnen Entitäten, so sind deutliche Unterschiede erkennbar. Frauen erkrankten häufiger an einem adenoid-zystischen (69,1%), Azinuszell- (68,2%) oder Muko-

epidermoidkarzinom (62,7%). Die Prävalenz eines Plattenepithelkarzinoms liegt mit 80,6% eindeutig beim männlichen Geschlecht (Tab. 12;  $p < 0,001$ )

Tab. 12: Alters- und geschlechtsspezifische Verteilung der Entitäten

Entität	Alter		Geschlecht	
	≤70	>70	weiblich	männlich
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	36	19	38	17
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	37	14	32	19
<b>Azinuszellkarzinom</b>	35	9	30	14
<b>Adenokarzinom NOS</b>	25	12	13	24
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	16	19	16	19
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	7	24	6	25
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	15	6	12	9
<b>Sonstige Malignome</b>	31	19	24	26
<b>Gesamt</b>	<b>202</b>	<b>122</b>	<b>171</b>	<b>153</b>

#### 4.1.3 Lokalisation

In den meisten Fällen (71%) kam es zum Befall der Ohrspeicheldrüsen (Abb. 13). Am häufigsten wurden hier Azinuszellkarzinome (17%), Mukoepidermoidkarzinome (13,5%) und Plattenepithelkarzinome (13,1%) diagnostiziert. In der Gl. submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen war das adenoid-zystische Karzinom mit 32,6% bzw. 36,2% am stärksten vertreten. In der Gl. sublingualis wurde bei nur zwei Patienten ein Malignom (Tab. 13) festgestellt.

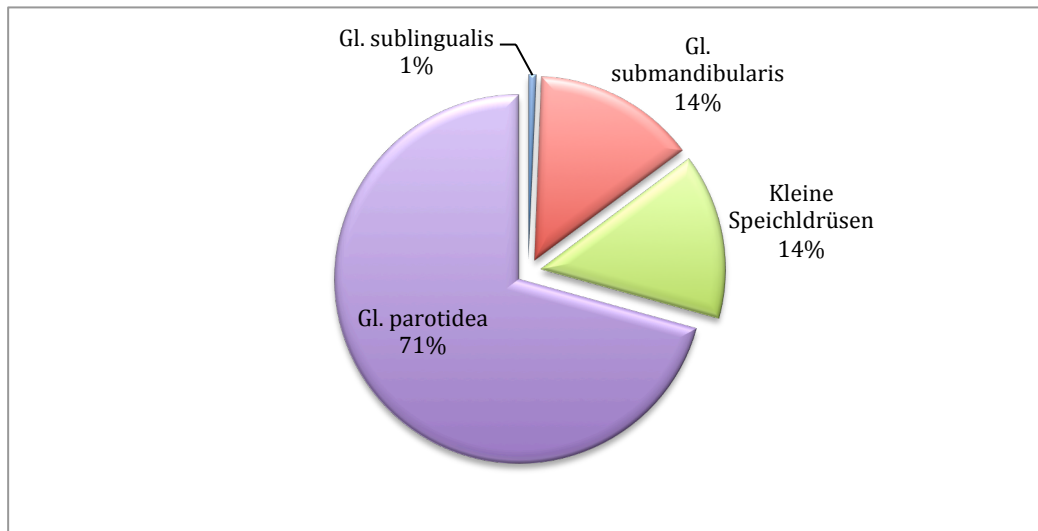


Abb. 13: Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisierung (n=324)

Tab. 13: Tumorlokalisierung (n=324)

Entität	Lokalisation			
	Gl. parotidea	Gl. submandibularis	Gl. sublingualis	Kleine Speicheldrüsen
<b>Adenoid-zyst. Karzinom</b>	22	15	1	17
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	31	4	1	15
<b>Azinuszellkarzinom</b>	39	3	0	2
<b>Adenokarzinom NOS</b>	28	6	0	3
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	29	5	0	1
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	30	1	0	0
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	14	6	0	1
<b>Sonstige Malignome</b>	36	6	0	8
<b>Gesamt</b>	<b>229</b>	<b>46</b>	<b>2</b>	<b>47</b>

#### 4.1.4 TNM-Klassifikation

Die Stadien wurden nach Resektion und pathologischer Beurteilung gemäß der TNM-Klassifikation für Speicheldrüsenmalignome der UICC eingeordnet. Als häufigste Tumorgöße konnte bei einem Gesamtkollektiv von 319 Patienten bei 33,2% der Fälle ein T2-Befund diagnostiziert werden. Die genaue Verteilung der T-Stadien auch hinsichtlich der einzelnen Entitäten ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: T-Status ( $p=0,165$ ;  $n=319$ )

Entität	T1	T2	T3	T4
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	13	17	14	8
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	17	21	8	5
<b>Azinuszellkarzinom</b>	19	14	8	3
<b>Adenokarzinom NOS</b>	10	11	9	6
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	7	10	5	13
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	3	10	10	7
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	2	6	9	4
<b>Sonstige Malignome</b>	11	17	13	9
<b>Gesamt</b>	<b>82</b>	<b>106</b>	<b>76</b>	<b>55</b>

Bezüglich des Lymphknotenstatus wurden insgesamt 316 auswertbare Fälle betrachtet, wovon 217 Erkrankte eine N0-Situation aufwiesen (68,7%). Ein negativer Nodalbefund konnte mit 93% bei den Azinuszellkarzinomen am häufigsten diagnostiziert werden. Auch bei 82% der adenoid-zystischen und 74,5% der Mukoepidermoidkarzinome konnten keine Metastasen der Lymphknoten festgestellt werden.

31,3% der untersuchten Patienten zeigten einen positiven Lymphknotenbefund. Besonders prägnant ist die Lymphknotenmetastasierung beim duktales Adenokarzinom (71,4%). Weitere Malignome mit auffällig häufigem positiven N-Status sind das Adenokarzinom NOS

mit 44,4% und das Plattenepithelkarzinom mit 43,3% (vgl. Tab. 15;  $p < 0,001$ ). In Abbildung 14 lassen sich Zusammenhänge zwischen Nodalbefund und Tumorgröße eruieren.

Tab. 15: N-Status ( $p < 0,001$ ;  $n = 316$ )

Entität	N0	N1	N2	N3
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	41	4	5	0
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	38	7	5	1
<b>Azinuszellkarzinom</b>	40	3	0	0
<b>Adenokarzinom NOS</b>	20	2	14	0
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	10	6	19	0
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	17	7	6	0
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	15	1	5	0
<b>Sonstige Malignome</b>	36	7	6	1
<b>Gesamt</b>	<b>217</b>	<b>37</b>	<b>60</b>	<b>2</b>

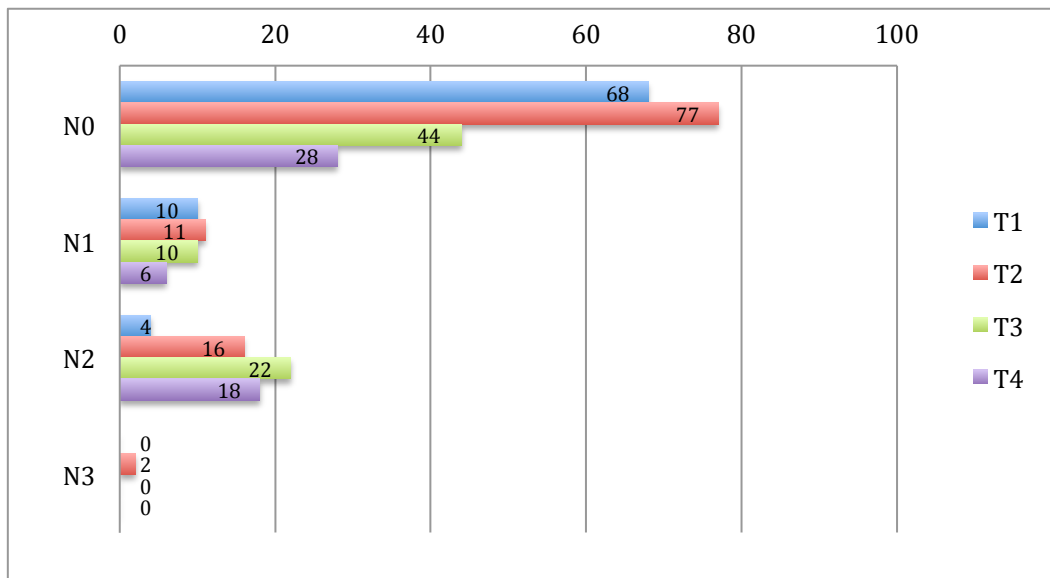


Abb. 14: Zusammenhang zwischen T- und N-Status (Anzahl der Patientenfälle;  $p < 0,001$ ;  $n = 316$ )



Fernmetastasen wurden nur in 33 der 321 untersuchten Fälle diagnostiziert (10,3%). Jeweils 24,2% entfallen hier auf das adenoid-zystischen Karzinom und das Adenokarzinom NOS, gefolgt vom duktalem Adenokarzinom mit 15,2%. Eine detaillierte Auflistung ist Tabelle 16 zu entnehmen (p=0,21).

Tab. 16: M-Status (p=0,21; n=321)

Entität	M0	M1
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	46	8
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	46	4
<b>Azinuszellkarzinom</b>	43	1
<b>Adenokarzinom NOS</b>	29	8
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	30	5
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	29	1
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	18	3
<b>Sonstige Malignome</b>	47	3
<b>Gesamt</b>	<b>288</b>	<b>33</b>

Aufgrund der TNM-Klassifikation lassen sich Gesamtstadien nach UICC ermitteln (Tab. 3). Es konnten 322 Patientenfälle analysiert werden. Zumeist konnte das Stadium IV mit 34,2% festgestellt werden, gefolgt von Stadium II (22,7%), Stadium I (22%) und Stadium III (21,1%). Das Stadium IV war vor allem durch duktales Adenokarzinome, Adenokarzinome NOS und adenoid-zystische Karzinome geprägt (siehe Abb. 15). In niedrigen Tumorstadien (I und II) überwogen Azinuszell- und Mukoepidermoidkarzinome mit 21,5% bzw. 23,6% (Tab. 17; p<0,001)

Tab. 17. Tumorstadium nach Einteilung der UICC ( $p < 0,001$ ;  $n = 322$ )

Entität	I	II	III	IV
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	11	13	11	19
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	18	16	9	8
<b>Azinuszellkarzinom</b>	20	11	9	4
<b>Adenokarzinom NOS</b>	5	4	7	21
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	4	3	5	23
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	2	9	8	11
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	2	5	7	7
<b>Sonstige Malignome</b>	9	12	12	17
<b>Gesamt</b>	<b>71</b>	<b>73</b>	<b>68</b>	<b>110</b>

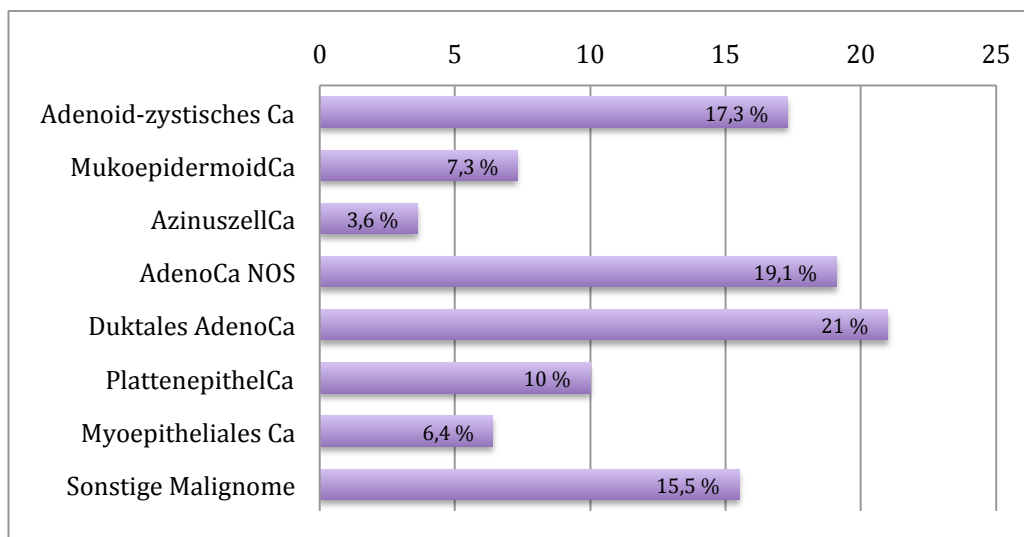


Abb. 15: Verteilung der Entitäten im Stadium IV

#### 4.1.5 Grading

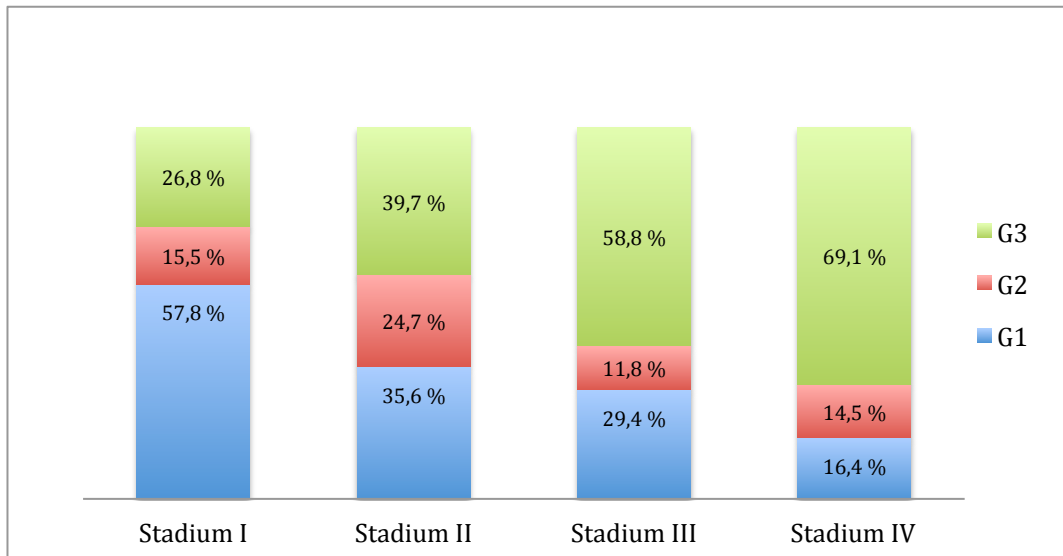
Die Bestimmung des Malignitätsgrads der untersuchten 324 Speicheldrüsentumoren ergab zu 50,9% schlecht differenzierte Tumoren (G3), zu 32,4% gut differenzierte Tumoren (G1), und zu 16,7% mäßig differenzierte Tumoren (G2). Bei den low-grade (G1) Tumoren war das

Azinuszellkarzinom mit 36,2% am stärksten vertreten. Das duktales Adenokarzinom war mit 21,2% gefolgt vom Plattenepithelkarzinom mit 18,8% am häufigsten unter den high-grade (G3) Tumoren zu finden. Adenoid-zystische Karzinome (70,4%) wiesen vor allem einen mäßig differenzierten Malignitätsgrad auf (Tab. 18;  $p < 0,001$ ).

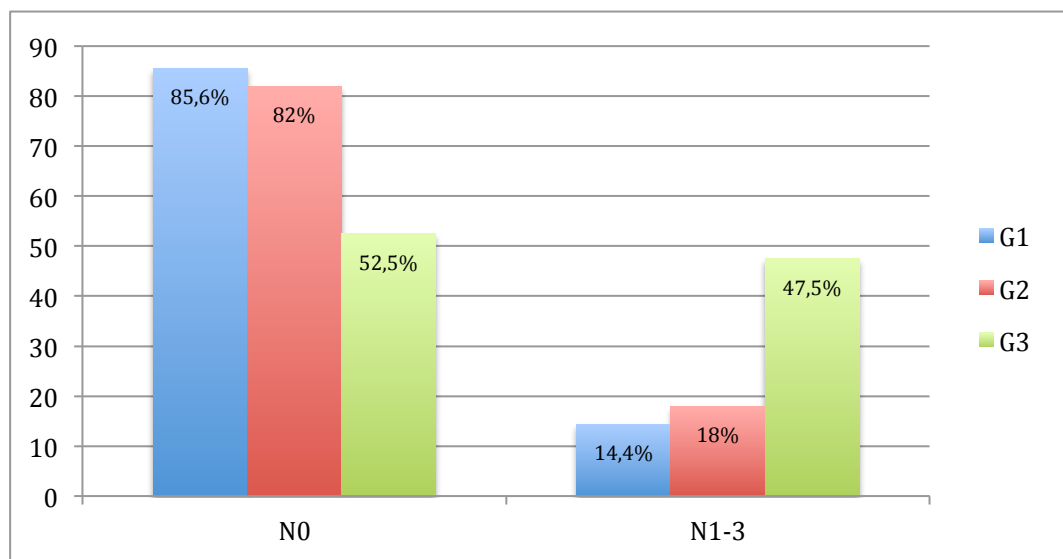
Vergleicht man das Stadium mit dem Grading, so ist eine eindeutige Korrelation erkennbar (Abb. 16). Knapp 70% der schlecht differenzierten Neoplasien wiesen zugleich Stadium IV auf. Lymphknotenmetastasen konnten in 47,5% der G3-Malignome nachgewiesen werden, während hoch differenzierte (G1) Karzinome nur in 14,4% Lymphknotenmetastasen aufwiesen (Abb. 17). 85% der Tumoren mit N2-Status waren den schlecht differenzierten Tumoren zu zuordnen.

Tab. 18: Grading ( $p < 0,001$ ;  $n = 324$ )

Entität	G1	G2	G3
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	3	38	14
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	30	6	15
<b>Azinuszellkarzinom</b>	38	0	6
<b>Adenokarzinom NOS</b>	3	4	30
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	0	0	35
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	0	0	31
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	4	6	11
<b>Sonstige Malignome</b>	27	0	23
<b>Gesamt</b>	<b>105</b>	<b>54</b>	<b>165</b>



**Abb. 16: Korrelation zwischen Malignitätsgrad und Tumorstadium ( $p < 0,001$ ;  $n = 322$ )**



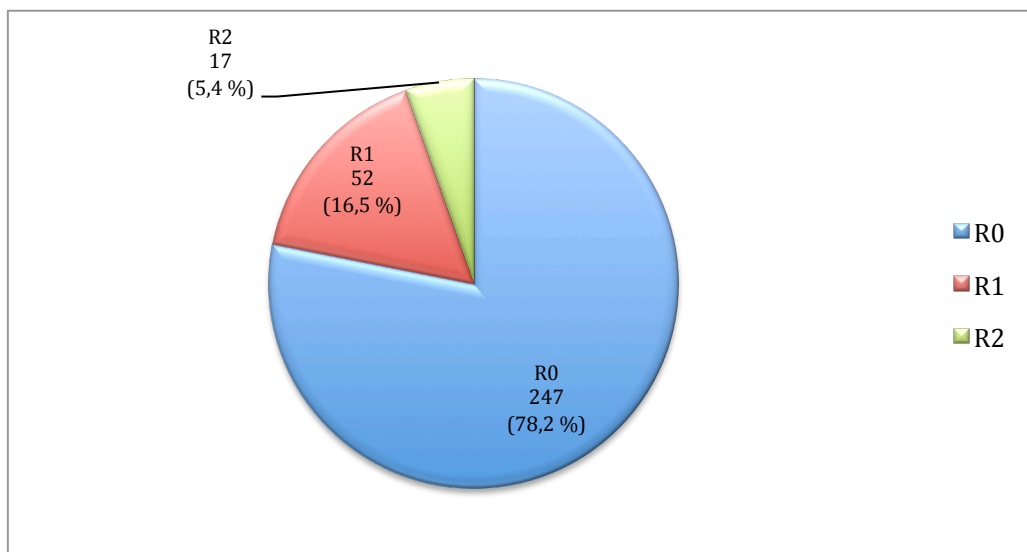
**Abb. 17: Korrelation zwischen Malignitätsgrad und Lymphknotenmetastasen ( $p < 0,001$ ;  $n = 316$ )**

#### 4.1.6 Therapie

Von allen 324 Patienten wurde bei nur einem Patienten (duktales Adenokarzinom der Gl. parotidea) keine Therapie durchgeführt. Bei einem weiteren Patienten mit diagnostiziertem adenoid-zystischen Karzinom der Gl. parotidea war der Behandlungsansatz eine primäre Radio-/Chemotherapie. Somit wurden 99,4% der betroffenen Patienten chirurgisch behandelt (Tab. 19). Die meisten Erkrankten (58,6%) wurden zusätzlich zur operativen Therapie adjuvant bestrahlt (durchschnittliche Strahlendosis 57,3 Gy). 16,7% erhielten eine adjuvante Radiochemotherapie. Hierbei wurden als Zytostatikum vor allem 5-Fluoruracil oder Cisplatin verwendet. 74,7% der adjuvant behandelten Malignome waren in der Gl. parotidea lokalisiert. In 94,6% der Fälle war der Therapieansatz kurativ (R0 und R1). Posttherapeutisch war bei 247 von 316 Patienten kein Anhalt auf restliches Tumorgewebe gegeben. In 52 Fällen konnte ein mikroskopischer (R1) und in 17 Fällen ein makroskopischer Residualtumor (R2) nachgewiesen werden (Abb. 18).

Tab. 19: Therapieformen ( $p=0,803$ ;  $n=324$ )

Entität	Chirurgie	Chirurgie und Radiotherapie	Primäre Radio-/Chemotherapie	Keine Therapie
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	15	39	1	0
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	29	22	0	0
<b>Azinuszellkarzinom</b>	24	20	0	0
<b>Adenokarzinom NOS</b>	12	25	0	0
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	11	23	0	1
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	11	20	0	0
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	10	11	0	0
<b>Sonstige Malignome</b>	20	30	0	0
<b>Gesamt</b>	<b>132</b>	<b>190</b>	<b>1</b>	<b>1</b>



**Abb. 18: R-Status des Gesamtkollektives (p=0,094; n=316)**

Bei 233 Patienten wurde eine Ausräumung der Halslymphknoten vorgenommen. Eine genaue Übersicht zum Zusammenhang zwischen der Neck Dissection und den einzelnen Entitäten ist Abbildung 19 zu entnehmen.

Bei 85,9% der Patienten mit klinisch manifesten Lymphknotenmetastasen (cN1-3) wurde eine Neck Dissection durchgeführt. Andererseits wurde bei 68,1% der Patienten mit cN0-Situation ebenfalls eine Ausräumung der Halslymphknoten vorgenommen.

Eine weitere Korrelation der Neck Dissection ergibt sich hinsichtlich der Lokalisation der Speicheldrüsenkarzinome. Konnten Malignome in der Gl. parotidea diagnostiziert werden, so wurde in 79,7% der Fälle eine Ausräumung der Halslymphknoten vorgenommen (p<0,001; n=322). Waren allerdings die kleinen Speicheldrüsen betroffen, so verzichtete man bei 61,7% auf eine Neck Dissection. Bei schlecht differenzierten (G3) Malignomen wurden 134 (81,7%) Patienten, bei gut differenzierten (G1) 64,4% durch eine Neck Dissection therapiert (p=0,001; n=322).

