

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. T. Hoffmann

**Adenoidzystisches Karzinom
im Kopf-Hals-Bereich –
Cancer-Testis-Antigen-Expression und
ihre prognostische und therapeutische Relevanz**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt im Jahr 2016
von Daniela Heine
geboren in Marburg

Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med Thomas Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Alexander Schramm

Tag der Promotion: 19.10.2017

Teile dieser Dissertation sind erschienen in: Veit J A, Heine D, Thierauf J, Lennerz J, Shetty S, Schuler P J, Whiteside T, Beutner D, Meyer M, Grunewald I, Ritter G, Gnjatovic S, Sikora A G, Hoffmann T K, Laban S: Expression and clinical significance of MAGE and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Head Neck, 38: 1008-1016 (2016)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Adenoidzystisches Karzinom.....	1
1.1.1 Überblick.....	1
1.1.2 Symptome und Klinik	6
1.1.3 Diagnostik.....	6
1.1.4 Differentialdiagnosen	9
1.1.5 Therapie	10
1.1.6 Pathophysiologie und Biomarker.....	14
1.2 Tumorspezifische Antigene.....	20
1.3 Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Studiendesign.....	23
2.2 Patientenkollektiv	23
2.3 Erhebung klinischer Daten	24
2.4 Immunhistochemische Färbungen	24
2.4.1 Material.....	24
2.4.2 Prinzip der Immunhistochemie (IHC)	26
2.4.3 Färbeprotokoll.....	27
2.4.4 Etablierung.....	28
2.4.5 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse	29
2.5 Statistische Auswertung	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Klinische Daten	32
3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung	32
3.1.2 Ursprungsorte des Primärtumors	33
3.1.3 TNM-Klassifikation	34
3.1.4 Besondere Eigenschaften des Tumors.....	36
3.1.5 Therapie	36
3.1.6 Tumorprogression und Überlebenszeiten.....	36
3.1.7 Prognostische Marker	39
3.2 Immunhistochemische Ergebnisse	57
3.2.1 Deskriptive Statistik.....	57

3.2.2	Prognostische Auswirkung der CT-Antigen-Expression.....	63
4	Diskussion	76
5	Zusammenfassung.....	88
6	Literaturverzeichnis.....	90
	Danksagung.....	106
	Lebenslauf.....	107

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Adenoidzystisches Karzinom
Adenokarzinom NOS	Adenokarzinom not otherwise specified
AND	Andere als große Speicheldrüsen
Aquadest.	Destilliertes Wasser
BDNF	Brain-derived neurotropic factor
CD4 ⁺	CD4 positiv
CD8 ⁺	CD8 positiv
CT	Computertomographie
CT-Antigen	Cancer-Testis-Antigen
cTNM	clinical (klinische) TNM-Klassifikation
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
FGF	Fibroblast growth factor
18F-FDG PET	(18F)-Fluordeoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
GNP	Grobnadelpunktion, Stanzbiopsie
GSD	Große Speicheldrüsen
GSL	Glandula sublingualis
GSM	Glandula submandibularis
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HIER	Heat-induced epitope retrieval
HIF-1- α	Hypoxie-induzierter Faktor 1- α
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMG-box	High mobility group box
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie

iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LR	Lokoregionär
MAGE	Melanoma-Associated Antigen
MHD	MAGE Homology Domain
MRT	Magnetresonanztomographie
MYB	Myeloblastosis
n	Anzahl
NFIB	Nuclear factor 1B
NF- κ B	Nuclear factor "kappa light chain enhancer" of activated B-cells
ND	Neck Dissection
NGF	Nerv growth factor
NNH	Nasennebenhöhlen
OP	Operation
OS	Overall survival
p	Signifikanz
PA	Pleomorphes Adenom
PFS	Progression-free survival
Pn0/ Pn1	Perineurale Invasion nein/ja
pN0/pN+	Negativer/positiver pathologisch gesicherter Hals-Lymphknotenstatus
pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
R0/R+	Negativer/positiver pathologischer Resektionsrand (am Tumor)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	Small interfering RNA
SOX4	(Sex determining region Y)-box 4
TBST	Tris-buffered-saline-tween
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (receptor)
WM	Wachstumsmuster

1 Einleitung

1.1 Adenoidzystisches Karzinom

1.1.1 Überblick

Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von ungefähr 3 - 4,5 Fällen pro 1.000.000 Einwohner ist das adenoidzystische Karzinom (adenoid cystic carcinoma - ACC) ein seltener maligner Tumor [2,30]. Es macht weniger als 1% aller malignen Tumore im Kopf-Hals-Bereich aus und weniger als 10% aller Speicheldrüsen-Neoplasien [25,41,60]. Das ACC wird meist in der Glandula parotis, der Glandula submandibularis (GSM) und den kleinen Speicheldrüsen diagnostiziert [30]. Die Glandula parotis ist unter den großen Speicheldrüsen am häufigsten von Neoplasien betroffen [27]. Der relative Prozentsatz der malignen Tumore in der GSM und in der Glandula sublingualis (GSL) sind jedoch höher als in der Glandula parotis [7]. Ferner stellt das ACC in der Glandula parotis das zweithäufigste Malignom nach dem Mukoepidermoidkarzinom dar [18,56]. Der Großteil der ACCs wächst in den kleinen Speicheldrüsen, worunter diejenigen der Mundhöhle und des Oropharynx am häufigsten betroffen sind [15,30,125].