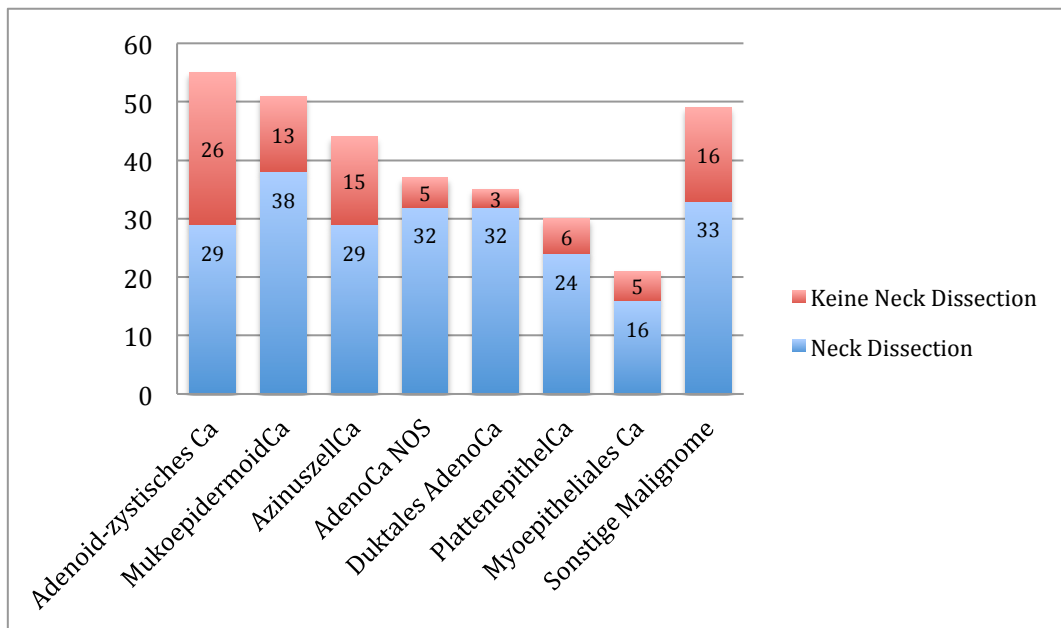


Abb. 19: Häufigkeitsverteilung Neck Dissection (Anzahl Patientenfälle;  $p=0,019$ ;  $n=322$ )

#### 4.1.7 Rezidive

Bei 73,9% der Patienten wurde kein Rezidiv diagnostiziert. Verhältnismäßig oft trat beim adenoid-zystischen Karzinom (38,5%) ein rezidivierendes Tumorwachstum auf. Nennenswert ist auch das großzellige Karzinom. Beide Patienten erlitten ein Rezidiv. Die Verteilung hinsichtlich der einzelnen Entitäten ist Tabelle 20 zu entnehmen. Lag ein T3 oder T4 Status vor, so rezidierten 32,5% der Malignome. Bei kleineren Tumorgrößen (T1 und T2) konnte bei 21,5% ein Rezidiv festgestellt werden ( $p=0,037$ ;  $n=306$ ). Bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen wurden bei 33% ( $p=0,088$ ;  $n=304$ ) der Fälle rezidivierende Tumoren diagnostiziert. Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich hinsichtlich des Stadiums. 83,2% aller Patienten in niedrigen Tumorstadien (I und II) blieben rezidivfrei. Lag allerdings ein Tumorstadium von III oder IV vor, erkrankten 34,5% der Patienten an einem

Rezidiv ( $p < 0,001$ ;  $n = 308$ ). Hinsichtlich des Malignitätsgrades ergab sich, dass 33,3% der gering differenzierten Karzinome (G3) auch ein Rezidiv entwickelten. Hingegen blieben 79,4% der G1 und G2 Malignome rezidivfrei ( $p = 0,015$ ;  $n = 310$ ). Es bestanden keine nennenswerten Assoziationen hinsichtlich des Alters oder der Lokalisation.

Tab. 20: Rezidive ( $p = 0,291$ ;  $n = 310$ )

Entität	Rezidiv	Kein Rezidiv
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	20	32
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	8	41
<b>Azinuszellkarzinom</b>	9	35
<b>Adenokarzinom NOS</b>	11	23
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	8	25
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	9	20
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	5	15
<b>Sonstige Malignome</b>	11	38
<b>Gesamt</b>	<b>81</b>	<b>229</b>

## 4.2. Deskriptive Analyse – FISH-Ergebnisse

### 4.2.1 MDM4

Von den 234 untersuchten Tumoren wiesen insgesamt 84 (35,9%) eine Aberration von MDM4 auf (Abb. 20-23). Dabei zeigten das adenoid-zystische Karzinom, das Azinuszellkarzinom und das Mukoepidermoidkarzinom wenig Auffälligkeiten (Disomie bei 85%, 75% und 74,4%). Aberrationen waren vor allem bei duktalem Adenokarzinom zu beobachten (68%). Hier zeigte sich bei 36% der betroffenen Patienten eine hohe Polysomie,



eine niedrige bei 20% und 12% wiesen Amplifikationen auf. Ebenso waren in der Gruppe der Adenokarzinome NOS mit je 19,2% hohen Polysomien und Amplifikationen zu beobachten. Nennenswert ist auch der maligne Misch tumor, bei dem beide Patientenfälle eine hohe Polysomie aufwiesen. Die einzelnen Aufteilungen sind in Tabelle 21 ersichtlich.

Tab. 21: Disomie und Aberrationen von MDM4 ( $p=0,006$ ;  $n=234$ )

Entität	Disomie	Niedrige Polysomie	Hohe Polysomie	Amplifikation
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	34	2	2	2
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	29	5	4	1
<b>Azinuszellkarzinom</b>	27	4	3	2
<b>Adenokarzinom NOS</b>	12	4	5	5
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	8	5	9	3
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	15	5	5	3
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	12	4	1	2
<b>Sonstige Malignome</b>	13	5	2	1
<b>Gesamt</b>	<b>150</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>19</b>

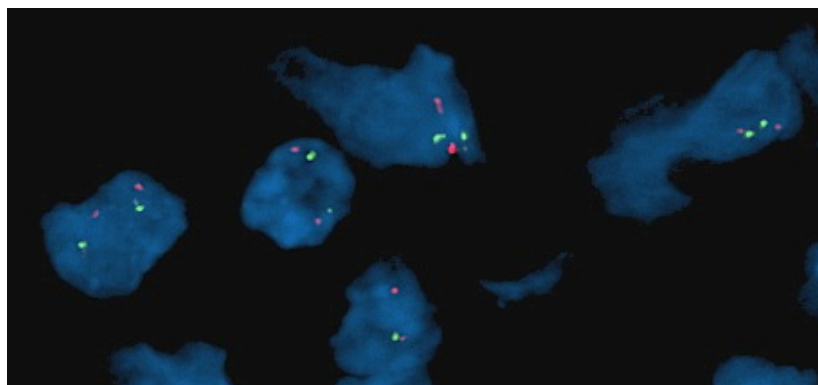
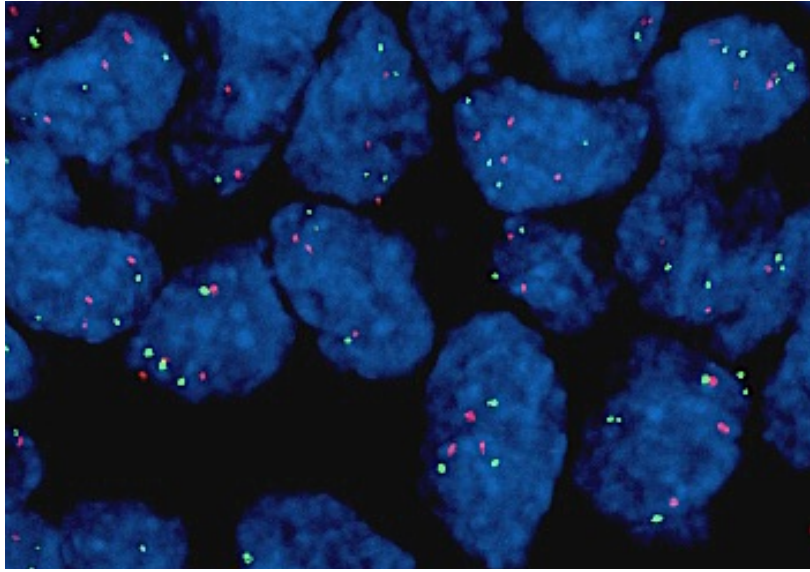
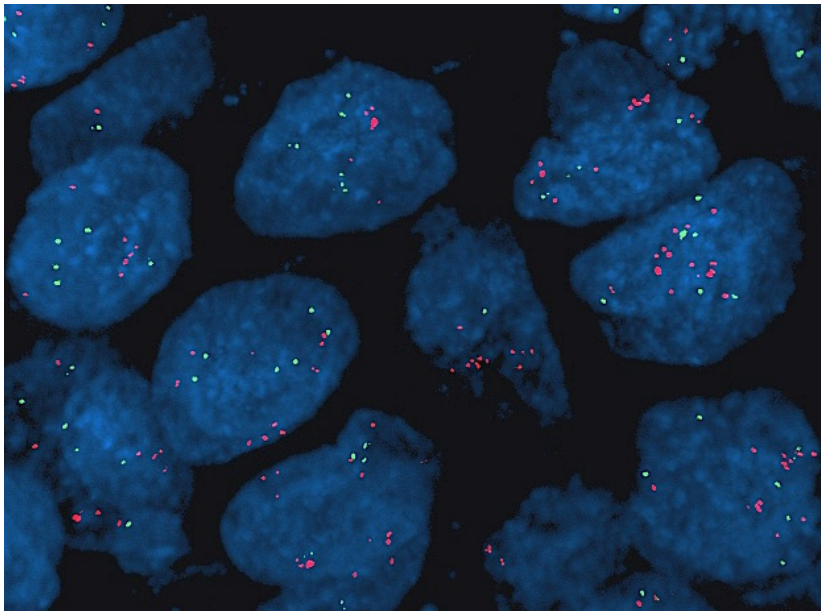


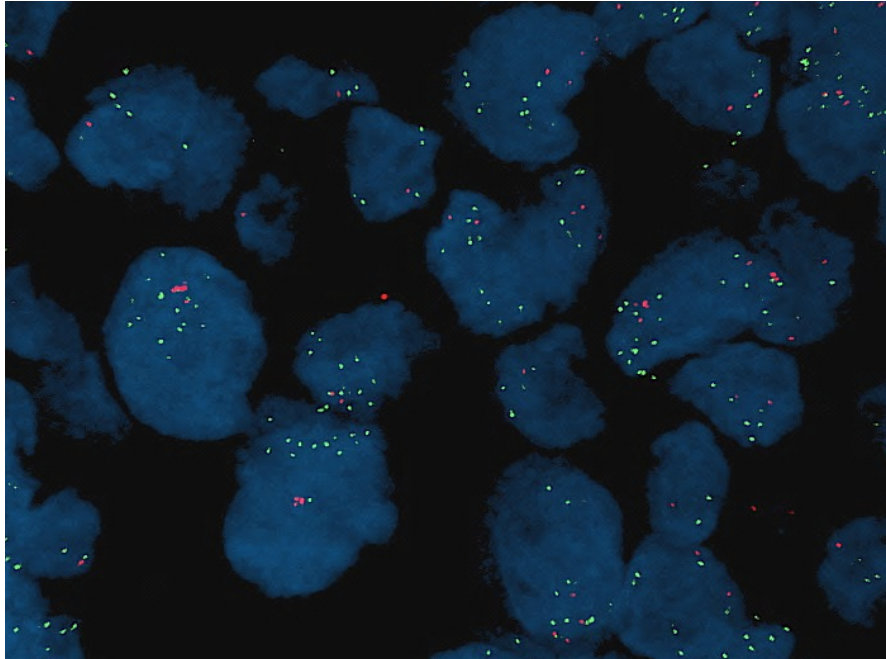
Abb. 20: Disomie von MDM4 bei einem adenoid-zystischen Karzinom



**Abb. 21: Niedrige Polysomie von MDM4 bei einem Adenokarzinom NOS**

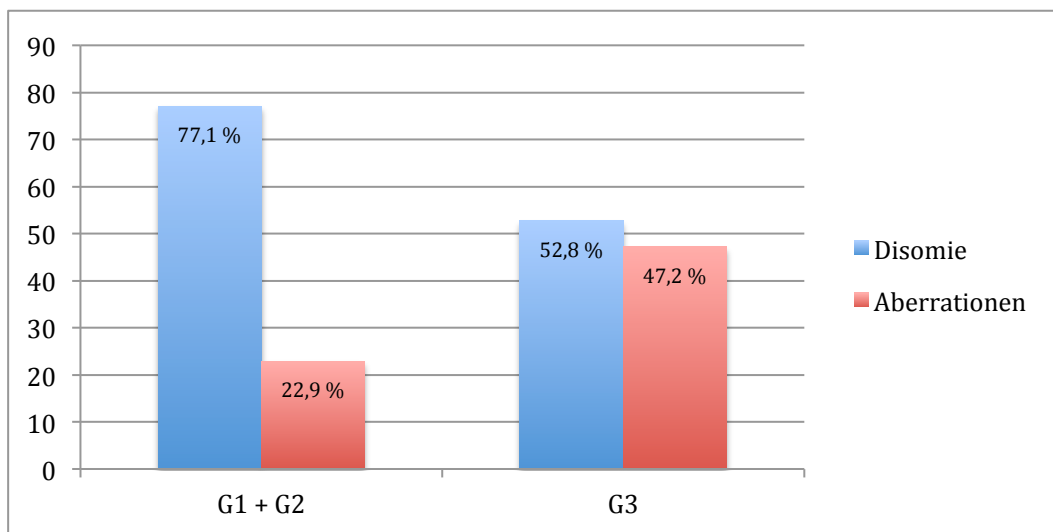


**Abb. 22: Hohe Polysomie von MDM4 bei einem Mukoepidermoidkarzinom**



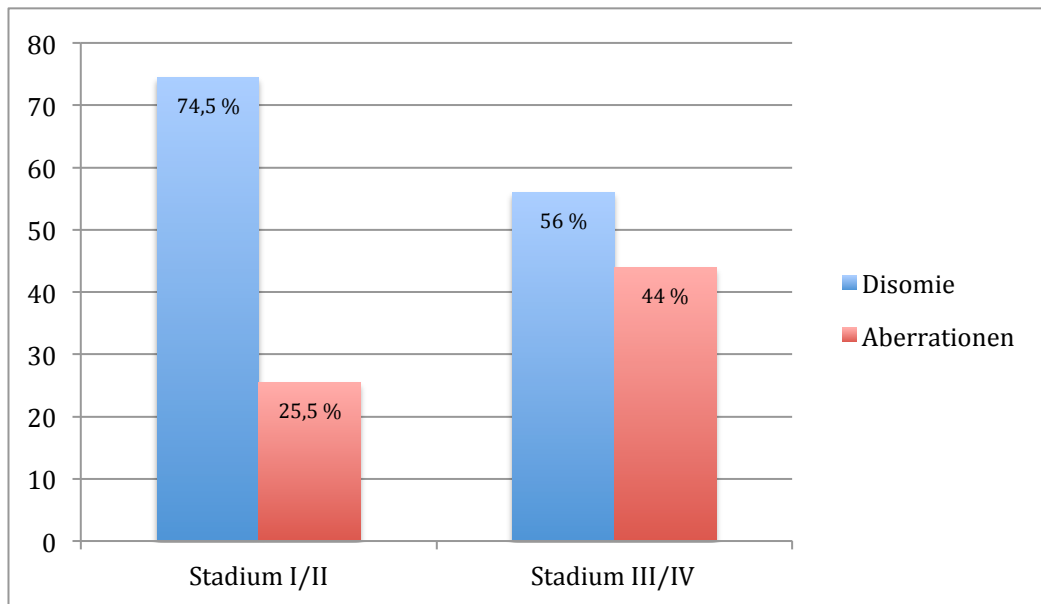
**Abb. 23: Amplifikation von MDM4 bei einem myoepithelialen Karzinom**

Der Genstatus von MDM4 war signifikant mit dem Malignitätsgrad der Tumoren assoziiert (Abb. 24;  $p < 0,001$ ). Schlecht differenzierte Speicheldrüsenkarzinome zeigten zu 47,2% auch genetische Aberrationen. Im Gegensatz dazu waren bei 77,1% der Erkrankten mit G1- oder G2-Tumoren keinerlei genetischen Veränderungen feststellbar. Zusammenhänge ließen sich auch bezüglich der Tumorgroße darstellen. Bei 90 von 129 Patienten (69,8%) mit T1- oder T2-Status ließ sich eine Disomie nachweisen. Bei größerer Tumorausdehnung war ein unauffälliger Genstatus bei 56,4% ersichtlich. 43,6% zeigten hingegen Aberrationen. ( $p = 0,039$ ).



**Abb. 24: Verteilung Genstatus MDM4 und Grading (p<0,001; n=234)**

Statistisch signifikante Korrelationen ergaben sich auch in Bezug auf den Lymphknotenbefund. 70,2% der Fälle mit einer N0-Situation hatten keine Aberrationen. Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigten zu 48,7% genetische Veränderungen (p=0,008). Betrachtet man das jeweilige Tumorstadium, so stellten sich auch hier signifikante Zusammenhänge mit dem Genstatus von MDM4 dar. Ein Viertel (25,5%) aller Patienten mit niedrigem Stadium (I und II) wiesen Genaberrationen auf. Dagegen stieg die Zahl bei fortgeschrittenen Stadien auf 44% an (Abb. 25; p=0,004). Keine signifikanten Assoziationen zeigten sich bezüglich des Alters, Geschlechts oder des Vorhandenseins von Fernmetastasen und Residualtumor.



**Abb. 25: Verteilung MDM4 Genstatus und Tumorstadium (p=0,004; n=232)**

#### **4.2.2 FGFR3**

Von den 211 untersuchten Tumoren wiesen insgesamt 117 (55,5%) eine Aberration von FGFR3 auf (Abb. 26-29). In Tabelle 22 sind die häufigsten Speicheldrüsenkarzinome und die Verteilung des FGFR3- Genstatus aufgelistet. Besonders prägnant waren - ähnlich wie bei MDM4 - auch hier wieder das duktales Adenokarzinom und das Adenokarzinom NOS. Mit jeweils 30,4% waren niedrige und hohe Polysomien beim duktales Adenokarzinom erkennbar. Das Adenokarzinom NOS wies zu 75% Aberrationen auf (41,7% hohe, 33,3% niedrige Polysomie). Gleichfalls zeigte auch das Plattenepithelkarzinom in dreiviertel aller Fälle Genveränderungen. Am auffälligsten war hier die hohe Polysomie mit 65%. Zu beachten ist auch das myoepitheliale Karzinom, das zu 50% eine niedrige und zu 22,2% eine hohe Polysomie aufwies.

Tab. 22: Disomie und Aberrationen von *FGFR3* ( $p=0,096$ ;  $n=211$ )

Entität	Disomie	Niedrige Polysomie	Hohe Polysomie	Amplifikation
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	19	13	4	1
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	20	11	6	0
<b>Azinuszellkarzinom</b>	20	4	3	0
<b>Adenokarzinom NOS</b>	6	8	10	0
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	9	7	7	0
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	5	2	13	0
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	5	9	4	0
<b>Sonstige Malignome</b>	10	7	8	0
<b>Gesamt</b>	<b>94</b>	<b>61</b>	<b>55</b>	<b>1</b>

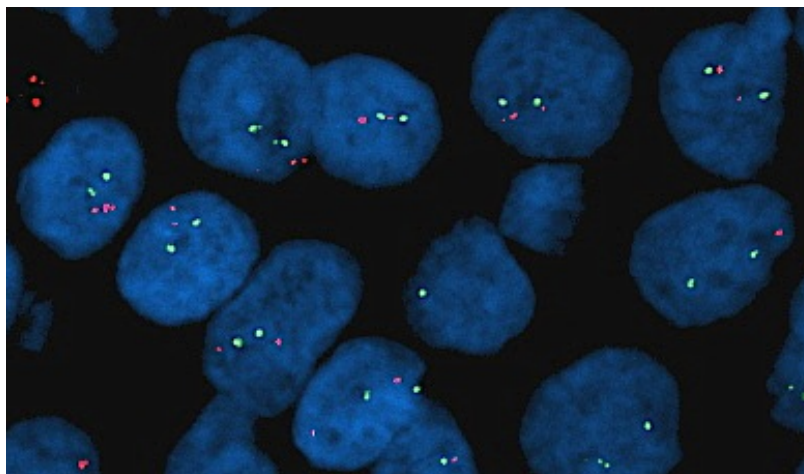
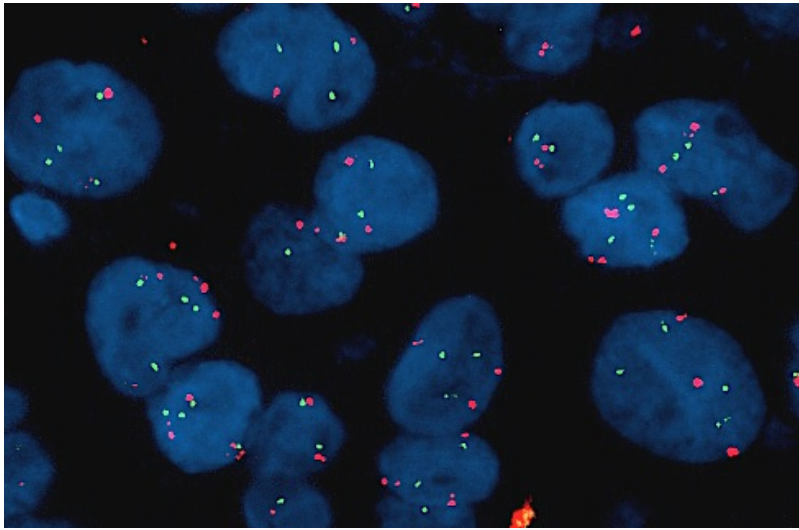
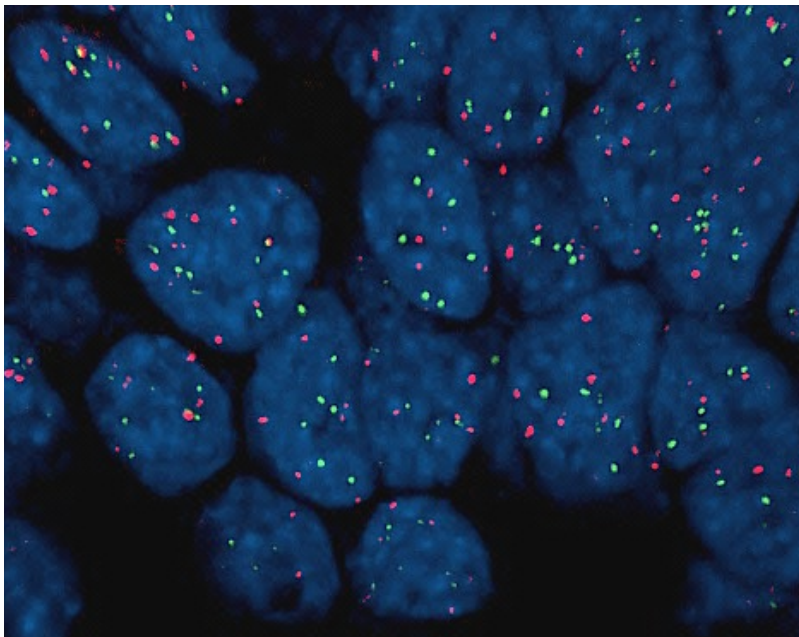


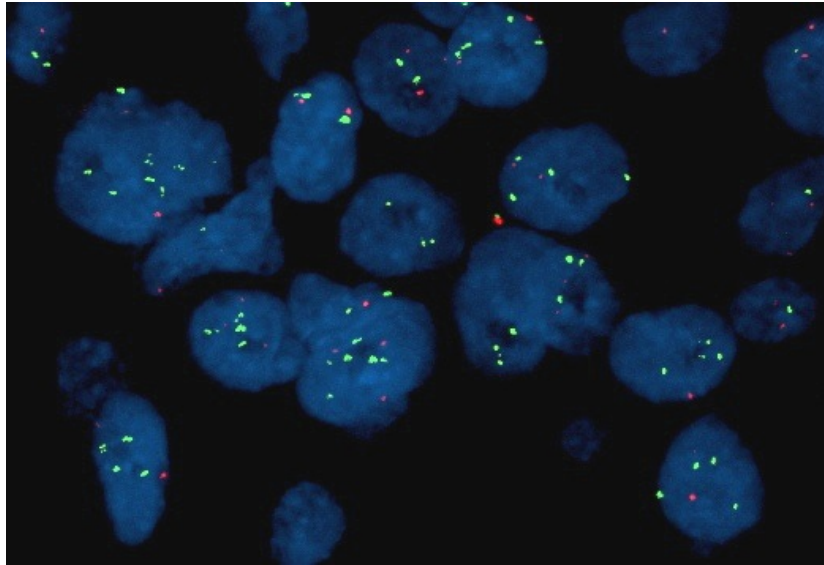
Abb. 26: Disomie von *FGFR3* bei einem Karzinom ex pleomorphes Adenom



**Abb. 27: Niedrige Polysomie von FGFR3 bei einem Karzinom ex pleomorphes Adenom**

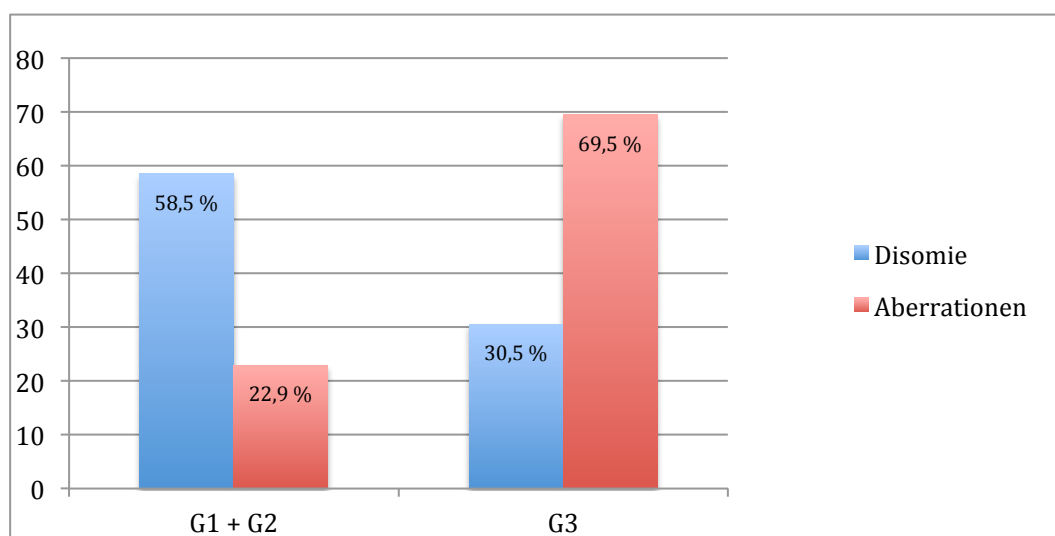


**Abb. 28: Hohe Polysomie von FGFR3 bei einem Mukoepithelioidkarzinom**



**Abb. 29: Amplifikation von FGFR3 bei einem adenoid-zystischen Karzinom**

Auch der Genstatus von FGFR3 zeigte wie auch schon MDM4 signifikante Zusammenhänge in Hinsicht auf den Malignitätsgrad. Bei der Mehrzahl der Patienten (58,5%) mit niedrig-malignen oder mittelgradig differenzierten Speicheldrüsentumoren konnte keine genetische Aberration von FGFR3 nachgewiesen werden. Dem gegenüber zeigten sich FGFR3-Abberationen bei 69,5% der Patienten mit schlecht-differenzierten Karzinomen (Abb. 30).

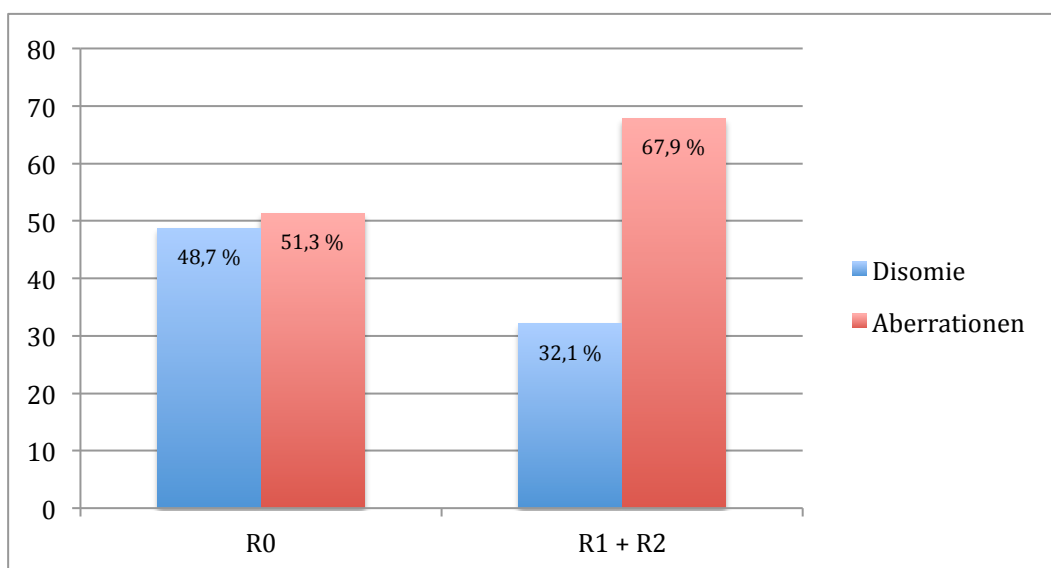


**Abb. 30: Verteilung FGFR3 Genstatus und Grading ( $p < 0,001$ ;  $n = 211$ )**



Es bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen der Ausdehnung des Tumors und vorhandenen Genveränderung von FGFR3. Die Zahl der Aberrationen bei T1- und T2-Status (50,8%) entsprach in etwa dem Patientenkollektiv ohne Aberrationen (49,2%). Ein auffälliger Genstatus konnte bei 61,4% der Patienten mit fortgeschrittenem Tumorwachstum (T3 und T4) beobachtet werden ( $p>0,05$ ;  $n=211$ ). Auch in Bezug auf Lymphknoten- und Fernmetastasen, Alter und Geschlecht konnten keine aussagekräftigen Zusammenhänge mit genetischen Aberrationen von FGFR3 hergestellt werden.

Bezüglich des Tumorstadiums stellten sich wieder statistische Assoziationen dar. Die Stadien I und II wiesen in 53,3% der Fälle Disomien auf. Dem gegenüber zeigten 62,5% der Patienten mit fortgeschrittenem Stadium (III und IV) eine Aberration von FGFR3 und nur 37,5% eine Disomie ( $p=0,025$ ;  $n=210$ ). Im Gegensatz zu MDM4 wies FGFR3 eine signifikante Verknüpfung mit dem R-Status auf. War kein Residualtumor nachweisbar, so zeigten die Patienten in 51,3% der Fälle Genveränderungen. Deutlicher stellte sich der Unterschied bei mikroskopisch (R1) und makroskopisch (R2) diagnostiziertem Residualtumor dar. Hier konnte bei 67,9 % der Patienten eine Aberration festgestellt werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Verteilung FGFR3 Genstatus und R-Status ( $p=0,0039$ ;  $n=209$ )**

### 4.2.3 MDM4 und FGFR3

Vergleicht man beide Gene miteinander, so zeigten sich signifikante Zusammenhänge. War keine genetische Mutation von MDM4 vorhanden, so war in 59,9% der Fälle auch eine Disomie bei FGFR3 zu beobachten. Lag eine Aberration von MDM4 vor, dann ließ sich zu 76,9% auch eine Genveränderung von FGFR3 nachweisen (Tab. 23).

In 24,5% wiesen beide Gene eine hohe Polysomie auf. Bei den hohen Polysomien von FGFR3 zeigten 13,2% eine Amplifikation und 22,6% eine niedrige Polysomie von MDM4. Auf die niedrige Polysomie von FGFR3 fielen weitere 32,1% der Aberrationen von MDM4. Im Einzelnen war dies in 38,9% eine niedrige Polysomie, in 27,8% eine hohe Polysomie und in 33,3% der Fälle eine Amplifikation von MDM4 ( $p < 0,001$ ;  $n = 212$ ).

Tab. 23: Relationen zwischen MDM4 und FGFR3 ( $p < 0,001$ ;  $n = 212$ )

		FGFR3	
		Disomie	Aberration
MDM4	Disomie	88 (59,9%)	59 (40,1%)
	Aberration	15 (23,1%)	50 (76,9%)
	<b>Gesamt</b>	<b>103</b>	<b>109</b>

## 4.3 Überlebensrate und Prognose – Klinisch-pathologische Parameter

### 4.3.1 Tumorentitäten

Zur Prognosebestimmung wurden Patientendaten über einen Zeitraum von einem Monat bis zu 21,2 Jahren erfasst. Im Schnitt lag die Beobachtungsphase der Erkrankten bei 4,85 Jahre und die 5- bzw. 10-Jahres tumorspezifische Überlebensrate (TSÜ) aller Patienten bei 74,8% bzw. 68,9%. Eine detaillierte Auflistung der häufigsten Speicheldrüsenmalignome ist Tabelle 24 zu entnehmen.

Tab. 24: Überlebensrate der häufigsten Entitäten ( $p=0,001$ )

Entität	5-J-TSÜ	10-J-TSÜ	Anzahl der Fälle
<b>Adenoid-zystisches Karzinom</b>	78,2%	76,4%	55
<b>Mukoepidermoidkarzinom</b>	84,3%	80,4%	51
<b>Azinuszellkarzinom</b>	97,7%	95,5%	44
<b>Adenokarzinom NOS</b>	62,2%	62,2%	37
<b>Duktales Adenokarzinom</b>	68,6%	0%	35
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	71%	71%	31
<b>Myoepitheliales Karzinom</b>	66,7%	66,7%	21

Mit einer 5-J-TSÜ von 97,7% war das Azinuszellkarzinom prognostisch am besten, gefolgt vom Mukoepidermoidkarzinom mit 84,3% und dem adenoid-zystischen Karzinom mit 78,2%. Für die 10-J-TSÜ ergab sich ein analoges Bild. Mit 95,5% ist auch hier für das Azinuszellkarzinom die Prognose sehr gut. Ähnlich gut war die Überlebensrate bei Mukoepidermoidkarzinomen (80,4%), wobei das Überleben vom Differenzierungsgrad abhängig war. Während bei hoch differenzierten (G1) Mukoepidermoidkarzinomen die

Überlebensrate bei 96,3% (5-J-TSÜ) lag, zeigten schlecht differenzierte (G3) Mukoepidermoidkarzinome mit einer 5-J-TSÜ von 63,6% eine deutlich schlechtere Prognose ( $p < 0,001$ ). Die schlechteste Prognose ergab sich für das duktales Adenokarzinom. Nach 5 Jahren waren hier noch 68,6% der erkrankten Patienten am Leben. Die Überlebensraten der häufigsten Entitäten sind in Abbildung 32 ersichtlich.

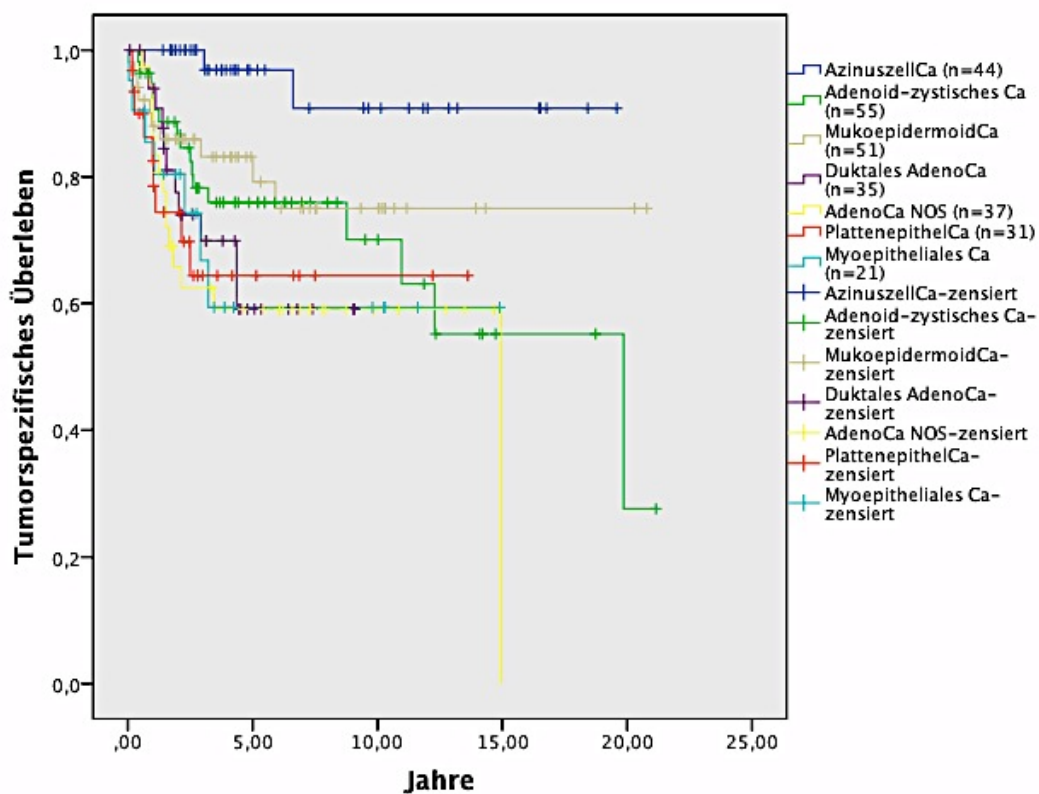


Abb. 32: Tumorentitäten ( $p=0,001$ ;  $n=274$ )

### 4.3.2 Alter und Geschlecht

Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung älter als 70 Jahre waren, hatten eine 5-J-TSÜ von 63,9% und eine 10-J-TSÜ von 62,3% (Abb. 33 und 34). Eine deutlich bessere Prognose ( $p < 0,001$ ) ergab sich für alle Patienten, die jünger als 70 Jahre waren. Hier lag die Rate bei 86,6% (5-J-TSÜ) und 84,7% (10-J-TSÜ).

Kein signifikanter Zusammenhang zeigte sich hinsichtlich des Geschlechts ( $p = 0,335$ ).

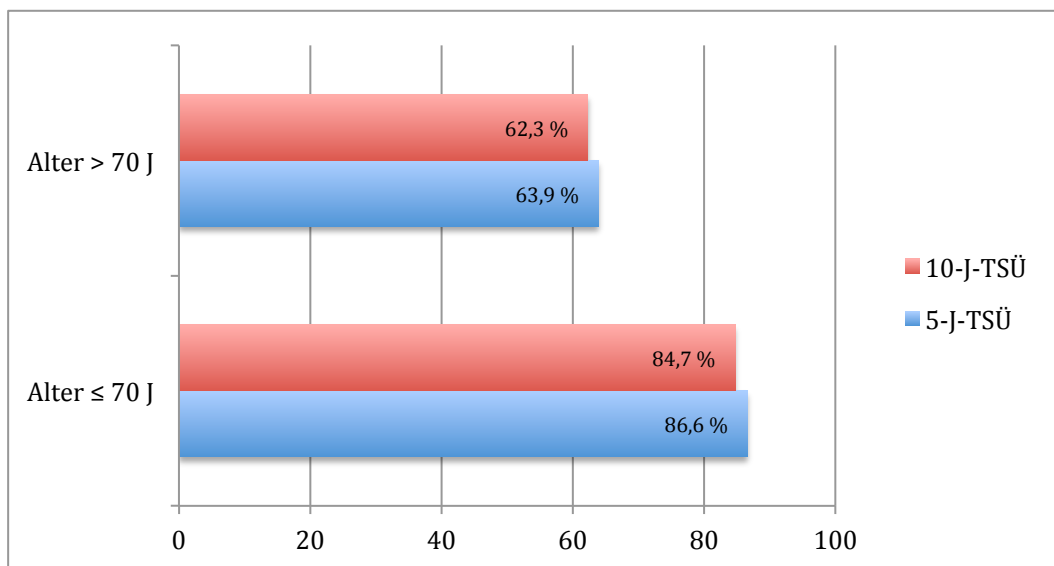


Abb. 33: Altersabhängige Überlebensrate in Prozent ( $p < 0,001$ ;  $n = 324$ )

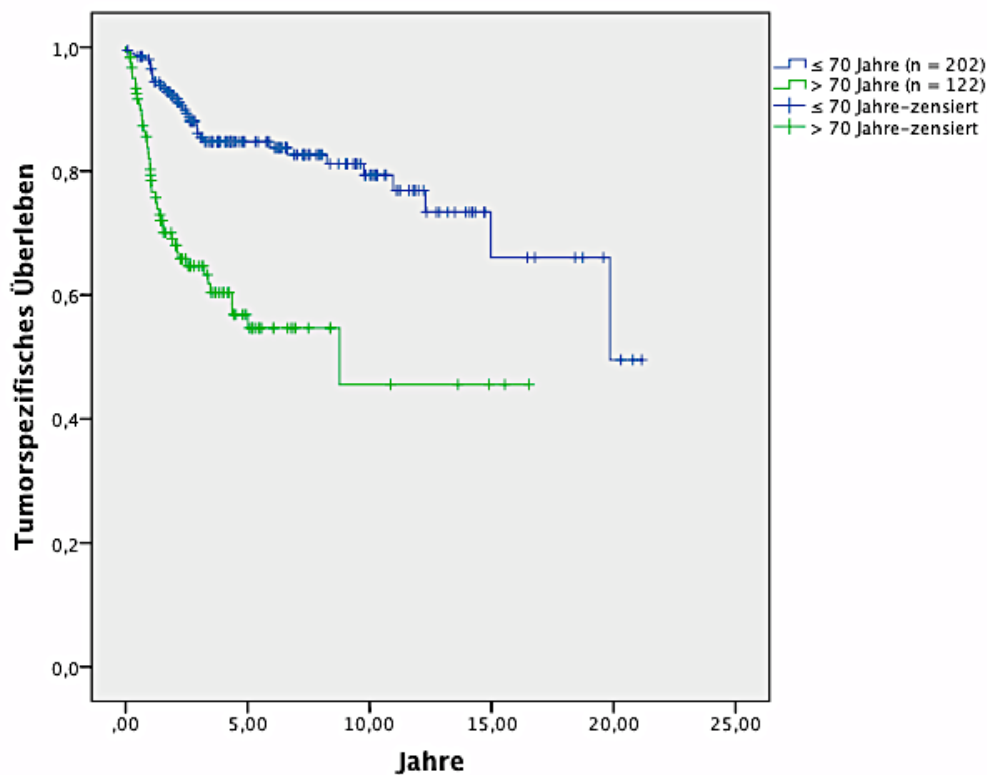


Abb. 34: Alter ( $p < 0,001$ ;  $n = 324$ )

### 4.3.3 Lokalisation

Die günstigste Prognose konnte für Malignome ausgesprochen werden, die in den kleinen Speicheldrüsen ( $n = 47$ ) lokalisiert waren. Hier lag die 5-J-TSÜ bei 91,5% und die 10-J-TSÜ bei 87,2%. War die Gl. submandibularis ( $n = 46$ ) betroffen, so lag sowohl die 5-Jahres-, als auch die 10-Jahres-Prognose bei 76,1%. Karzinome der Gl. parotidea ( $n = 229$ ) zeigten eine 5-J-TSÜ von 75,5% und eine 10-J-TSÜ von 73,8%. Die ungünstigste Prognose konnte für die Gl. sublingualis ermittelt werden. Beide Patienten verstarben binnen drei Jahren nach Diagnosestellung (Abb. 35).

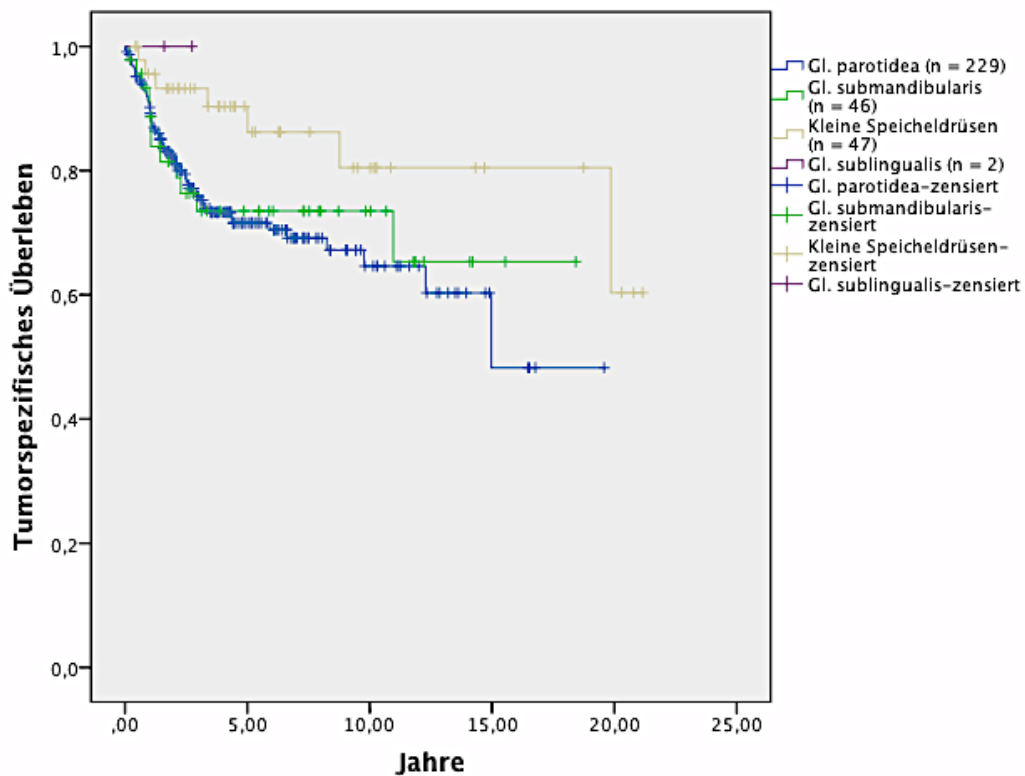


Abb. 35: Tumorlokalisation (p=0,286; n=324)

#### 4.3.4 TNM-Klassifikation

Hinsichtlich der Tumorgröße ergaben sich folgende prognostische Werte. Bei kleinerer Ausdehnung des Malignoms (T1+T2; n=188) zeigte sich eine tumorspezifische Überlebensrate von 88,3% (5 Jahre) bzw. 86,7% (10 Jahre). Lag eine T3 oder T4 Situation (n=130) vor, so war dies mit einer deutlich schlechteren Prognose von 63,4% bzw. 61,1% vergesellschaftet (Abb. 36;  $p < 0,001$ ).

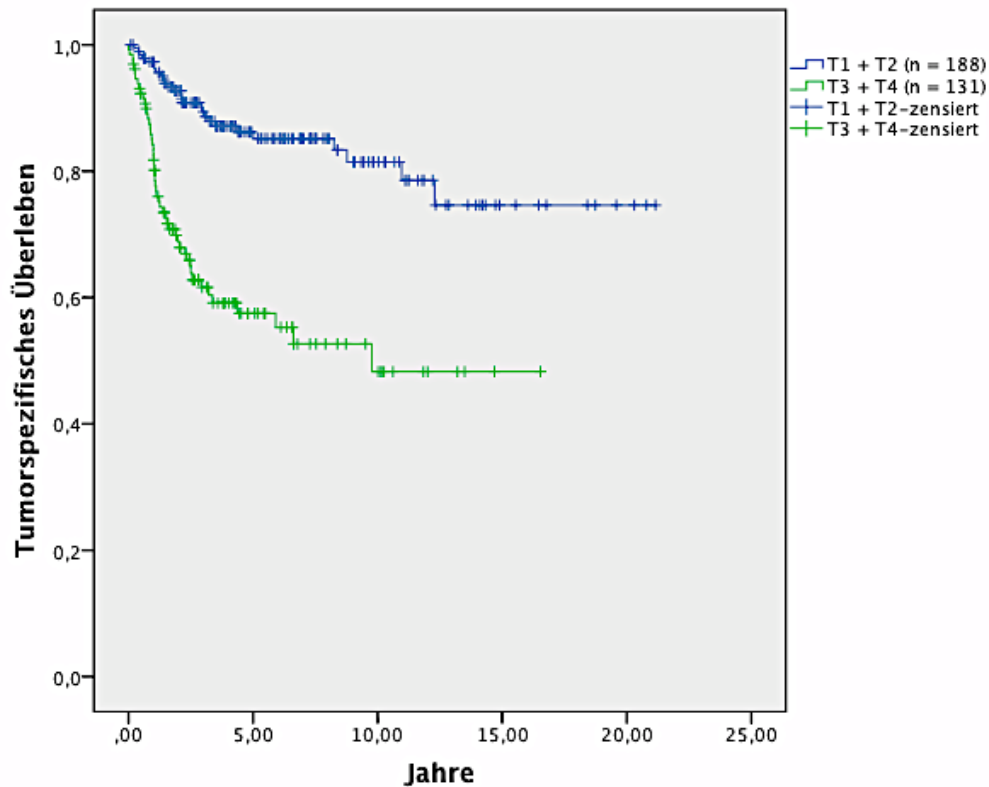


Abb. 36: Tumorstadium (T-Status;  $p < 0,001$ ;  $n = 318$ )

Diagnostizierte Lymphknotenmetastasen (N1-N3;  $n = 101$ ) waren mit einer wesentlich ungünstigeren Prognose assoziiert. Die 5-J-TSÜ lag hier im Schnitt bei 57,4%, die 10-J-TSÜ bei 54,5%. Die Überlebensrate bei Erkrankten mit N2-Situation lag nach 5 Jahren bei nur 41,7%. Dem gegenüber wiesen Patienten mit einer N0-Situation ( $n = 215$ ) mit 87,4% (5-J-TSÜ) und 86% (10-J-TSÜ) signifikant bessere Prognosen auf (Abb. 37;  $p < 0,001$ ).



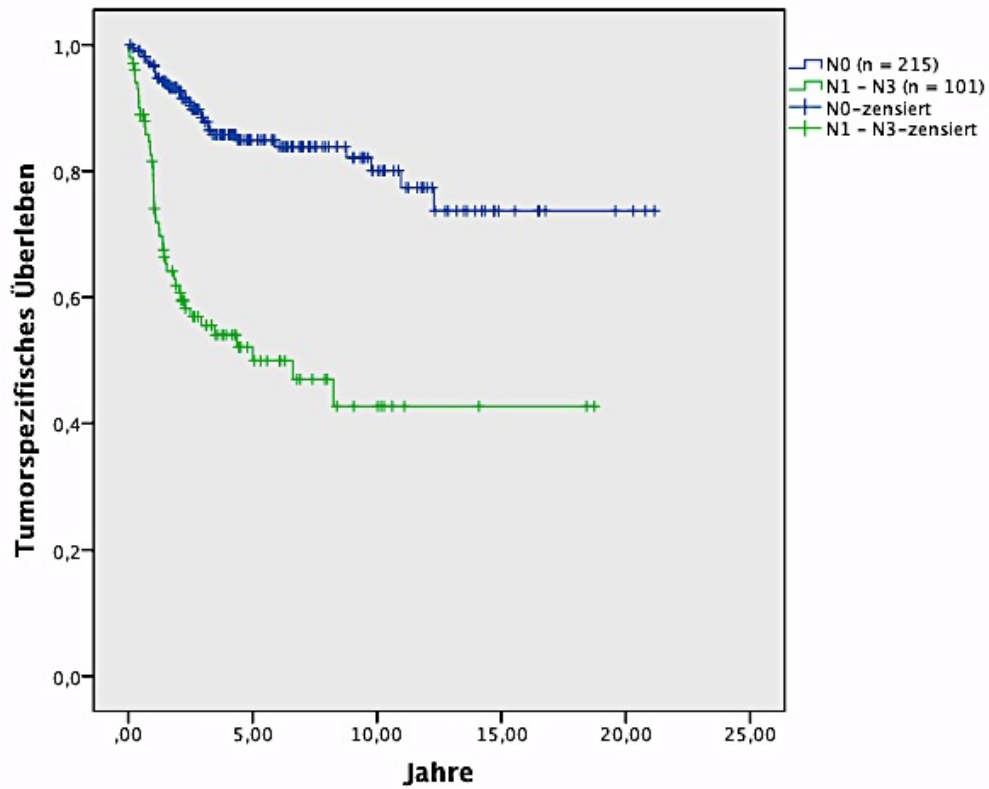


Abb. 37: Lymphknotenmetastasen (N-Status;  $p < 0,001$ ;  $n = 313$ )

Bei vorhandenen Fernmetastasen lag das tumorspezifische Überleben bei 30,3% bzw. 27,3% (5 bzw. 10 Jahre). Konträr dazu war die Prognose mit 83,3% und 81,9% bei Patienten ohne Fernmetastasierung deutlich besser ( $p < 0,001$ ; Abb. 38).

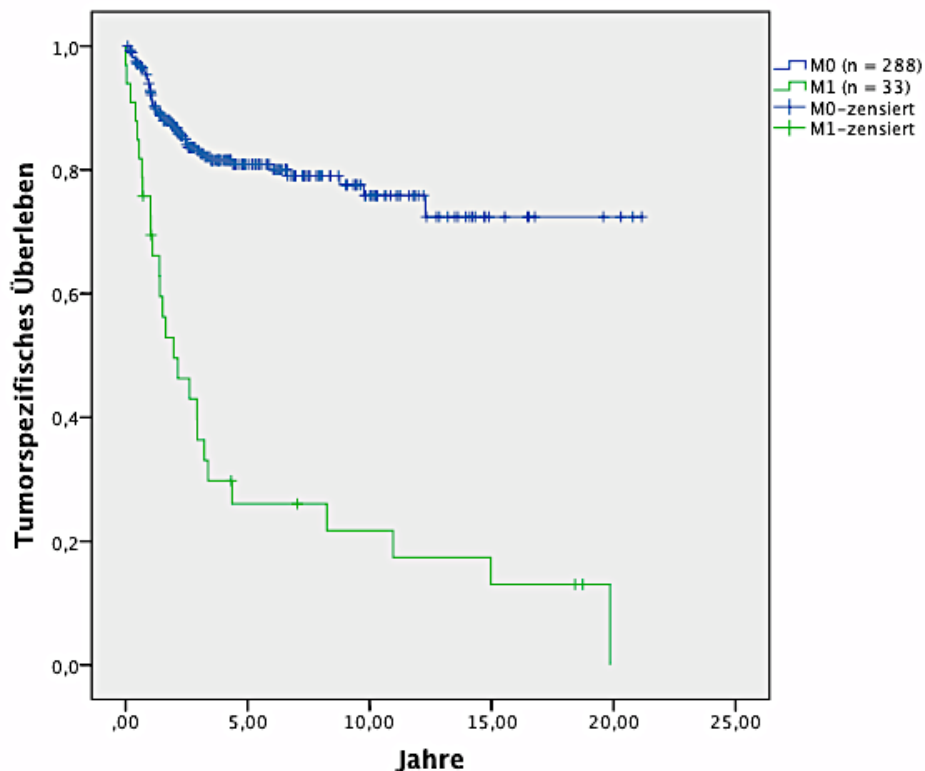


Abb. 38: Fernmetastasen ( $p < 0,001$ ;  $n = 320$ )

In Abbildung 39 ist die signifikante Assoziation zwischen Tumorstadium und Überleben dargestellt. Es zeigte sich, dass Patienten in niedrigen Stadien (I+II) mit 93% eine wesentlich bessere 5-Jahres-Prognose hatten als jene in fortgeschrittenen Stadien (III+IV) mit 65,9%. Auch die 10-Jahres-Überlebensrate zeigte mit 91,6% gegenüber 63,7% ähnliche Werte ( $p < 0,001$ ;  $n = 322$ ).

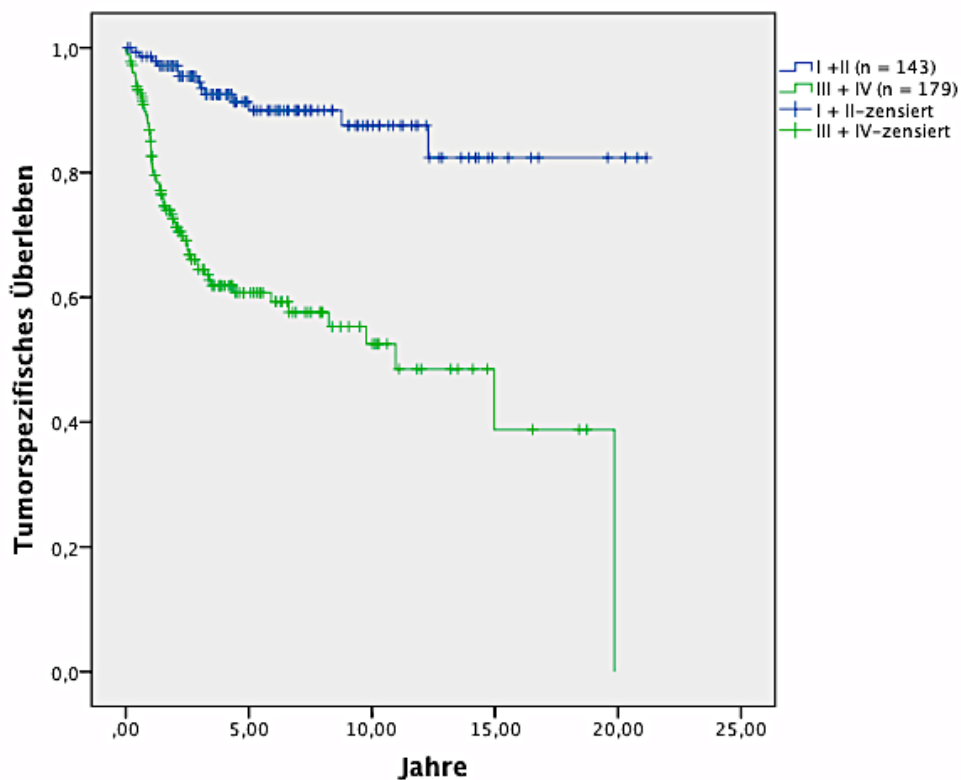


Abb. 39: Tumorstadium nach UICC ( $p < 0,001$ ;  $n = 322$ )

#### 4.3.5 Grading

Die Überlebensrate für niedrig-maligne Karzinome (G1) war nach fünf Jahren bei 91,4% und nach 10 Jahren noch bei 88,5%. Mittelgradig differenzierte Neoplasien der Speicheldrüsen (G2) zeigten eine 5-J-TSÜ von 85,2% und eine 10-J-TSÜ von 83,3%. Schlechtere Prognosen wiesen G3-Karzinome mit 48,5% (5-J-TSÜ) und 42,2% (10-J-TSÜ) auf (Abb. 40;  $p < 0,001$ ).

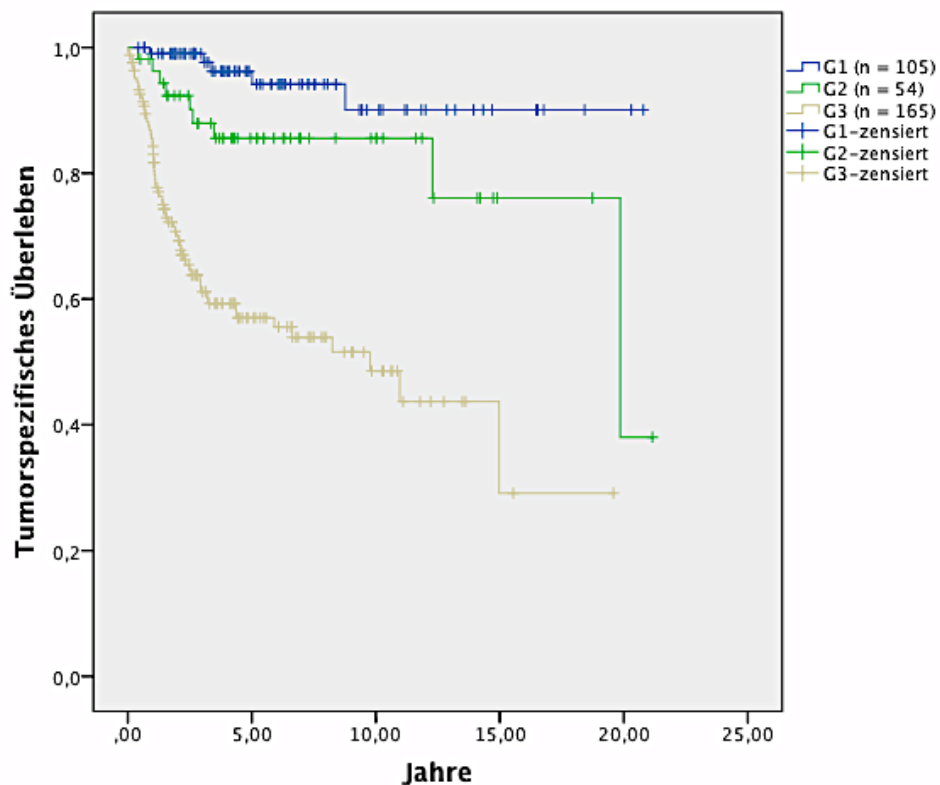


Abb. 40: Malignitätsgrad ( $p < 0,001$ ;  $n = 324$ )

#### 4.3.6 Therapie

Von 132 Patienten, die rein chirurgisch behandelt wurden, überlebten 87,9% die ersten fünf Jahre. Die 10-Jahres-Prognose war mit 86,4% ähnlich gut. Bei 190 Erkrankten erfolgte zur Chirurgie noch eine adjuvante Behandlung wie Radiatio und/oder Chemotherapie. Hier lagen die Überlebensraten bei 72,1% (5-J-TSÜ) und 70% (10-J-TSÜ). In zwei Fällen wurde keine bzw. eine primäre Radiotherapie durchgeführt. Beide Patienten verstarben in Folge des Tumors binnen 2,5 Jahren (Abb. 41;  $p < 0,001$ ;  $n = 324$ ).

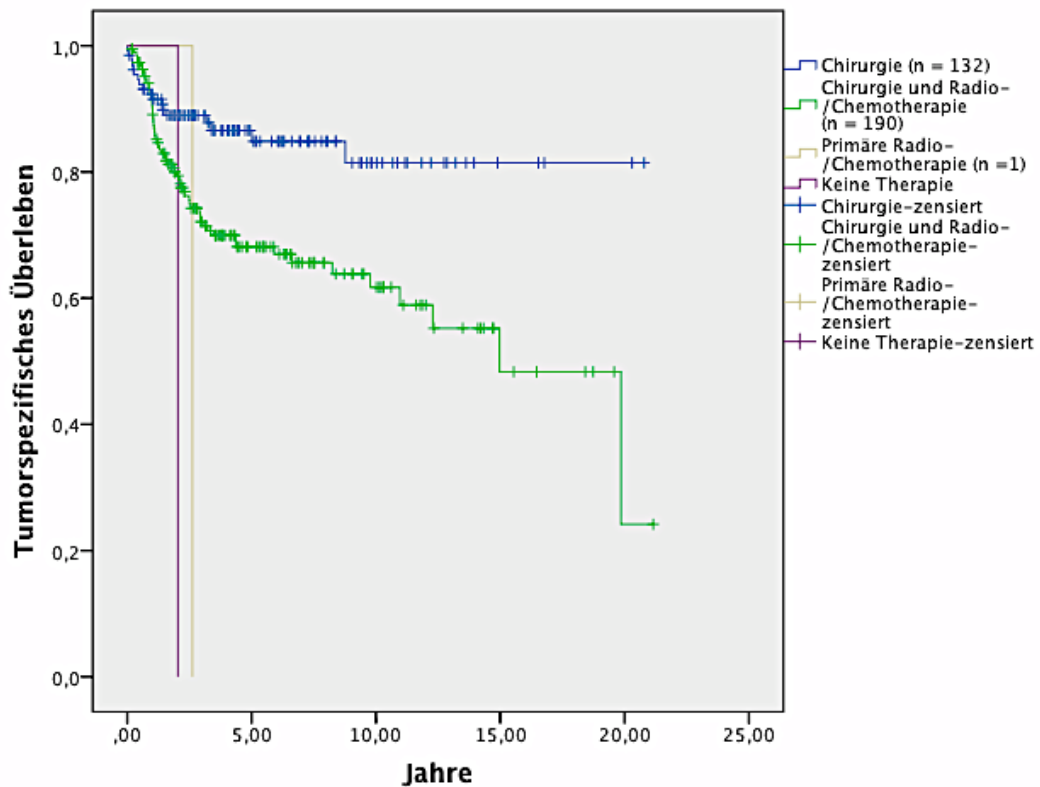


Abb. 41: Therapieformen (p<0,001; n=324)

Keine signifikante Assoziation bestand hinsichtlich der Prognose bei Neck Dissection. Bei der Mehrzahl der Patienten (n=234) wurde eine Ausräumung der Halslymphknoten vorgenommen. Die 5-J-TSÜ lag hier bei 76,9%. Ohne Neck Dissection (n=88) wurde die Prognose für 5 Jahre mit 80,7% angegeben (Abb. 42; p=0,366; n=322).

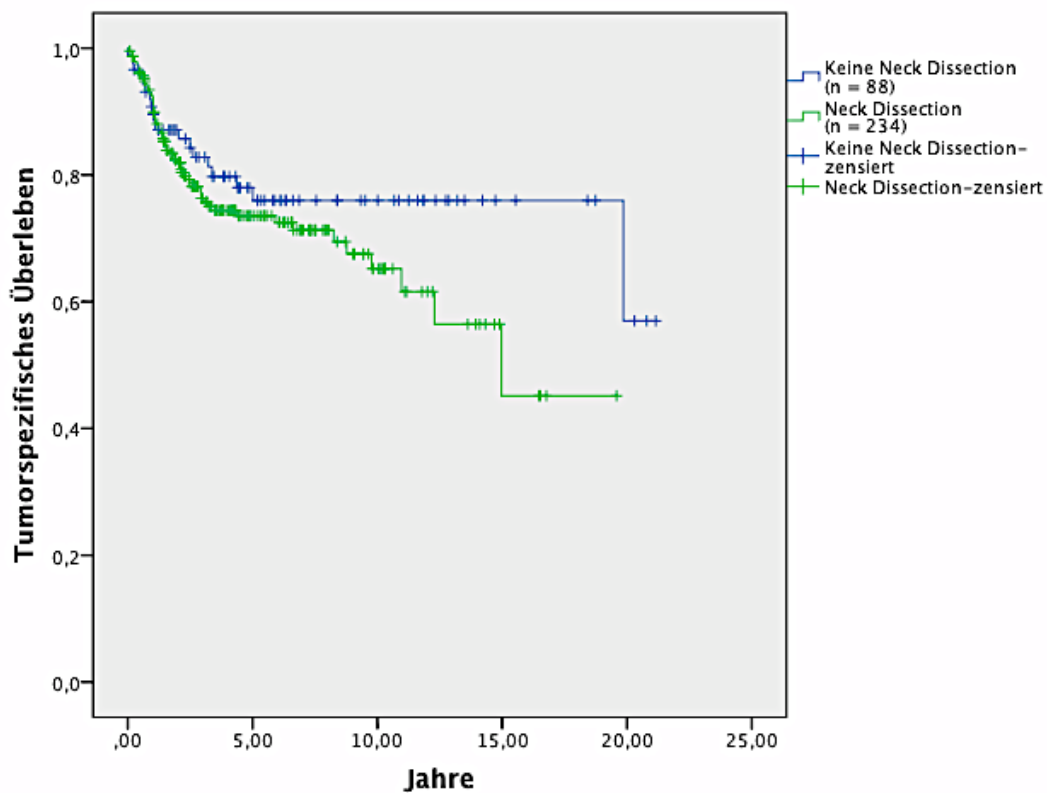


Abb. 42: Neck Dissection (p=0,366; n=322)

Kein Anhalt auf einen Residualtumor war bei 248 von 321 Patienten gegeben (R0). Die Überlebensraten waren mit 86,3% nach fünf Jahren und 84,3% nach 10 Jahren sehr gut. Wurde ein Residualtumor mikroskopisch nachgewiesen (R1), so sanken die Raten auf 64,2% bzw. 62,3%. Die schlechteste Prognose konnte für einen R2-Status (makroskopischer Tumorrest) eruiert werden. Nur 15% überlebten die ersten 5 Jahre (Abb. 43; p<0,001; n=321).

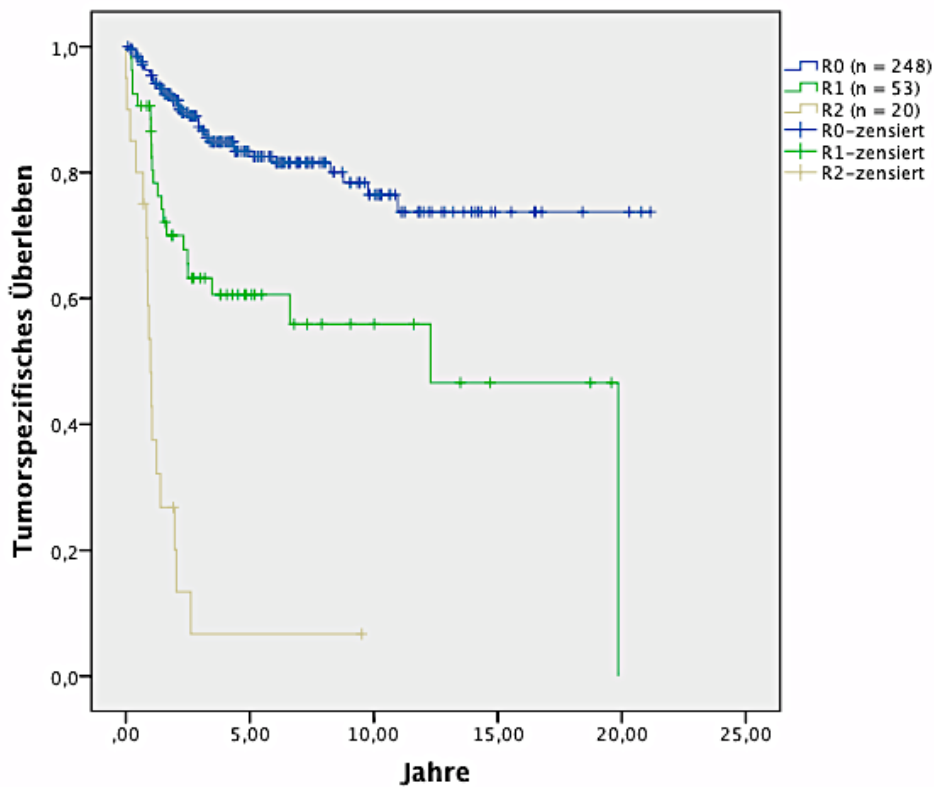


Abb. 43: Residualtumor ( $p < 0,001$ ;  $n = 321$ )

#### 4.3.7 Rezidive

Signifikante Zusammenhänge zeigten sich auch bezüglich der Prognose bei Rezidiven. Abbildung 44 ist zu entnehmen, dass die Überlebensraten bei Rezidivfreiheit mit 91,7% (5-J-TSÜ) und 90,8% (10-J-TSÜ) sehr hoch waren. Im Gegensatz dazu sank die Prognose bei diagnostiziertem Rezidiv drastisch auf 51,9% nach 5 Jahren und 46,9% nach 10 Jahren ( $p < 0,001$ ;  $n = 310$ ).

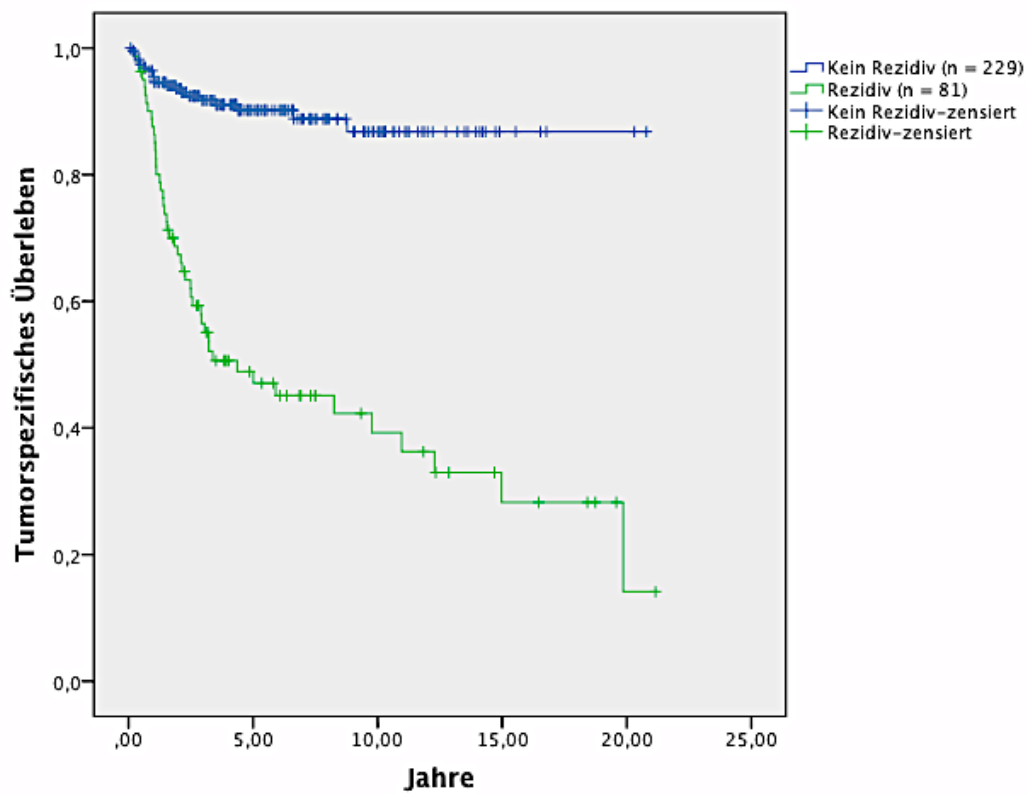


Abb. 44: Rezidive (p<0,001; n=310)

#### 4.4 Überlebensrate und Prognose – FISH Ergebnisse

##### 4.4.1 MDM4

Signifikante Korrelationen zeigten sich auch in Bezug auf den Genstatus von MDM4. Die günstigste Prognose war gegeben, wenn keine Aberrationen vorlagen. Je ausgeprägter die Genveränderungen waren, desto schlechter wurde die Überlebensrate. So sank die 5-Jahres-Prognose von 82% bei Disomien, auf 52,6% bei Amplifikationen. Eine detaillierte Übersicht ist Tabelle 25 und Abbildung 45 zu entnehmen.



Tab. 25: Tumorspezifische Überlebensraten von MDM4 ( $p=0,025$ ;  $n=234$ )

Überlebensrate	Disomie (n=150)	Niedrige Polysomie (n=34)	Hohe Polysomie (n=31)	Ampli- fikation (n=19)
<b>5 Jahre</b>	82%	76,5%	67,7%	52,6%
<b>10 Jahre</b>	80,7%	73,5%	67,7%	52,6%

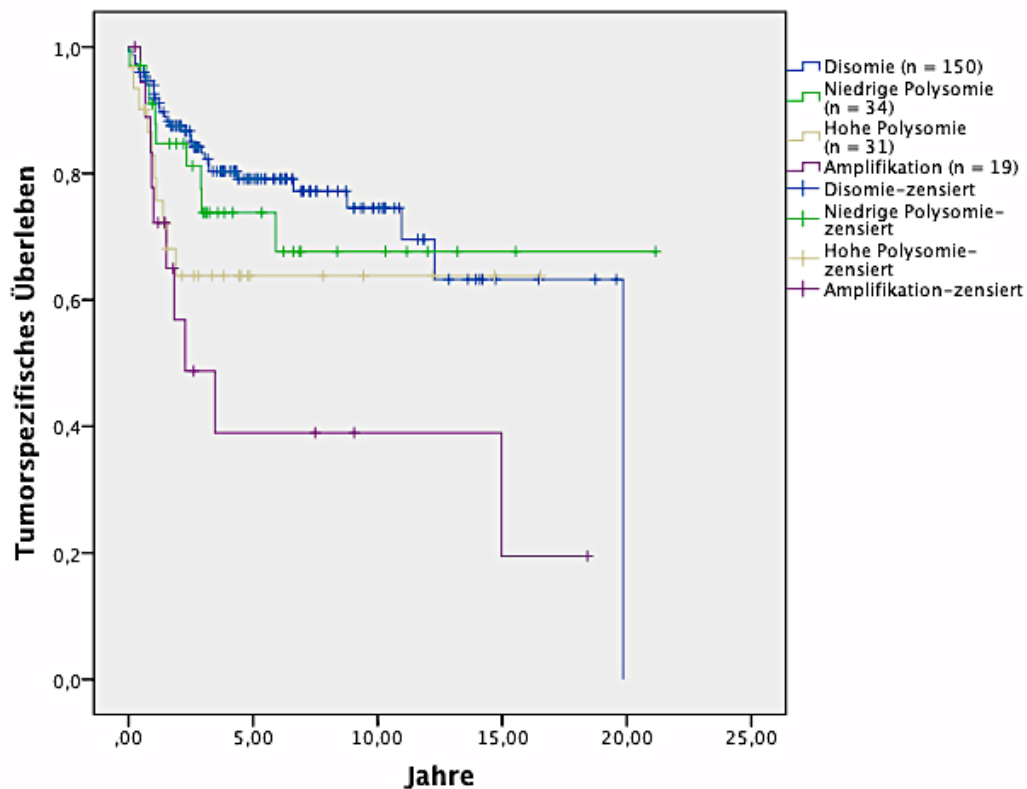


Abb. 45: MDM4 Aberrationen ( $p=0,025$ ;  $n=234$ )

#### 4.4.2 FGFR3

Auch bezüglich des Genstatus von FGFR3 waren deutliche Assoziationen mit der Überlebensrate festzustellen. Wie auch bei MDM4 ergaben sich mit einer 5-J-TSÜ von 87,2%

die besten Prognosen für Disomien. Für das Vorliegen von Amplifikationen zeigte sich auch hier wieder die ungünstigste Prognose. Zwar war nur ein Patient betroffen, dieser verstarb allerdings tumorbedingt 2 Jahre nach Diagnosestellung. Tabelle 26 und Abbildung 46 sind die entsprechenden Werte zu entnehmen.

Tab. 26: Tumorspezifische Überlebensraten von FGFR3 ( $p = 0,008$ ;  $n = 211$ )

Überlebensrate	Disomie (n=94)	Niedrige Polysomie (n=61)	Hohe Polysomie (n=55)	Amplifikation (n=1)
<b>5 Jahre</b>	87,2%	72,1%	69,1%	0%
<b>10 Jahre</b>	85,1%	68,9%	69,1%	0%

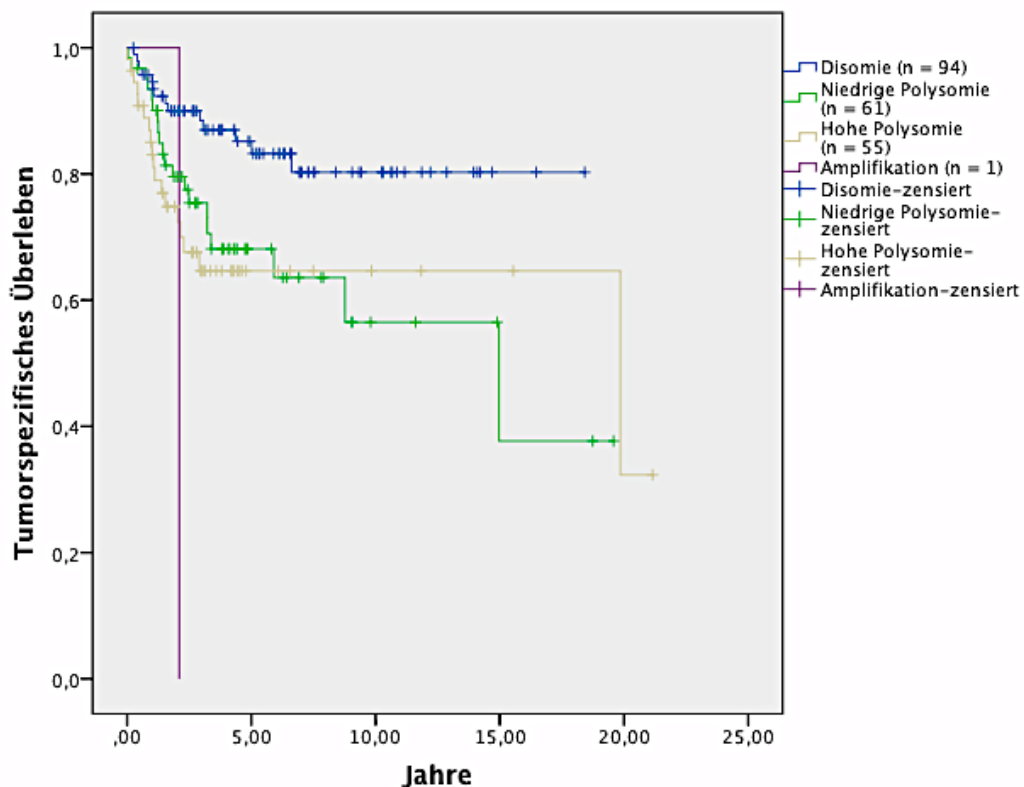


Abb. 46: FGFR3 Aberrationen ( $p=0,008$ ;  $n=211$ )

#### 4.5 Multivariate Überlebensrate

Als signifikanter eigenständiger Prognosefaktor stellte sich in Bezug auf die günstigste Überlebensrate in der multivariaten Analyse (Tab. 27) das Alter der Patienten dar ( $p=0,049$ ). Die ungünstigste Prognose konnte für den Malignitätsgrad ermittelt werden. Hier lag das Risiko an den Folgen des Tumors zu versterben fast um ein fünffaches höher (Odds-Ratio 4,935;  $p=0,005$ ). Weitere Signifikanzen erwiesen sich im Falle von Lymphknotenmetastasen ( $p=0,003$ ) sowie bei mikro- und makroskopischem Residualtumor ( $p=0,019$ ). Es ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge in der multivariaten Überlebensanalyse mit MDM4, FGFR3 und der Tumorgroße darstellen.

Tab. 27: Multivariate Relationen (KI = Konfidenzintervall)

Parameter	Signifikanz	Odds Ratio (95% KI)
<b>Alter (<math>\leq 70</math> vs. <math>&gt;70</math>)</b>	0,049	1,897 (1,002-3,592)
<b>Malignitätsgrad (G1+G2 vs. G3)</b>	0,005	4,935 (1,635-14,900)
<b>T-Status (T1+T2 vs. T3+T4)</b>	0,074	2,024 (0,933-4,389)
<b>N-Status (N0 vs. N1+N2+N3)</b>	0,003	2,910 (1,423-5,950)
<b>R-Status (R0 vs. R1+R2)</b>	0,019	2,171 (1,134-4,158)
<b>MDM4 (Disomie vs. Aberration)</b>	0,950	1,021 (0,534-1,954)
<b>FGFR3 (Disomie vs. Aberration)</b>	0,085	1,957 (0,911-4,204)

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

Maligne Neoplasien der Speicheldrüsen sind selten und weisen zudem eine große Vielfalt auf. Laut WHO lassen sich 24 Entitäten unterscheiden [Barnes et al., 2005]. Allein für dieses Patientenkollektiv konnten 16 Tumortypen diagnostiziert werden. Die Hälfte der dieser Studie zu Grunde liegenden Entitäten wurde bei weniger als 10 Patienten manifest. Aufgrund der geringen Anzahl der Patientenfälle und der daraus resultierenden Schwierigkeit, valide Aussagen zu treffen, ist eine kritische Evaluierung unerlässlich. Ein Großteil der Literatur beschäftigt sich daher ausschließlich mit den häufiger auftretenden Speicheldrüsenkarzinomen wie beispielsweise dem Azinuszellkarzinom [Breen et al., 2012, Schwarz et al., 2012], dem adenoid-zystischen Karzinom [Lukšić et al., 2013, Vékony et al., 2007] oder auch dem Mukoepidermoidkarzinom [Liyanage et al., 2013, Schwarz et al., 2011a]. Einige Arbeiten, die mehrere Entitäten einschließen, weisen zumeist nur geringe Fallzahlen auf, wie beispielsweise ARKISH ET AL. mit 61 Fällen oder OLIVEIRA ET AL. mit 63 Fällen [Arkish et al., 2012, Oliveira et al., 2011]. Aussagekräftige Zahlen zeigte eine Studie zu Speicheldrüsentumoren in China von WANG ET AL. mit einem Gesamtkollektiv von 1176 Patienten. Insgesamt wurde bei 289 Patienten (24,6%) ein maligner Tumor der Speicheldrüsen diagnostiziert und ausgewertet [Wang et al., 2012]. Auch die Studie von LAWAL ET AL. weist mit 221 Fällen von Speicheldrüsenmalignomen ein größeres Patientenkollektiv auf [Lawal et al., 2013].

Für diese Arbeit konnten Daten von 324 Patienten erhoben und analysiert werden. Von den 16 diagnostizierten Entitäten wurden die 7 häufigsten gesondert betrachtet und die übrigen, deren Anteil <5% war, als „Sonstige Malignome“ zusammengefasst.

Unterstützend zur häufig schwierigen und nicht immer eindeutigen histopathologischen Diagnostik der einzelnen Subtypen wurde eine Genanalyse mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt, um dadurch eine vom histologischen Subtyp unabhängige und aussagekräftige Prognose zu erhalten. Mit Hilfe der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung lassen sich spezifische DNA-Sequenzen visualisieren und einzelne Zellen dahingehend beurteilen. Genutzt wird diese Analyse vor allem, um genetische Aberrationen zu erkennen. Außerdem ermöglicht diese Diagnostikmethode in vielen Fällen eine zusätzliche Aussage zur Prognose der betroffenen Patienten. Nicht zuletzt stellt sie mittlerweile bei manchen Tumoren die Grundlage zielgerichteter molekularbiologischer Antikörpertherapien (z.B. Trastuzumab-Therapie bei Mammakarzinomen mit Amplifikation von HER2) dar [Savic et al., 2007]. Die FISH-Analyse erweist sich im Vergleich zur immunhistochemischen Expressionsanalyse insbesondere deshalb als gewinnbringend, da sich genetische Aberrationen in der Regel auf Tumorgewebe konzentrieren. Rein immunhistochemische Analysen zeigen auf Grund der Proteinexpression auch in physiologischem Gewebe bisweilen falsch positive Ergebnisse [Savic et al., 2007, Han et al., 2014]. Angesichts dieser Erkenntnisse empfehlen KATO ET AL. die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung zur Diagnostik von Genaberrationen bei FGFR, was auch in dieser Arbeit Anwendung fand [Kato et al., 2013]. Auch SAVIC ET AL. favorisieren die FISH-Analyse zur Detektion von HER2-Amplifikationen im Rahmen der Mammakarzinombehandlung, da sich mit ihr validere Ergebnisse im Vergleich zur Immunhistochemie erreichen lassen [Savic et al., 2007]. Auch hinsichtlich der Differentialdiagnose und dem Eruiieren neuer Therapieansätze bei Sarkomen erweist sich die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung von Vorteil [Merkelbach-Bruse et al., 2011, Weaver et al., 2008].

Zur Untersuchung der Tumorgewebe in dieser Studie wurden Tissue Microarrays (TMA) angefertigt. Diese Methode ermöglicht es, ein Vielzahl an Gewebeproben auf einem Objektträger zu fixieren und zeitgleich zu analysieren, was zu einer deutlichen Kosten- und

Zeitreduktion führt [Abrahão-Machado et al., 2013]. Das Gewebe kann sowohl durch in Situ Hybridisierung wie z.B. FISH, als auch durch Immunhistochemie beurteilt werden [Kononen et al., 1998]. Allerdings zeigt die Anwendung von Tissue Microarrays auch einen entscheidenden Nachteil. Um entsprechend viele Proben auf einen Objektträger zu bringen, wird von jedem (Tumor-) Gewebe nur ein kleiner Bereich von häufig nur 0,6 mm Durchmesser ausgestanzt. Gerade in heterogenen Geweberegionen ist es somit möglich, nicht ausreichend Tumorgewebe zu erfassen [McKenna et al., 2013, Abrahão-Machado et al., 2013]. Nichtsdestotrotz findet diese Methode in vielen Studien ihre Anwendung [Cooper et al., 2013, Soave et al., 2013]. Um repräsentative Ergebnisse zu erreichen, verwendeten PAIVA-FONESCA ET AL. Gewebestanzungen im Durchmesser von je 1, 2 und 3 mm [Paiva-Fonesca et al., 2013]. Auch SANTOS-GARCIA ET AL. bedienten sich einer Stanze von 2 mm [Santos-García et al., 2006]. In dieser Arbeit kamen daher ebenfalls Stanzen von 2 mm Durchmesser zum Einsatz, womit die Erfassung repräsentativer Gewebeproben möglich wurde und dadurch aussagekräftigere Ergebnisse erzielt werden konnten.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Deskriptive Analyse – Klinisch-pathologische Parameter**

#### **5.2.1.1 Tumorentitäten**

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt Daten von 324 Patienten erhoben und ausgewertet werden. Innerhalb des Kollektivs wurden 16 verschiedene Entitäten von Speicheldrüsenkarzinomen manifest. Am häufigsten wurde das adenoid-zystische Karzinom mit einem Anteil von 17% und das Mukoepidermoidkarzinom mit 15,7% diagnostiziert.

Sowohl bei DE OLIVEIRA ET AL. als auch bei LAWAL ET AL. repräsentierte das adenoid-zystische Karzinom mit 30% bzw. 42,1% ebenso die zahlreichste Entität [de Oliveira et al., 2009, Lawal et al., 2013]. In der Studie von TIAN ET AL. fielen jeweils 30% der Fälle auf das adenoid-zystische und das Mukoepidermoidkarzinom [Tian et al., 2010]. Nur bei WANG ET AL. erkrankten mehr Patienten an einem Mukoepidermoidkarzinom (24,6%) als an einem adenoid-zystischen Karzinom (18%) [Wang et al., 2012]. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien, so lassen sich Unterschiede beim duktalem Adenokarzinom erkennen. Bei 10,8% der Patienten aus diesem Kollektiv lautete die Diagnose duktales Adenokarzinom. Es lag somit an fünfter Stelle der häufigsten Speicheldrüsenmalignome. Ähnliche Zahlen beschrieben auch WANG ET AL. (9,3%) und OLIVEIRA ET AL. (4,8%) [Wang et al., 2012, Oliveira et al., 2011]. Demgegenüber war das Auftreten von duktalem Adenokarzinomen in den Studien von TIAN ET AL., LI ET AL. und LAWAL ET AL. mit 0,3 bis 0,5% deutlich seltener [Tian et al., 2010, Li et al., 2008, Lawal et al., 2013]. In den Studien von PACHECO-OJEDA ET AL. und SATKO ET AL. waren keine Fälle von duktalem Adenokarzinomen vertreten [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Satko et al., 2000]. Eine Erklärung hierfür ist, dass in früheren Studien verschiedene Tumorentitäten dem Adenokarzinomen NOS zugeordnet wurden, welche heute eigene Subtypen darstellen, wie beispielsweise das duktales Adenokarzinom oder das polymorphe low-grade Adenokarzinom [Ettl et al., 2007, Ehrenfeld et al., 2011]. Obwohl bereits 1968 durch KLEINSASSER ET AL. beschrieben, waren es dann unter anderem SKÁLOVÁ ET AL., die das duktales Adenokarzinom histopathologisch klar charakterisierten [Kleinsasser et al., 1968, Skálová et al., 2001].

### 5.2.1.2 Alter und Geschlecht

Verglichen mit dem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 60,8 Jahren in vorliegender Arbeit waren die Patienten in anderen Studien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger. Nur THERKILDSSEN ET AL. beschrieben ebenfalls ein Durchschnittsalter von 60 Jahren [Therkildsen et al., 1998]. Die größte Diskrepanz zu dieser Arbeit zeigte die Studie von LI ET AL. mit einem mittleren Alter von 45,2 Jahren [Li et al., 2008]. Die Patientenkollektive von WANG ET AL. und OLIVEIRA ET AL. wiesen mit einem Durchschnittsalter von 54 bzw. 55,3 Jahren annähernd ähnlichen Ergebnisse auf [Wang et al., 2012, Oliveira et al., 2011].

Die Geschlechterverteilung ist in den meisten Studien unspezifisch. Zumeist finden sich nur marginale Abweichungen. WANG ET AL. beschrieben mit 52,3% eine leicht erhöhte Erkrankungsrate bei Männern [Wang et al., 2012]. Eine deutlichere Betonung des männlichen Geschlechts mit einem Anteil von 57,2% zeigte die Studie von LI ET AL. [Li et al., 2008]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer diskreten Betonung des weiblichen Geschlechts (52,8%) decken sich mit den Studien von TIAN ET AL. (50,3%) und OLIVEIRA ET AL. (50,8%) [Tian et al., 2010, Oliveira et al., 2011].

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung der Entitäten beschrieben DE OLIVEIRA ET AL. einen deutlich größeren Anteil an Frauen bei adenoid-zystischen Karzinomen mit 66,7% und Mukoepidermoidkarzinomen mit 63,3% [de Oliveira et al., 2009]. Auch WANG ET AL. kamen mit 57,1% (adenoid-zystisches Karzinom) und 55% (Mukoepidermoidkarzinom) zu diesen Ergebnissen [Wang et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit waren ebenfalls 69,1% bzw. 62,7% der an einem adenoid-zystischen bzw. Mukoepidermoidkarzinom erkrankten Patienten Frauen.



### 5.2.1.3 Lokalisation

In der vorliegenden Arbeit war die Mehrzahl der malignen Speicheldrüsenneoplasien mit 71% in der Gl. parotidea lokalisiert. Dieses Ergebnis wird untermauert von den Studien von PACHECO-OJEDA ET AL. und OLIVEIRA ET AL., welche mit 60,3% bzw. 49,2% ebenso überwiegend Malignome der Parotis diagnostizieren konnten [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Oliveira et al., 2011]. Hingegen beschrieben LAWAL ET AL. deutlich mehr Karzinome der kleinen Speicheldrüsen, wobei das adenoid-zystische Karzinom gefolgt vom Mukoepidermoid- und Adenokarzinom NOS die häufigsten Entitäten darstellten. Insgesamt waren 74,1% aller adenoid-zystischen Karzinome in den kleinen Speicheldrüsen lokalisiert, aber nur 21,5% in der Gl. parotidea [Lawal et al., 2013]. In der Studie von TIAN ET AL. manifestierten sich ebenfalls 70% der adenoid-zystischen Karzinome in den kleinen Speicheldrüsen, wenngleich auch hier die Mehrzahl der Speicheldrüsentumoren mit 34% in der Gl. parotidea lokalisiert waren [Tian et al., 2010].

In dieser Arbeit waren die Gl. submandibularis und die kleinen Speicheldrüsen mit 14,2% und 14,5% gleich häufig betroffen. Dies weicht etwas von der bisherigen Literatur ab, in der die Gl. submandibularis mit 7,7 bis 14,4% deutlich seltener betroffen war, als die kleinen Speicheldrüsen mit 25,5 bis 40% [Li et al., 2008, Tian et al., 2010, de Oliveira et al., 2009].

Mit nur zwei Patienten wurden Karzinome der Gl. sublingualis in der vorliegenden Arbeit am seltensten diagnostiziert. Das bestätigten auch die Studien von LAWAL ET AL. und WANG ET AL. [Lawal et al., 2013, Wang et al., 2012]. Bei DE OLIVEIRA ET AL. wurde sogar kein Karzinom der Gl. sublingualis beschrieben [de Oliveira et al., 2009].

Grundsätzlich muss bei der Betrachtung der Tumorlokalisation in verschiedenen Publikationen die Struktur der publizierenden Klinik mit beachtet werden. So haben Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgische Kliniken, wie z.B. bei TIAN ET AL., in der Regel einen höheren Anteil an Speicheldrüsenkarzinomen der Mundschleimhaut, während Kliniken für

Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde einen höheren Anteil an Karzinomen der Ohrspeicheldrüsen aufweisen [Tian et al., 2010]. Die eigene Arbeit bietet diesbezüglich einen repräsentativen Überblick, da hier Tumoren sowohl von Kliniken für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie als auch für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde ausgewertet wurden.

#### **5.2.1.4 TNM-Klassifikation**

Am häufigsten wurden in dieser Arbeit maligne Speicheldrüsenneoplasien mit einem T1/T2-Status diagnostiziert (58,9%). Analog dazu stehen die Studien von OLIVEIRA ET AL. und THERKILDSSEN ET AL., in denen bei 65% bzw. 62,5% der Karzinome ein T1/T2-Status festgestellt wurde [Oliveira et al., 2011, Therkildsen et al., 1998].

Bei 31,3% der Patienten des Gesamtkollektivs wurden Lymphknotenmetastasen diagnostiziert. Im Kollektiv von PACHECO-OJEDA ET AL. konnte in 26% aller Fälle ein positiver Nodalbefund bestätigt werden und in der Studie von OLIVEIRA ET AL. waren sogar nur 14,3% der Patienten betroffen [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Oliveira et al., 2011].

PACHECO-OJEDA ET AL. beschrieben außerdem Fernmetastasen bei 21% der Patienten, wobei es sich hierbei vornehmlich um pulmonale bzw. ossäre Filiae handelte. In der Studie von OLIVEIRA ET AL. wurden dagegen in nur 9,5% der Fälle Fernmetastasen diagnostiziert, THERKILDSSEN ET AL. berichteten sogar von nur 2% [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Oliveira et al., 2011, Therkildsen et al., 1998]. Im eigenen Patientenkollektiv wurden bei 10,3% Fernmetastasen diagnostiziert.

Hinsichtlich der Stadieneinteilung konnte in dieser Arbeit am häufigsten Stadium IV mit 34,2% gefolgt von Stadium II mit 22,7% beobachtet werden. Bei WANG ET AL. stellte sich diese Situation genau umgekehrt dar. Hier wurde mit 32,9% am häufigsten Stadium II beschrieben. An zweiter Stelle folgte Stadium IV mit 26,1% [Wang et al., 2012]. Auch die

Studie von SATKO ET AL. zeigte Stadium II (46%) als häufigstes Tumorstadium, wobei Stadium IV mit 10% am seltensten diagnostiziert wurde [Satko et al., 2000].

### **5.2.1.5 Grading**

Die Einteilung des Malignitätsgrads von Speicheldrüsenkarzinomen unterliegt keinen einheitlichen Richtlinien und ist in der Literatur umstritten. Sowohl BAI ET AL. als auch SEETHALA verglichen die Unterschiede zwischen zwei Evaluierungssystemen für die Graduierung bei Mukoepidermoidkarzinomen. Zum einen die Klassifizierung der AFIP (Armed Forces Institute of Pathology), die auch durch die WHO Anwendung findet. Hier werden klassische Kriterien wie Mitoseaktivität und perineurale Infiltration betrachtet. Zum anderen die durch Brandwein modifizierte Variante mit zusätzlichen Merkmalen wie Knochen- und lymphovaskulärer Infiltration. Wurde der Malignitätsgrad nach Brandwein beurteilt, so wurde beispielsweise knapp die Hälfte aller Mukoepidermoidkarzinome, die laut AFIP als niedrig-maligne (G1) gewertet wurden, entweder den G2- oder den G3-Malignomen zugeordnet [Bai et al., 2013, Seethala 2009, Goode et al., 2005].

In der Literatur werden high-grade Malignome (G3) als selten vorkommend eingestuft [Nagao, 2013]. In der Studie von THERKILDSEN ET AL. beispielsweise ist der Anteil der G3-Karzinome mit 14,3 % am geringsten [Therkildsen et al., 1998]. Auch in der Studie von BHAYANI ET AL. zu adenoid-zystischen Karzinomen konnte bei 12% der Patienten der Tumor als gering differenziert (G3) klassifiziert werden [Bhayani et al., 2012]. Im Gegensatz dazu wurde im eigenen Kollektiv der Hälfte der Patienten mit einem Speicheldrüsenkarzinom (50,9%) ein hoher Malignitätsgrad (G3) zugeordnet. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen von OLIVEIRA ET AL., in welchen mit 52,4% ebenfalls die high-grade Tumoren (G3) überwiegen [Oliveira et al., 2011].

In der vorliegenden Arbeit ist das Adenokarzinom NOS eine der häufigsten Entitäten. Hier war der Anteil der G3-Karzinome mit 81,1% sehr hoch. Auch THERKILDSEN ET AL. beschrieben bei Adenokarzinomen NOS in der Mehrzahl (51,7%) Tumoren mit hohem Malignitätsgrad [Therkildsen et al., 1998]. Das Mukoepidermoidkarzinom wird als einzige Entität von der WHO in drei Malignitätsgrade eingeteilt. Im eigenen Kollektiv war die gut-differenzierte Form (G1) mit 58,8% am häufigsten, gefolgt von der schlecht-differenzierten (G3) mit 29,4%. In der Studie von McHUGH ET AL. waren die high-grade Mukoepidermoidkarzinome ebenso die zweithäufigsten (32,3%). Allerdings wurden hier mit 43,5% die mittelgradig-differenzierten Mukoepidermoidkarzinome am zahlreichsten beschrieben [McHugh et al., 2012].

Die in der eigenen Arbeit verwendete Graduierung von Speicheldrüsenkarzinomen zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten von Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung und Gesamtüberleben, was die große Bedeutung eines Gradings auch bei Speicheldrüsenkarzinomen herausstellt.

#### **5.2.1.6 Therapie**

Die Patienten im eigenen Kollektiv wurden hauptsächlich chirurgisch mit adjuvanter Radiatio bzw. Radiochemotherapie behandelt (58,6%). Eine rein chirurgische Therapie wurde bei 40,7% der Patienten durchgeführt. Der Anteil der Kombinationstherapie aus Chirurgie und Bestrahlung ist in einigen Studien etwas geringer. So beschrieben OLIVEIRA ET AL. in 50,8% der Fälle und WANG ET AL. in 48% diese Therapieform [Oliveira et al., 2011, Wang et al., 2012]. Bei THERKILDSEN ET AL. und PACHECO-OJEDA ET AL. waren es sogar nur 40,2% bzw. 38% [Therkildsen et al., 1998, Pacheco-Ojeda et al., 2000].

Insgesamt wurde bei 72,4% des vorliegenden Patientenkollektivs eine Halslymphknotenausräumung vorgenommen. Die Studien von WANG ET AL. und THERKILDSSEN ET AL. zeigen deutlich geringere Zahlen. Nur knapp die Hälfte der Patienten (48,6%) im Kollektiv von WANG ET AL. wurden durch eine Neck Dissection therapiert. Bei THERKILDSSEN ET AL. waren es letztlich nur 22,3 % [Wang et al., 2012, Therkildsen et al., 1998]. In der Studie von NOBIS ET AL. wurde dagegen bei 87 von 94 Patienten (92,6%) eine Neck Dissection vorgenommen [Nobis et al., 2013].

Die Angaben in der Literatur über die Notwendigkeit einer Ausräumung der Halslymphknoten bei einer cN0-Situation sind unklar [Nobis et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 68,1% der Patienten ohne klinischen Anhalt auf eine Lymphknotenmetastasierung dennoch eine Neck Dissection durchgeführt. Ein Grund dafür ist der hohe Anteil an okkulten Metastasen, die bei Speicheldrüsenkarzinomen mit 12-45% angegeben werden. Im Fall von G3-Malignomen erhöht sich das Risiko einer okkulten Lymphknotenmetastasierung auf bis zu 50% [Ettl et al., 2013].

Posttherapeutisch konnte im eigenen Kollektiv in 72,8% der Fälle ein R0-Status erreicht werden. Ein Residualtumor wurde in 16,5% der Fälle mikroskopisch (R1) und in 5,4% makroskopisch (R2) diagnostiziert. Dabei wurde auch ein Patient mit initialer Fernmetastasierung als R2 gewertet. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch THERKILDSSEN ET AL. mit 47,6% (R0), 29,7% (R1) und 11,8% (R2) [Therkildsen et al., 1998]. Deutliche Unterschiede zeigt dagegen die Studie von McHUGH ET AL., da hier mit 46,9% der Anteil von R2-Situationen enorm hoch ist. Tumorfreie Resektionsränder waren nur in 28% der Fälle gegeben [McHugh et al., 2012].

### **5.2.1.7 Rezidive**

Im eigenen Kollektiv wurde bei 26,1% der Patienten ein Tumorrezidiv diagnostiziert. Hier war besonders das adenoid-zystische Karzinom auffällig, da hier mit 38,5% die Rezidivrate am größten war. Vergleichbare Werte belegen auch die Studien von PACHECO-OJEDA ET AL. und OLIVEIRA ET AL., mit Rezidivraten von 43% und 22,2%. Zudem konnte auch in diesen beiden Kollektiven die hohe Rezidivneigung des adenoid-zystischen Karzinoms festgestellt werden. Bei OLIVEIRA ET AL. erkrankten 42,8% der Patienten mit einem adenoid-zystischen Karzinom an einem Rezidiv, bei PACHECO-OJEDA ET AL. sogar 63,2% [Oliveira et al., 2011, Pacheco-Ojeda et al., 2000]. Eine wesentlich geringere Rezidivrate von 16,3% zeigte die im eigenen Patientenkollektiv zweithäufigste Entität, das Mukoepidermoidkarzinom. Korrespondierend zu den eigenen Ergebnissen beschrieben auch die Studien von McHUGH ET AL. und PACHECO-OJEDA ET AL. diagnostizierte Rezidive bei 19,4% bzw. 13,3% der Patienten mit Mukoepidermoidkarzinomen [McHugh et al., 2012 und Pacheco-Ojeda et al., 2000].

## **5.2.2 Deskriptive Analyse – FISH-Ergebnisse**

### **5.2.2.1 MDM4**

MDM2 sowie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte artverwandte MDM4 spielen über eine Inhibition des Tumorsuppressors p53 eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese. Aus Aberrationen von MDM4 kann eine Überexpressionen von MDM4 resultieren [Duhamel et al., 2012, Wade et al., 2013], was in diversen humanen Tumoren nachgewiesen werden

konnte [Xiong, 2013]. Auch LI ET AL. beschrieben, dass im Gegensatz zu physiologischen Zellen bei Tumorzellen häufig eine erhöhte MDM4-Expression vorliegt [Li et al., 2012].

Da sich Analysen des MDM4-Status bis dato nicht auf Speicheldrüsenmalignome fokussierten, müssen im Folgenden Analogien zu anderen Tumorentitäten geknüpft werden.

So wurden von VALENTIN-VEGA ET AL. bei einigen Glioblastomen und Mammakarzinomen auch MDM4-Genamplifikationen festgestellt [Valentin-Vega et al., 2007]. Die Studie von LIU ET AL. bestätigte ebenso Amplifikationen von MDM4 bei Mammakarzinomen [Liu et al., 2012]. Ergänzend konnte im Fall von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich bei der Hälfte der Patienten eine erhöhte MDM4-Genexpression nachgewiesen werden [Valentin-Vega et al., 2007]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde bei 46,4% der Patienten mit diagnostiziertem Plattenepithelkarzinom der Glandulae salivariae eine genetische Veränderung von MDM4 nachgewiesen. Zusätzlich bestanden laut YU ET AL. Auswirkungen von MDM4-Polymorphismen auf durch HPV16 induzierte Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, da die Onkogene MDM4 und HPV16 E6 einen synergistischen Effekt auf die Entwicklung dieses Tumors haben [Yu et al., 2012]. DUHAMEL ET AL. beschrieben in ihrer Studie zu Osteosarkomen genetische Aberrationen von MDM4. Bei 71 % aller Patienten mit zentralen und 33% mit peripheren Osteosarkomen wurden Genveränderungen diagnostiziert [Duhamel et al., 2012].

In der Studie von GEMBARSKA ET AL. wurden Zusammenhänge zwischen MDM4 und kutanen Melanomen untersucht. Auch hier konnte bei der Mehrheit der Patienten (65%) eine Überexpression von MDM4 nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen höheren Tumorstadien (III und IV) mit einer verstärkten Expression von MDM4 belegt [Gembarska et al., 2012]. Auch im eigenen Kollektiv zeigten sich signifikante Zusammenhänge hinsichtlich des Stadiums. 44% der Patienten im Stadium III und IV wiesen Aberrationen auf, dagegen waren im Stadium I und II nur 25,5% betroffen.

Insgesamt zeigten sich bei 35,9% aller Fälle Aberrationen von MDM4. Auffällig war besonders das duktales Adenokarzinom, bei dem 68% der Tumoren eine Aberration von MDM4 aufwiesen. Dies unterstreicht die molekularbiologisch besondere Stellung dieser Tumoren, welche eine ganze Reihe genetischer Veränderungen, z.B. HER2, EGFR, c-MET oder PTEN, aufweisen [Ach et al., 2013, Ettl et al., 2012b, Ettl et al., 2012c]

### **5.2.2.2 FGFR3**

Auch das zweite untersuchte Gen, FGFR3, zeigt onkogene Eigenschaften. Durch eine Mutation oder erhöhte Expression des Gens kommt es zur Fehlregulierung im Zellzyklus im Sinne einer Autophosphorylierung und somit Initiation der Tyrosinkinaseaktivität. Über RAS/MAPK- und den PI3K/AKT-Reaktionsweg kommt es letztendlich zu einer Beeinflussung der Zellproliferation. So konnten in Blasen- und Zervixkarzinomen vermehrt Genmutationen von FGFR3 nachgewiesen werden [Lafitte et al., 2013, Motahhary et al., 2012]. Als weitere Malignome in Verbindung mit Aberrationen und Überexpression von FGFR3 werden in der Literatur multiple Myelome, Mammakarzinome und orale Plattenepithelkarzinome genannt [Korc et al., 2009, Salazar et al., 2014, Kelleher et al., 2013]. KELLEHER ET AL. beschrieben Amplifikationen von FGFR3 bei 15-30% der Mammakarzinome [Kelleher et al., 2013]. Es gibt bezüglich des FGFR3-Status nur eine sich auf Speicheldrüsenmalignome beziehende Untersuchung von VÉKONY ET AL., weswegen wiederum Korrelationen zu anderen Tumoren beschrieben werden [Vékony et al., 2007].

Das duktales Adenokarzinom der Speicheldrüsen ähnelt histologisch dem Mammakarzinom und zeigte in der vorliegenden Arbeit mit 60,9% ebenfalls eine hohe Rate an Genveränderungen, insbesondere einer erhöhten Genexpression als Folge einer chromosomalen Polysomie. VAIRAKTARIS ET AL. beobachteten in den Initialstadien von



oralen Plattenepithelkarzinomen (dysplastische Veränderung und Frühinvasion) eine Überexpression von FGFR3. Bei fortgeschrittenen Stadien sank die Expression allerdings wieder [Vairaktaris et al., 2006]. Auch laut HENSON ET AL. spielt FGFR3 eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen des oralen Plattenepithelkarzinoms [Henson et al., 2010]. Im vorliegenden Kollektiv konnte bei 75% der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom eine genetische Aberration von FGFR3 nachgewiesen werden. In der Studie von MOTAHHARY ET AL. wurden bei 62% der Fälle mit oralem Plattenepithelkarzinom Mutationen von FGFR3 festgestellt, womit sich die hohe Anzahl an genetischen Veränderungen bestätigen lässt [Motahhary et al., 2012]. VÉKONY ET AL., beschäftigten sich mit Speicheldrüsentumoren und konnten bei adenoid-zystischen Karzinomen der Speicheldrüsen genetische Veränderungen von FGFR3 nachweisen. Vor allem bei aggressiveren Formen der adenoid-zystischer Karzinome zeigte sich eine vermehrte Expression von FGFR3 [Vékony et al., 2007]. Das adenoid-zystische Karzinom war auch im eigenen Kollektiv die einzige Entität, die eine Amplifikation von FGFR3 aufwies.

### **5.2.2.3 MDM4 und FGFR3**

Es gibt keine Studien, die die Zusammenhänge zwischen MDM4 und FGFR3 belegen. In der Arbeit von NAUMOV ET AL. konnte allerdings eine Assoziation zwischen dem MDM4-ähnlichen MDM2 und FGFR3 bei Knochentumoren bestätigt werden. Beide Gene sind in der Lage, miteinander zu reagieren und dadurch die Tumorentwicklung zu beeinflussen [Naumov et al., 2012]. Im eigenen Kollektiv zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelationen zwischen FGFR3 und MDM4 ( $p < 0,001$ ). So traten in 76,9% der Fälle eine Aberration von MDM4 und zugleich eine Aberration von FGFR3 auf. Ob es sich bei bestehender Verwandtschaft von MDM2 und MDM4 um einen kausalen Zusammenhang handelt oder

lediglich um eine Koinzidenz genetisch instabiler Tumoren, insbesondere des duktales Adenokarzinoms, kann mit der vorliegenden Untersuchung nicht bestimmt werden. Hierzu wären weitere funktionelle Untersuchungen notwendig.

### **5.2.3 Überlebensrate und Prognose – Klinisch-pathologische Parameter**

#### **5.2.3.1 Tumorentitäten**

In verschiedenen Studien wird die durchschnittliche 5-Jahres tumorspezifische Überlebensrate bei Karzinomen der Speicheldrüsen mit 56-88 % angegeben [Wang et al. 2012, Oliveira et al., 2011, Luukkaa et al., 2005]. Die 10-J-TSÜ liegt bei 68-74,7 % [Pacheco-Ojeda et al., 2000 und Oliveira et al., 2011]. Im eigenen Kollektiv lagen die Werte mit 74,8% (5-J-TSÜ) und 68,9% (10-J-TSÜ) im gleichen Bereich. Aufgrund der Vielfalt an Entitäten und den damit verbundenen unterschiedlichen Malignitätsverhalten kommt es bei Angaben zur Prognose naturgemäß zu Abweichungen. In der Studie von SATKO ET AL. wird für Azinuszellkarzinome und low-grade (G1) Mukoepidermoidkarzinome eine 5-J-TSÜ von 90% angegeben [Satko et al., 2000]. Auch LUUKKAA ET AL. beschrieben bei low-grade Mukoepidermoidkarzinomen eine 5-J-TSÜ von 70% [Luukkaa et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls für das Azinuszellkarzinom die beste Prognose mit 97,7% (5-J-TSÜ), gefolgt vom hoch differenzierten (G1) Mukoepidermoidkarzinom mit 96,3%. Die schlechtesten Prognosen hatten in der Arbeit von SATKO ET AL. Patienten mit diagnostizierten Plattenepithelkarzinomen, Karzinomen aus pleomorphen Adenomen und undifferenzierte Karzinomen. Die Überlebensrate lag hier für 5 Jahre bei nur 5%, wobei kein Patient 10 Jahre überlebte [Satko et al., 2000]. Im eigenen untersuchten Kollektiv konnte für das Plattenepithelkarzinom eine deutlich bessere Prognose ausgesprochen werden. Hier lag

sowohl die 5-Jahres, als auch die 10-Jahres tumorspezifische Überlebensrate bei 71%. Die schlechteste Prognose zeigte im eigenen Patientenstamm das duktale Adenokarzinom. Zwar war mit 68,6% die 5-Jahres-Überlebensrate noch relativ hoch, allerdings überlebte keiner der Patienten länger als 10 Jahre. Das Adenokarzinom NOS hatte tendenziell eine ungünstigere Prognose hinsichtlich des 5-Jahres-Überlebens (62,2%), welche auch nach 10 Jahren mit 62,2% unverändert blieb.

### **5.2.3.2 Alter und Geschlecht**

Zusammenhänge hinsichtlich der Überlebensrate von Alter und Geschlecht sind in der Literatur nicht eindeutig geklärt. LUUKKAA ET AL. zählen sowohl das Lebensalter als auch das Geschlecht zu den unabhängigen Prognosefaktoren [Luukkaa et al., 2005]. Demgegenüber stehen die Studien von THERKILDSEN ET AL. und OLIVEIRA ET AL., in denen Alter und Geschlecht keine signifikanten Einflüsse auf die Prognose haben [Therkildsen et al., 1998, Oliveira et al., 2011]. Auch BAI ET AL. kamen zu dem Ergebnis, dass keine Assoziationen zwischen Prognose, Alter (>50 Jahre) und Geschlecht vorliegen [Bai et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine statistische Signifikanz bezüglich des Alters. Patienten unter 70 Jahren hatten eine deutlich bessere Prognose (86,6% 5-J-TSÜ) als jene über 70 Jahre (63,9% 5-J-TSÜ). Als Hauptgrund ist hier sicherlich anzuführen, dass die hochmalignen Tumoren, allen voran das Speicheldrüsenkarzinom, im hohen Lebensalter auftreten und somit die schlechtere Prognose bedingen. Das Geschlecht hatte auch in dieser Studie keine prognostische Aussagekraft.

### **5.2.3.3 Lokalisation**

Auch bezüglich der Tumorlokalisation gibt es kontroverse Angaben in der Literatur. Mit einer 5-J-TSÜ von 91,5% konnte im eigenen Patientenkollektiv die beste Prognose für Karzinome der kleinen Speicheldrüsen ausgesprochen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Studie von THERKILDTSEN ET AL. mit einer 5-Jahres tumorspezifischen Überlebensrate von 94% bei Malignomen der kleinen Speicheldrüsen, insbesondere des Gaumens [Therkildsen et al., 1998]. In den Arbeiten von LUUKKAA ET AL. und PACHECO-OJEDA ET AL. zeigten mit 70% bzw. 77% (5-J-TSÜ) Tumoren der Gl. parotidea die beste Prognose [Luukkaa et al., 2005, Pacheco-Ojeda et al., 2000]. Bei OLIVEIRA ET AL. ergab sich für einen Befall der Gl. parotidea mit einer 5-J-TSÜ von 71,7% die schlechteste Prognose. Allerdings stellte die Lokalisation hier keinen statistisch signifikanten Faktor dar [Oliveira et al., 2011]. Auch laut BAI ET AL. besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Prognose und Tumorlokalisation [Bai et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine prognostisch relevante Aussagekraft bezüglich der Lokalisation ausgeschlossen werden.

### **5.2.3.4 TNM-Klassifikation**

In der vorliegenden Arbeit konnte die beste Prognose für Karzinome der Größe T1 und T2 ermittelt werden (88,3% für 5 Jahre und 86,7% für 10 Jahre). Patienten, bei denen ein T3- bzw. ein T4-Tumor diagnostiziert wurde, hatten mit 63,4% (5-J-TSÜ) und 61,1% (10-J-TSÜ) deutlich schlechtere Überlebensraten. THERKILDTSEN ET AL. beschrieben in ihrer Studie ähnlich Ergebnisse. Die 5-J-TSÜ lag hier bei T1- und T2-Tumoren bei 87% bzw. 80% und bei T3- und T4-Tumoren bei 68% bzw. 58% [Therkildsen et al., 1998]. Auch OLIVEIRA ET

AL. stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der Ausdehnung des Malignoms fest. Die schlechteste Prognose wurde auch hier für Tumoren der Größe T3/T4 ausgesprochen [Oliveira et al., 2011].

Hinsichtlich des Nodalstatus konnte im eigenen Kollektiv für Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine tumorspezifische Überlebensrate von 57,4% (5 Jahre) ermittelt werden. Lag eine N0-Situation vor, so lag die 5-J-TSÜ bei 87,4%. In der Arbeit von OKABE ET AL. konnten diese Werte bestätigt werden. Patienten mit einem positiven Nodalbefund hatten im Schnitt eine 5-J-TSÜ von 54%. War kein Anhalt auf Lymphknotenmetastasen gegeben, so verbesserte sich die Prognose auf 88% [Okabe et al., 2001]. Auch BAI ET AL. beschrieben signifikante Korrelationen zwischen diagnostizierten Lymphknotenmetastasen und der Überlebensrate [Bai et al., 2013].

Patienten mit Fernmetastasen hatten laut BHAYANI ET AL. und McHUGH ET AL. eine signifikant deutlich schlechtere Prognose [Bhayani et al., 2012, McHugh et al., 2012]. Dieses Ergebnis konnte auch in der eigenen Untersuchung bestätigt werden.

Als einer der wichtigsten Prognosefaktoren wird in vielen Studien das Tumorstadium genannt. Die 5-J-TSÜ für die Stadien I und II liegt zwischen 83-100 % [Wang et al., 2012, Therkildsen et al., 1998]. Im untersuchten Kollektiv zeigte sich für diese Tumorstadien eine 5-Jahres-Prognose von 93%. Lag jedoch schon ein fortgeschrittenes Stadium (III+IV) vor, so sank die Überlebensrate auf 65,9%. PACHECO-OJEDA ET AL. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Für Stadium I und II konnte eine 5-J-TSÜ von 86%, für Stadium III und IV von 61% eruiert werden [Pacheco-Ojeda et al., 2000]. Eine signifikante Assoziation zwischen der Prognose und dem Tumorstadium konnte sowohl in der eigenen Arbeit und in den oben genannten Studien als auch in denen von LUUKKAA ET AL. und OLIVEIRA ET AL. validiert werden [Luukkaa et al., 2005, Oliveira et al., 2011].

### **5.2.3.5 Grading**

Im untersuchten Patientenkollektiv war mit 91,4% und 88,5% für G1- und G2-Malignome die 5-J-TSÜ als sehr gut einzuschätzen. Handelte es sich allerdings um schlecht differenzierte Tumoren (G3), sank die Überlebensrate rapide auf 48,5% ab. Analog dazu beschreibt auch SEETHALA für G1/G2-Neoplasien eine 5-Jahres-Prognose von 85-90%. Bei hoch-malignen Speicheldrüsentumoren (G3) wird eine Überlebensrate von ca. 40% angegeben [Seethala, 2009]. In der Studie von THERKILDSEN ET AL. lag die 5-J-TSÜ für G3-Malignome mit 53% etwas höher [Therkildsen et al., 1998]. Auch NAGAO und McHUGH ET AL. belegten in ihrer Arbeit, dass gering differenzierte Speicheldrüsenkarzinome (G3) eine wesentlich schlechtere Prognose aufweisen als solche, die gut (G1) oder mäßig (G2) differenziert waren [Nagao, 2013, McHugh et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenso wie bei McHUGH ET AL. der Malignitätsgrad als signifikanter Prognosefaktor validiert werden [McHugh et al., 2012]. Dagegen hatte das Grading bei OLIVEIRA ET AL. keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose [Oliveira et al., 2011].

### **5.2.3.6 Therapie**

Wurden Patienten im Vergleich zur Kombination aus Chirurgie und Radiatio ausschließlich chirurgisch therapiert, so zeigte sich sowohl in der eigenen Arbeit als auch in den Studien von PACHECO-OJEDA ET AL. und THERKILDSEN ET AL. tendenziell eine bessere 5-Jahres-Prognose [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Therkildsen et al., 1998]. Nur bei LUUKKAA ET AL. divergierte die Prognose zwischen rein chirurgischer (70%) und kombinierter chirurgischer und Strahlentherapie (48%) deutlich [Luukkaa et al., 2005]. Diese Verteilung ist selbstverständlich der Tatsache geschuldet, dass lediglich Tumoren in fortgeschrittenen

Stadien mit ohnehin deutlich schlechterer Prognose mittels Chemo- oder Strahlentherapie adjuvant behandelt werden.

Hinsichtlich der Resektionsränder konnte bei Tumorfreiheit (R0) ein tumorspezifisches Überleben von 86,3% (5 Jahre) und 84,3% (10 Jahre) ermittelt werden. Die 5-J-TSÜ bei R0-Status lag bei PACHECO-OJEDA ET AL. bei 81% und bei THERKILDSSEN ET AL. sogar bei 93% [Pacheco-Ojeda et al., 2000, Therkildsen et al., 1998]. Konnte ein mikroskopischer (R1) oder makroskopischer (R2) Residualtumor nachgewiesen werden, sank die 5-Jahres-Prognose auf 73,3 bzw. 54% ab [McHugh et al., 2012, Pacheco-Ojeda et al., 2000]. Im eigenen Kollektiv lag die 5-J-TSÜ bei makroskopisch nachweisbaren Residualtumor nur bei 15%. Eine signifikante Relevanz wurde nicht nur in der vorliegenden Arbeit eruiert, sondern auch durch THERKILDSSEN ET AL. und PACHECO-OJEDA ET AL. beschrieben [Therkildsen et al., 1998, Pacheco-Ojeda et al., 2000].

#### **5.2.3.7 Rezidive**

Eine erhöhte Rezidivneigung bei Speicheldrüsenmalignomen ist durch Risikofaktoren wie geringer Differenzierungsgrad, positive Resektionsränder, adenoid-zystisches Karzinom oder Vorliegen von Lymphknotenmetastasen charakterisiert und dementsprechend mit einer schlechteren Prognose assoziiert [Nagao, 2013, Teo et al., 2000]. GILLESPIE ET AL. gibt die 5-J-TSÜ im Fall eines Rezidivs mit etwa 35% an [Gillespie et al., 2012]. Im untersuchten Kollektiv konnte bei diagnostiziertem Rezidiv eine 5-Jahres-Prognose von 51,9% eruiert werden.

## 5.2.4 Überlebensrate und Prognose – FISH-Ergebnisse

### 5.2.4.1 MDM4

Eine abschließende Bewertung zum Einfluss von MDM2- und MDM4-Aberrationen auf das Gesamtüberleben ist in der Literatur noch nicht eindeutig getroffen [Abdel-Fatah et al., 2010]. MDM2 zeigte sich in den Studien von RAJABI ET AL. und SEPIDEH ET AL. als signifikanter Faktor für schlechtere Prognosen bei malignen Melanomen, Magen- und Kolorektalkarzinomen [Rajabi et al., 2012 und Sepideh et al., 2012]. Hingegen beschrieben ABDEL-FATAH ET AL. in ihren Untersuchungen bezüglich MDM2 sowohl eine positive als auch eine negative Beeinflussung der Prognose jeweils in Abhängigkeit der Expression anderer Gene. Beispielsweise ging eine vermehrte Expression von MDM2 und MDM4 in Kombination mit einer Inhibition des Tumorsuppressorgens p53 mit einer schlechteren Überlebensrate einher [Abdel-Fatah et al., 2010].

XIONG ET AL. konnten an Experimenten mit Mäusen nachweisen, dass im Fall einer Überexpression von MDM4 die Überlebensrate der Tiere signifikant geringer war [Xiong et al., 2010]. Zusätzlich wurde in der Studie von LI ET AL. eine Assoziation zwischen der vermehrten Expression von MDM4 und einer schlechteren Überlebensrate bei verschiedenen Malignomen bestätigt [Li et al., 2013]. Bei Weichgewebs- und Osteosarkomen konnte eine signifikante Korrelation zwischen vorhandenen Amplifikationen und einer ungünstigeren Prognose festgestellt werden. Zudem scheinen ein geringer Differenzierungsgrad und eine erhöhte Metastasierungsneigung bei Tumoren ebenso in Zusammenhang mit MDM4-Aberrationen zu stehen [Lenos et al., 2012].

Im untersuchten Patientenkollektiv war bezogen auf MDM4 die Prognose bei Vorliegen von Aberrationen signifikant schlechter. Der ungünstigste Einfluss auf das Gesamtüberleben lies sich bei Amplifikationen eruieren. So sank die 5-J-TSÜ von 82% bei disomen Genstatus auf



52,6% bei Amplifikationen deutlich ab. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Arbeit von ARAI ET AL. bei der Untersuchung von Hepatoblastomen beschrieben. Patienten ohne Genveränderungen zeigten bessere Überlebensraten als diejenigen mit Aberrationen [Arai et al., 2010].

#### **5.2.4.2 FGFR3**

Auch der Genstatus von FGFR3 zeigte in der vorliegenden Untersuchung einen Einfluss auf die Prognose. Patienten mit einer Disomie von FGFR3 hatten mit 87,2% 5-J-TSÜ die beste Prognose im untersuchten Kollektiv. Konnten hohe Polysomien nachgewiesen werden, verschlechterte sich die Überlebensrate auf 69,1%.

In der Literatur ist die prognostische Bedeutung der FGF-Rezeptoren nicht immer einheitlich. Häufig findet man Aberrationen von FGFR3 im Zusammenhang mit Blasenkarzinomen. In den Studien von LYLE ET AL. und BALBAS-MARTINEZ ET AL. wurden vor allem Mutationen in gut differenzierten Urothelkarzinomen als prognostisch günstig bewertet [Lyle et al., 2012, Balbas-Martinez et al., 2013]. Diese Aussage wurde von LAFITTE ET AL. bestätigt, der FGFR3 eine Tumorsuppressorfunktion in Zellen mit epithelialen Phänotyp zuschreibt. Zudem konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer Deletion von FGFR3 und einer geringen Differenzierung bei Blasen- und Kolorektalkarzinomen hergestellt werden [Lafitte et al., 2013].

Neben der Expression von FGF-Rezeptoren, scheint auch der FGFR-Ligand FGF (fibroblast growth factor) von prognostischer Wichtigkeit bei Pankreaskarzinomen zu sein. KELLEHER ET AL. beschreiben in ihrer Arbeit eine signifikante Verschlechterung der Prognose beim Vorliegen einer Überexpression von FGF [Kelleher et al., 2013].

JAIN ET AL. untersuchten weitere Gene aus der FGFR-Familie. Amplifikationen von FGFR2 waren mit einer schlechteren Prognose bei Magenkarzinomen assoziiert. Analog dazu gab es Korrelationen zwischen FGFR1-Amplifikationen und einer geringeren Überlebensrate bei Mammakarzinomen [Jain et al., 2012]. HOPKINS ET AL. verglichen mehrere Studien und fanden schlechtere Prognosen für Malignome der Lunge, Brust und Prostata sowie für schlecht differenzierte Weichgewebssarkome bei Aberrationen von FGFR4 [Hopkins et al., 2008]. Insgesamt scheint eine verstärkte Expression von FGF-Rezeptoren doch mit einer Entdifferenzierung, einer Progression des Tumorwachstums und somit auch mit einer Verschlechterung der Prognose einherzugehen.

### **5.2.5 Multivariate Überlebensrate**

In der Literatur konnte oftmals das Tumorstadium als wichtigster eigenständiger Prognosefaktor ermittelt werden [Oliveira et al., 2011, Luukkaa et al. 2005, Pacheco-Ojeda et al. 2000, Therkildsen et al., 1998]. Ein weiterer unabhängiger Faktor von prognostischer Bedeutung ist laut LUUKKAA ET AL. und PACHECO-OJEDA ET AL. das Alter der Patienten [Luukkaa et al., 2005, Pacheco-Ojeda et al., 2000]. Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich das Alter in der multivariaten Analyse als signifikant. Die ungünstigste Prognose konnte im eigenen Kollektiv dem hohen Malignitätsgrad zugeordnet werden. Ferner stellte sich auch in den Studien von McHUGH ET AL., PACHECO-OJEDA ET AL. und THERKILDSEN ET AL. das Grading als unabhängiger, signifikanter Prognosefaktor heraus [McHugh et al., 2012, Pacheco-Ojeda et al., 2000, Therkildsen et al., 1998]. Im untersuchten Patientenkollektiv war, wie auch bei McHUGH ET AL. und THERKILDSEN ET AL., ein positiver Nodalstatus bezüglich der Überlebensrate als signifikanter Faktor einzustufen [McHugh et al., 2012, Therkildsen et al., 1998].

Der Genstatus von MDM4 zeigte sowohl in dieser Arbeit als auch bei FANG ET AL. keine prognostische Wertigkeit [Fang et al., 2010].

Im Fall von FGFR3 sind in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse zu finden. Bei Patienten mit Blasenkarzinomen beschrieben van RHIJN ET AL. FGFR3 als unabhängigen Faktor in der multivariaten Überlebensanalyse [van Rhijn et al., 2012]. Dagegen stehen die Erkenntnisse von SUNG ET AL. und HERNÁNDEZ ET AL., die keine signifikanten Korrelationen hinsichtlich des Genstatus von FGFR3 feststellen konnten [Sung et al., 2014, Hernández et al., 2005]. Auch im eigenen Kollektiv konnte FGFR3 als eigenständiger Prognosefaktor nicht bestätigt werden.

### **5.3 Ausblick**

Aus der vorliegenden Studie wird eindeutig ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von MDM4- bzw. FGFR3-Aberrationen und einem aggressiveren Tumorwachstum mit vermehrtem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, geringerem Differenzierungsgrad und fortgeschrittenem Tumorstadium evident. Dies hat nicht nur prognostische Bedeutung, sondern könnte zukünftig auch von therapeutischem Nutzen sein.

In diesem Zusammenhang wurden beispielsweise Antikörper (small molecule inhibitors) gegen MDM4 und auch gegen MDM2 entwickelt, welche unter anderem eine Aktivierung der p53-gesteuerten Apoptose fördern. Die Korrelation zwischen einer Überexpression von MDM4 und erhöhten MDM2-Spiegeln [Valentin-Vega et al., 2007] macht dabei eine gekoppelte Inhibition von MDM4 und MDM2 klinisch relevant. So kann eine kombinierte Inaktivierung von MDM4 und MDM2 mittels eines, beide Proteine erfassenden Peptids (SAH-p53-8, RO-5963) trotz einer erhöhten MDM4-Expression eine apoptotische Aktivität erzeugen [Graves et al., 2012]. Obwohl erste Phase-I-Studien insbesondere beim

Retinoblastom und malignen Melanom vielversprechende Ergebnisse liefern, sind im Langzeitverlauf mögliche toxische Effekte auf physiologisches Gewebe bisher unklar [Li et al., 2013].

Auch FGFR kann einen denkbaren Ansatzpunkt bezogen auf eine adjuvante systemische Tumorthherapie darstellen, da eine hohe Genexpression von FGFR eine Resistenz gegenüber endokrinen Therapiestrategien begründen können [McLeskey et al., 1993, Zhang et al., 1997, Zhang et al., 2005]. TOMLINSON ET AL. ermittelten eine erhöhte FGFR3-Expression in Tamoxifen-resistenten Mammakarzinomen auf Basis der PI3K-AKT-Reaktionskaskade bzw. einer PLC $\gamma$ -Aktivierung [Tomlinson et al., 2012]. Darüberhinaus scheint FGFR3 auch die Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer Strahlentherapie bei oralen Plattenepithelkarzinomen zu begünstigen [Ishigami et al., 2007]. Im Gegensatz dazu kann die Inkubation von humanen Tumorzellen mit FGFR-Inhibitoren den antiproliferativen Effekt von konventionellen Chemotherapeutika (5-Fluorouracil, Paclitaxel, Etoposid) verstärken [Qiu et al., 2011, Yashiro et al., 2010]. Vor diesem Hintergrund kann die Ergänzung einer medikamentösen Tumorthherapie um Tyrosinkinaseinhibitoren das Gesamtüberleben der Patienten positiv beeinflussen. In diesem Zusammenhang stehen Inhibitoren gegen die Tyrosinkinase FGFR3, aber auch gegen die Tyrosinkinasen FGFR1, FGFR2 und FGFR4 derzeit im Fokus. Das Medikament Dovitinib (TKI258), ein Inhibitor von FGFR1-3, VEGFR und PDGFR, fand kürzlich Anwendung in Phase I und Phase II Studien zu HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinomen sowie beim fortgeschrittenen, metastasierten Nierenzellkarzinom [André et al., 2013, Angevin et al., 2013]. Dabei reagierten in beiden Untersuchungen diejenigen Tumoren auf das Medikament, die eine Amplifikation von FGF-Rezeptoren aufwiesen. So könnte auch bei fortgeschrittenen Speicheldrüsenkarzinomen, welche einer herkömmlichen Therapie nicht mehr zugänglich sind, eine zielgerichtete Antikörpertherapie z. B. gegen MDM2/MDM4 oder FGFR1-4 einen therapeutischen Ansatz darstellen.

## 6. Zusammenfassung

Die Intention dieser Arbeit bestand darin, den Status der Gene MDM4 und FGFR3 bei Karzinomen der großen und kleinen Speicheldrüsen darzustellen und mögliche Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern zu eruieren.

Retrospektiv wurden Daten von 324 Patienten mit primären Speicheldrüsenkarzinomen ausgewertet. Die Einteilung der Entitäten entsprach den aktuellen Vorgaben der WHO sowie der TNM-Klassifikation der UICC. Der Genstatus von MDM4 und FGFR3 wurde mit Hilfe von Tissue Microarrays (TMA's) und Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) ermittelt.

Die erhobenen Daten wurden statistisch sowohl uni- als auch multivariat analysiert. Daraus ergaben sich signifikante Korrelationen verschiedener Faktoren. Tumorentität ( $p=0,001$ ), Alter ( $p<0,001$ ), T-Status ( $p<0,001$ ), N-Status ( $p<0,001$ ), M-Status ( $p<0,001$ ), Tumorstadium ( $p<0,001$ ), Grading ( $p<0,001$ ), Therapieform ( $p<0,001$ ), Residualtumor ( $p<0,001$ ) und Rezidiv ( $p<0,001$ ) zeigten Signifikanzen bezüglich der Prognose. In der multivariaten Überlebensrate waren folgende Faktoren signifikant: Alter ( $p=0,049$ ), Grading ( $p=0,005$ ), N-Status ( $p=0,003$ ) sowie der R-Status ( $p=0,019$ ).

Sowohl MDM4 als auch FGFR3 waren signifikant mit dem Malignitätsgrad assoziiert (jeweils  $p<0,001$ ). Auch wiesen beide Gene Signifikanzen bezüglich des tumorspezifischen Überlebens auf (MDM4:  $p=0,025$ ; FGFR3:  $p=0,008$ ). Beim Vergleich von MDM4 mit FGFR3 zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge ( $p<0,001$ ). In der multivariaten Überlebensanalyse konnten allerdings keine Signifikanzen von MDM4 und FGFR3 nachgewiesen werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass Aberrationen der untersuchten Gene vor allem bei schlecht differenzierten und damit aggressiven Malignomen der Speicheldrüsen auftreten und hier einen wichtigen Prognosefaktor darstellen. In diesem Kontext wird derzeit an Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung von MDM4 und FGFR3 geforscht, um

beispielsweise über eine Antikörper-induzierte Inhibition von MDM4 und FGFR3 das Tumorwachstum zu bremsen und das Überleben zu verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

Abdel-Fatah TM, Powe DG, Agboola J, Adamowicz-Brice M, Blamey RW, Lopez-Garcia MA, Green AR, Reis-Filho JS, Ellis IO (2010) The biological, clinical and prognostic implications of p53 transcriptional pathways in breast cancers. *J Pathol* 220: 419-434

Abrahão-Machado LF, Jácome AA, Wohnrath DR, dos Santos JS, Carneseca EC, Fregnani JH, Scapulatempo-Neto C (2013) HER2 in gastric cancer: comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and tissue microarrays. *World J Gastroenterol* 19: 6438-6446

Ach T, Zeitler K, Schwarz-Furlan S, Baader K, Agaimy A, Rohrmeier C, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Brockhoff G, Ettl T (2013) 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

Akrish S, Ben-Izhak O, Peled M (2012) P27/SKP-2 histochemical profile is relevant to malignant salivary gland tumors (MST) histogenesis and tumor grade. *Head Neck Pathol* 6: 157-165

André F, Bachelot T, Campone M, Dalenc F, Perez-Garcia JM, Hurvitz SA, Turner N, Rugo H, Smith JW, Deudon S, Shi M, Zhang Y, Kay A, Porta DG, Yovine A, Baselga J (2013) Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. *Clin Cancer Res* 19: 3693-3702

Angevin E, Lopez-Martin JA, Lin CC, Gschwend JE, Harzstark A, Castellano D, Soria JC, Sen P, Chang J, Shi M, Kay A, Escudier B (2013) Phase I study of dovitinib (TKI258), an oral FGFR, VEGFR, and PDGFR inhibitor, in advanced or metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 19: 1257-1268

Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y (2010) Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 596-609

Baader K (2013) Genstatus von PTEN und C-MET in Speicheldrüsenkarzinomen. Dissertation, Universität Regensburg

Baghi M, Bloching MB, Hosemann W, Iro H, Jungenhülsing M, Knecht R, Kochs E, Leuwer R, Lippert BM, Mattheis S, Mir-Salim P, Müller A, Ranft A, Reiß G, Reiß M, Remmert S, Siegert R, Tasman AJ, Verse T, Waldfahrer F, Weber R, Zenk J (2009) Chirurgische Therapie: In Reiß M (2009) *Facharztwissen HNO-Heilkunde*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg

Bai S, Clubwala R, Adler E, Sarta C, Schiff B, Smith RV, Gnepp DR, Brandwein-Gensler M (2013) Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. *Head Neck Pathol* 7: 105-112

Balbás-Martínez C, Rodríguez-Pinilla M, Casanova A, Domínguez O, Pisano DG, Gómez G, Lloreta J, Lorente JA, Malats N, Real FX (2013) ARID1A alterations are associated with FGFR3-wild type, poor-prognosis, urothelial bladder tumors. *PLoS One* 8: e62483



Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Bhayani MK, Yener M, El-Naggar A, Garden A, Hanna EY, Weber RS, Kupferman ME (2012) Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer* 118: 2872-2878

Boetz F, Howaldt HP (2008) Speicheldrüsentumoren: In Garbe C et al. (Hrsg.) Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Zuckschwerdt-Verlag München/Wien/New York

Breen JT, Carlson ML, Link MJ, Moore EJ, Neff BA, Driscoll CL (2012) Skull base involvement by acinic cell carcinoma of the parotid gland. *J Neurol Surg B Skull Base* 73: 371-378

Carlson J, Licitra L, Locati L, Raben D, Persson F, Stenman G (2013) Salivary Gland Cancer: An Update on Present and Emerging Therapies. *ASCO Educational Book*: 257-263

Chisholm EJ, Elmiyeh B, Dwivedi RC, Fisher C, Thway K, Kerawala C, Clarke PM, Rhys-Evans PH (2011) Anatomic distribution of cervical lymph node spread in parotid carcinoma. *Head Neck* 33: 513-515

Cooper T, Biron V, Adam B, Klimowicz AC, Puttagunta L, Seikaly H (2013) Prognostic utility of basaloid differentiation in oropharyngeal cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg* Dec: 42

de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, Vencio EF (2009) Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol* 3: 271-275

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

Duhamel LA, Ye H, Halai D, Idowu BD, Presneau N, Tirabosco R, Flanagan AM (2012) Frequency of Mouse Double Minute 2 (MDM2) and Mouse Double Minute 4 (MDM4) amplification in parosteal and conventional osteosarcoma subtypes. *Histopath* 60: 357-359

Eckel HE, Jungehuelsing M (2011) Surgical Management: In Bradley PJ, Guntinas-Lichius O (2011) *Salivary Gland Disorders and Diseases: Diagnosis and Management*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York

Ehrenfeld M, Prein J, Jundt G (2011) Tumoren und tumorähnliche Läsionen im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich: In Schwenzler N, Ehrenfeld M (2011) *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York

El-Naggar AK, Huvos AG (2005) Adenoid cystic carcinoma: In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005) *Pathology and genetics of head and neck tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Ellis GL, Auclair PL (2003) *Modern Surgical Pathology*. Vol. 1 Saunders, Philadelphia London New York

Ettl T, Driemel O, Reichert TE (2007) Differentialdiagnose der Wangenschwellung: Metastasiertes Adenokarzinom NOS der kleinen Speicheldrüsen. ZM 97 Nr. 18: 50-54

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

Ettl T, Baader K, Stiegler C, Müller M, Agaimy A, Zenk J, Kühnel T, Gosau M, Zeitler K, Schwarz S, Brockhoff G (2012b) 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, 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

Ettl T, Gosau M, Brockhoff G, Schwarz-Furlan S, Agaimy A, Reichert TE, Rohrmeier C, Zenk J, Iro H (2013) Predictors of cervical lymph node metastasis in salivary gland cancer. Head Neck doi: 10.1002/hed.23332

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 (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Fang S, Krahe R, Lozano G, Han Y, Chen W, Post SM, Zhang B, Wilson CD, Bachinski LL, Strong LC, Amos CI (2010) Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. PLoS One 5: e10813

Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S, Zwolinska A, Haupt S, de Lange J, Yip D, Goydos J, Haigh JJ, Haupt Y, Larue L, Jochemsen A, Shi H, Moriceau G, Lo RS, Ghanem G, Shackleton M, Bernal F, Marine JC (2012) MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18: 1239-1247

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 (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Goode RK, El-Naggar AK (2005) Mucoepidermoid carcinoma: In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Graves B, Thompson T, Xia M (2012) Activation of the p53 pathway by small molecule induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci* 109: 11788-11793

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

Han X, Shi Y, Ma L, Lyu Z, Yang H, Yao J, Li J, Li B, Qin Y (2014) Comparison of immunohistochemistry with fluorescence in situ hybridization in determining the human epidermal growth factor receptor 2 status of breast cancer specimens: a multicenter study of 3149 Chinese patients. *Chin Med J* 127: 246-253

Harrington KJ, Karapanagiotou EM (2011) *Chemotherapy and Novel Therapeutics*: In Bradley PJ, Guntinas-Lichius O (2011) *Salivary Gland Disorders and Diseases: Diagnosis and Management*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York

Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Jaramillo R, Amorós A, Tardón A, García-Closas R, Serra C, Carrato A, Malats N, Real FX (2005) FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 11: 5444-5450.

Henson BJ, Gollin SM (2010) Overexpression of KLF13 and FGFR3 in oral cancer cells. *Cytogenet Genome Res* 128: 192-198

Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C, Wheatley-Price P, Waldron J, Goldstein D, Meyer F, Bairati I, Liu G (2008) Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 490-499

Ishigami T, Uzawa K, Higo M (2007) Genes and molecular pathways related to radioresistance of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 2262-2270

Jain VK, Turner NC (2012) Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 14: 208

Kallianpur A, Yadav R, Shukla N, Deo SVS, Muduly DK (2012) Locally advanced salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Ann Maxillofac Surg* 2: 178-181

Katoh M, Nakagama H (2013) FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med Res Rev* doi:10.1002/med.21288

Kelleher FC, O'Sullivan H, Smyth E, McDermott R, Viterbo A (2013) Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogen* 34: 2198-2205

Khandekar MM, Kavatkar AN, Patankar SA, Bagwan IB, Puranik SC, Deshmukh SD (2006) FNAC of salivary gland lesions with histopathological correlation. *Ind J of Otolaryngol Head Neck Surg* 58: 246-248

Kini Y, Desai C, Mahindra U, Kalburge J (2012) Rare carcinoma ex pleomorphic adenoma of the buccal minor salivary gland causing a therapeutic dilemma. *Contemp Clin Dent* 3: 209-211

Kleinsasser O, Klein HJ, Hübner G (1968) Salivary duct carcinoma. A group of salivary gland tumors analogous to mammary duct carcinoma. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 192: 100-105

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund 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

Korc M, Friesel RE (2009) The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 639-651

Lafitte M, Moranvillier I, Garcia S, Peuchant E, Ionvanna J, Rousseau B, Dubus P, Guyonnet-Dupérat V, Belleannée G, Ramos J, Bedel A, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F, Dabernat S (2013) FGFR3 has tumor suppressor properties in cells with epithelial phenotype. *Molecular Cancer* 12: 83

Lang S, Rotter N, Lorenzen A, Ihrler S, Eckel R, Hölzel D, Rasp G, Wollenberg B, Sommer K (2005a) Speicheldrüsenkarzinome Teil 1: Epidemiologie, Ätiologie, Malignitätskriterien, Prognoseparameter und Klassifikation. *HNO* 9: 817-828

Lang S, Rotter N, Lorenzen A, Ihrler S, Eckel R, Hölzel D, Rasp G, Wollenberg B, Sommer K (2005b) Speicheldrüsenkarzinome Teil 2: Diagnose und Therapie. *HNO* 10: 905-911

Lawal AO, Adisa AO, Kolude B, Adeyemi BF, Olajide MA (2013) A review of 413 salivary gland tumours in the head and neck region. *J Clin Exp Dent* 5: 218-222

Lenos K, Grawenda AM, Lodder K, Kuijjer ML, Teunisse AF, Repapi E, Grochola LF, Bartel F, Hogendoorn PC, Wuerl P, Taubert H, Cleton-Jansen AM, Bond GL, Jochemsen AG (2012) Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. *Cancer Res* 72: 4074-4084

Lewis JE, Olsen KD (2005) Squamous cell carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Lyon

Li LJ, Li Y, Wen YM, Liu H, Zhao HW (2008) Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. *Oral Oncol* 44: 187-192

Li Q, Lozano G (2013) Molecular pathways: targeting MDM2 and MDM4 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 19: 34-41

Li X, Gilkes D, Li B, Cheng Q, Pernazza D, Lawrence H, Lawrence N, Chen J (2012) Abnormal MDMX degradation in tumor cells due to ARF deficiency. *Oncogene* 31: 3721-3732

Liu L, Fan L, Fang C, Zou ZJ, Yang S, Zhang LN, Li JY, Xu W (2012) S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 103: 2056-2063

Liyanage RL, Wadusinghearachchi NS, Siriwardena BS, Jayasooriya PR, Tilakaratne WM (2013) Pigmented mucoepidermoid carcinoma with spindle cell differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* doi: 10.1016/j.oooo.2013.08.031

Lukšić I, Suton P, Macan D, Dinjar K (2013) Intraoral adenoid cystic carcinoma: is the presence of perineural invasion associated with the size of the primary tumour, local extension, surgical margins, distant metastases, and outcome? *Br J Oral Maxillofac Surg* doi: 10.1016/j.bjoms.2013.11.009

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Koivunen P, Laranne J, Mäkitie A, Virtaniemi J, Hinkka S, Grenman R (2005) Salivary gland cancer in Finland 1991 – 96: An evaluation of 237 cases. *Acta Oto-Laryngol* 125: 207-214



Lyle SR, Hsieh CC, Fernandez CA, Shuber AP (2012) Molecular grading of tumors of the upper urothelial tract using FGFR3 mutation status identifies patients with favorable prognosis. *Res Rep Urol* 4: 65-69

Mancini F, Moretti F (2009) Mitochondrial MDM4 (MDMX) An unpredicted role in the p53-mediated intrinsic apoptotic pathway. *Cell Cycle* 8: 3854-3859

Maurer J, Lippert BM (2010) Hals, Schilddrüse und Ösophagus; Chirurgische Therapie: In Strutz J, Mann W (Hrsg.) (2010) *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York

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

McKenna SJ, Amaral T, Akbar S, Jordan L, Thompson A (2013) Immunohistochemical analysis of breast tissue microarray images using contextual classifiers. *J Pathol Inform* doi: 10.4103/2153-3539.109871

McLeskey SW, Kurebayashi J, Honig SF (1993) Fibroblast growth factor 4 transfection of MCF-7 cells produces cell lines that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice. *Cancer Res* 53: 2168-2177

Merkelbach-Bruse S, Wardelmann E, Künstlinger H, Büttner R, Schildhaus HU (2011) Molekulare Methoden in der Sarkomdiagnostik. *Patho* 32: 24-31

Metelmann HR, Kaduk W (2007) Tumoren im Kopf-Hals-Bereich: In Horch HH (Hrsg.) (2007) Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Urban & Fischer München/Jena

Moore EJ, Olsen KD (2007) Total Parotidectomy: In Myers EN, Ferris RL (2007) Salivary Gland Disorders. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg

Motahhary P, Baghaie F, Mamishi S, Pourakbari B, Mahmoudi S, Amini Shakib P (2012) Mutational status of FGFR3 in oral squamous cell carcinoma. JDentistry Teheran U Med Scie 9: 7-13

Müller M, Agaimy A, Zenk J, Ettl T, Iro H, Hartmann A, Seliger B, Schwarz S (2013) The prognostic impact of human leukocyte antigen (HLA) class I antigen abnormalities in salivary gland cancer. A clinicopathological study of 288 cases. Histopathol 62: 847-859

Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, H Takahashi R, Nagai T, Yoshida M, Suzuki F, Obikane H, Yamashina M, Matsubayashi J (2012) Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. Acta Histochem Cytochem 45: 269-282

Nagao T (2013) “Dedifferentiation” and High-Grade Transformation in Salivary Gland Carcinomas. Head Neck Pathol 7: 37-47

Naumov VA, Generozov EV, Solovyov YN, Aliev MD, Kushlinsky NE (2012) Association of FGFR3 and MDM2 gene nucleotide polymorphisms with bone tumors. Bull Exp Biol Med 153: 869-873

Nobis CP, Rohleder NH, Wolff KD, Wagenpfeil S, Scherer EQ, Kesting MR (2013) Head and neck salivary gland carcinomas--elective neck dissection, yes or no? *J Oral Maxillofac Surg* 72: 205-210

Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T (2001) Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol* 14: 1008-1014

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

Pacheco-Ojeda L, Domeisen H, Narvaez M, Tixi R, Vivar N (2000) Malignant salivary gland tumors in Quito, Ecuador. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 62: 296-302

Paiva-Fonseca F, de Almeida OP, Ayroza-Rangel AL, Agustin-Vargas P (2013) Tissue microarray construction for salivary gland tumors study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18: 1-6

Pitak-Arnnop P, Hemprich A, Dhanuthai K, Pausch NC (2012) Response to “Gingival squamous cell carcinoma: A diagnostic impediment”. *J Indian Soc Periodontol* 16: 300-301

Qiu H, Yashiro M, Zhang X (2011) A FGFR2 inhibitor, Ki23057, enhances the chemosensitivity of drug-resistant gastric cancer cells. *Cancer Lett* 307: 47-52

Rajabi P, Karimian P, Heidarpour M (2012) The relationship between MDM2 expression and tumor thickness and invasion in primary cutaneous malignant melanoma. *J Res Med Sci* 17: 452-455

Reichert TE, Gosau M (2012) Grundlagen der Tumorchirurgie: In Hausamen JE, Machtens E, Reuther J, Eufinger H, Kübler A, Schliephake H (2012). *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Operationslehre und –atlas*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg

Rhijn van BW, van der Kwast TH, Liu L, Fleshner NE, Bostrom PJ, Vis AN, Alkhateeb SS, Bangma CH, Jewett MA, Zwarthoff EC, Zlotta AR, Bapat B (2012) The FGFR3 mutation is related to favorable pT1 bladder cancer. *J Urol* 187: 310-314

Rinaldo A, Shaha AR, Pellitteri PK, Bradley PJ, Ferlito A (2004) Management of malignant sublingual salivary gland tumors. *Oral Onc* 40: 2-5

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT (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

Salazar L, Kashiwada T, Krejci P, Meyer AN, Casale M, Hallowell M, Wilcox WR, Donoghue DJ, Thompson LM (2014) Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Interacts with and Activates TGF $\beta$ -Activated Kinase 1 Tyrosine Phosphorylation and NF $\kappa$ B Signaling in Multiple Myeloma and Bladder Cancer. *PLoS One* 9: e86470

Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Julián-González R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A (2006) E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: 100-105

Satko I, Stanko P, Longauerová I (2000) Salivary gland tumours treated in the stomatological clinics in Bratislava. *J Craniomaxillofac Surg* 28: 56-61

Savic S, Bubendorf L (2007) Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. *Patho* 5: 384-392

Schwarz S, Stiegler C, Müller M, Ettl T, Brockhoff G, Zenk J, Agaimy A (2011a) 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. *Histopath* 58: 557-570

Schwarz S, Müller M, Ettl T, Stockmann P, Zenk J, Agaimy A (2011b) Morphological heterogeneity of oral salivary gland carcinomas: A clinicopathologic study of 41 cases with long term follow-up emphasizing the overlapping spectrum of adenoid cystic carcinoma and polymorphus low-grade adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 336-348

Schwarz S, Zenk J, Müller M, Ettl T, Wünsch PH, Hartmann A, Agaimy A (2012) The many faces of acinic cell carcinomas of the salivary glands: a study of 40 cases relating histological and immunohistological subtypes to clinical parameters and prognosis. *Histopath* 61: 395-408

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

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

Sepideh S, Mohammadreza JN, Ali D, Gholamreza TP, Samira G (2012) Study of the Murine Double Minute 2 status in patients with gastric and colorectal carcinomas and its correlation with prognostic factors. *Indian J Pathol Microbiol* 55: 192-195

Skálová A, Stárek I, Kučerová V, Szépe P, Plank L (2001) Salivary duct carcinoma – a highly aggressive salivary gland tumor with HER-2/neu oncoprotein overexpression. *Pathol Res Pract* 197: 621-626

Soave DF, Oliveira da Costa JP, da Silveira GG, Ianez RC, de Oliveira LR, Lourenço SV, Ribeiro-Silva A (2013) CD44/CD24 immunophenotypes on clinicopathologic features of salivary glands malignant neoplasms. *Diagn Pathol* 8: 29

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

Sung JY, Sun JM, Chang Jeong B, Il Seo S, Soo Jeon S, Moo Lee H, Yong Choi H, Young Kang S, Choi YL, Young Kwon G (2014) FGFR3 overexpression is prognostic of adverse outcome for muscle-invasive bladder carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Urol Oncol* 32: 49.e23-31

Teo PML, Chan ATC, Lee WY, Leung SF, Chan ESY, Mok CO (2000) Failure patterns and factors affecting prognosis of salivary gland carcinoma: retrospective study. *Hong Kong Med J* 6: 29-36

Terhaard CHJ (2011) Radiotherapy: In Bradley PJ, Guntinas-Lichius O (2011) Salivary Gland Disorders and Diseases: Diagnosis and Management. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York

Therkildsen MH, Christensen M, Andersen LJ, Schiødt T, Hansen HS (1998) Salivary gland carcinomas – prognostic factors. *Acta Oncol* 37: 701-713

Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J (2010) Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 235-242

Tomlinson DC, Knowles MA, Speirs V (2012) Mechanism of FGFR3 actions in endocrine resistant breast cancer. *Int J Cancer* 130: 2857-2866

Vairaktaris E, Ragos V, Yapijakis C, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Yannopoulos A, Spyridonidou S, Vylliotis A, Papakosta V, Loukeri S, Lazaris A, Tesseromatis C, Tsigris C, Patsouris E (2006) FGFR-2 and -3 play an important role in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Research* 26: 4217-4222

Valentin-Vega YA, Barboza JA, Chau GP, El-Naggar AK, Lozano G (2007) High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. *Hum Pathol* 38: 1553-1562

Vékony H, Ylstra B, Wilting SM (2007) DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 3133-3139

Wade M, Li YC, Wahl GM (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13: 83-96

Wang YL, Zhu YX, Chen TZ, Wang Y, Sun GH, Zhang L, Huang CP, Wang ZY, Shen Q, Li DS, Wu Y, Ji QH (2012) Clinicopathologic study of 1176 salivary gland tumors in a Chinese population: Experience of one cancer center 1997 – 2007. *Acta Otolaryngol* 132: 879-886

Weaver J, Downs-Kelly E, Goldblum JR, Turner S, Kulkarni S, Tubbs RR, Rubin BP, Skacel M (2008) Fluorescence in situ hybridization for MDM2 gene amplification as a diagnostic tool in lipomatous neoplasms. *Mod Pathol* 21: 943-949

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

Xiong S, Pant V, Suh YA, Van Pelt CS, Wang Y, Valentin-Vega YA, Post SM, Lozano G (2010) Spontaneous tumorigenesis in mice overexpressing the p53-negative regulator MDM4. *Cancer Res* 15: 7148-7154

Xiong S (2013) Mouse models of MDM2 and MDM4 and their clinical implications. *Chin J Cancer* 32: 371-375

Yashiro M, Shinto O, Nakamura K (2010) Synergistic antitumor effects of FGFR2 inhibitor with 5-fluorouracil in scirrhous gastric carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1004-1016



Yilmaz M, Eskiizmir G, Friedman O (2012) Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: management of the parotid and neck. *Facial Plast Surg Clin North Am* 20: 473-481

Yu H, Wang LE, Liu Z, Wei S, Li G, Sturgis EM, Wei Q (2011) Polymorphisms of MDM4 and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. *Pharm Gen* 21: 388-396

Yu H, Sturgis EM, Liu Z, Wang LE, Wie Q, Li G (2012) Modifying effect of MDM4 variants on risk of HPV16-associated squamous cell carcinoma of oropharynx. *Cancer* 15: 1684-1692

Zbären P (2007) Malignome der Parotisspeicheldrüse. *Onko* 2: 10-14

Zbären P, Bradley PJ (2011) Neck Metastasis: In Bradley PJ, Guntinas-Lichius O (2011) *Salivary Gland Disorders and Diseases: Diagnosis and Management*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York

Zhang L, Kharbanda S, Chen D (1997) MCF-7 breast carcinoma cells overexpressing FGF-1 from vascularized, metastatic tumors in ovariectomized or tamoxifen-resistant nude mice. *Oncogene* 15: 2093-2108

Zhang Y, Hiraishi Y, Wang H (2005) Constitutive activating mutation of the FGFR3b in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 117: 166-168

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Tobias Ettl für die Themenstellung und Betreuung dieser Dissertation. Ohne sein Engagement sowohl fachlich als auch bei allen statistischen Auswertungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Gero Brockhoff für die Nutzung der Laborräume und Materialien.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Marietta Bock und Herrn Rudolf Jung für die Anfertigung und Färbung der Gewebeproben, sowie für die freundliche Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Stephan Schwarz-Furlan und Herrn Prof. Dr. Abbas Agaimy danke ich besonders für die histopathologische Auswertung der Gewebeschnitte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Kliniken und Polikliniken für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Unikliniken Erlangen und Regensburg, des Klinikums Nürnberg und den pathologischen Instituten für die Bereitstellung der Daten.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich sowohl bei meiner Familie als auch der Familie meines Mannes, die mich in allen Lebenssituationen unterstützt haben und immer hinter mir standen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Tobias für seine unermüdliche Geduld, Motivation und Liebe. Ohne ihn hätte ich meine Ziele nicht verwirklicht.