Historie

Robin, Lorain und Laboulbene beschrieben erstmals die typische cribriforme Histologie des ACCs und dessen Neigung zum Wachstum entlang von Nerven. Sie publizierten 1853 und 1854 zwei Artikel über einen Tumor der Glandula parotis und zwei nasale Tumore [30]. 1859 beschrieb Billroth das ACC als Zylindrom, welches auf zylindrischen Pseudolumina beruht, welche beim cribriformen Typ des ACCs durch die Tumorzellen geformt werden [27]. Spies führte 1930 den jetzigen Namen „adenoidzystisches Karzinom“ ein [30]. Anfangs ging man von einer benignen Variante des gemischten Speicheldrüsentumors aus. Erst Dockerty und Mayo entdeckten 1943 die maligne Natur des Tumors [30].

Typische Eigenschaften, Risikofaktoren und Prognose des ACCs

Das ACC wächst langsam mit geringen Proliferationsraten, jedoch lokal aggressiv und invasiv. Zunächst bleibt die Erkrankung häufig indolent und wird daher erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch. Der Tumor neigt zu lokalen Rezidiven und hä-

matogenen Fernmetastasen in Lunge, Knochen und Leber [30], wobei regionale Lymphknotenmetastasen eher selten auftreten [72]. Besondere Eigenschaften, welche die Therapie weiter erschweren, sind das Wachstum entlang von Nerven und die perineurale Infiltration, welche je nach betroffenen Nerven zu Schmerzen, Parästhesien oder Paresen führen können [30]. Aufgrund der ausgeprägten lokalen Gewebeeinfiltration und des perineuralen Befalls treten nach 5 Jahren in etwa 35 bis 50% der Fälle Rezidive auf, wobei auch Lokalrezidive nach mehr als 10 Jahren beschrieben sind und als typisch für die Erkrankung gelten [80]. Histologisch lassen sich drei Formen der Wachstumsmuster unterscheiden: cribriform, tubulär, und solide. Häufig liegen diese Muster gemischt vor. Die Tumoren werden dann nach dem dominanten Typ benannt. Durch diese histologische Einteilung kann eine erste prognostische Zuordnung erfolgen: Der tubuläre Typ weist im Gegensatz zum cribriformen und soliden Typ die beste Prognose auf [27], wohingegen sich die Prognose signifikant verschlechtert, wenn der Anteil der soliden Komponente mehr als 30% beträgt [126].

Szanto et al. teilte das ACC histologisch in drei Grade ein [117]:

- Grad I: tubulärer und cribriformer Typ, kein solider Typ
- Grad II: ausschließlich cribriformer Typ *oder* gemischter Typ, mit < 30% Anteil an solider Form
- Grad III: hauptsächlich solider Typ

In seiner Studie an 79 Patienten änderte sich die Prognose entsprechend der Grade I, II und III: die kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten betrugen nach 5 Jahren 92%, 65% und 14%, nach 10 Jahren 76%, 26% und 5% und nach 15 Jahren 39%, 26% und 5% [117].

Generell ist die mittelfristige Prognose für ein ACC im Kopf-Hals-Bereich eher ungünstig, weshalb einige Autoren das ACC klinisch als „high-grade-Tumor“ einstufen [30]. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Angaben zu Überlebenszeiten finden. So berichteten Chundru et al. [27] über Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten von 75% nach 5 Jahren, 20% nach 10 Jahren und 10% nach 15 Jahren. In einer Studie von Ellington et al. [41] mit 3026 Patienten mit ACC lagen die Jahresüberlebenswahr-

scheinlichkeiten nach 5, 10 und 15 Jahren bei 90,3%, 79,9% und 69,2%. Lee et al. [68] ermittelten bei 48 Patienten mit ACC in der Glandula parotis eine 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 88,2%.

Eindeutige Risikofaktoren für das ACC wie beispielsweise der Nikotinkonsum analog zum Plattenepithelkarzinom bestehen nicht [144].

TNM-Klassifikation

Im Rahmen des Tumor-Stagings werden Kopf-Hals-Tumore gemäß der TNM-Klassifikation eingeteilt. Das T beschreibt die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, N definiert den regionalen Lymphknotenstatus und M beschreibt das Auftreten von Fernmetastasen. Die Zusatzbezeichnungen c für clinical bzw. klinisch und p für pathologisch beschreiben die Vorgehensweisen zur Klassifikation der Tumore. Fernmetastasen treten beim ACC und bei anderen Speicheldrüsenkarzinomen typischerweise in der Lunge auf und sind bei einem relevanten Anteil bereits bei Erstdiagnose vorhanden. [4,12]

Tabelle 1 gilt für die großen Speicheldrüsen Glandula parotis, GSM und GSL und soll einen Überblick über verschiedene Stadien geben. Tumoren der kleinen Speicheldrüsen werden entsprechend ihres anatomischen Ursprungsortes klassifiziert [139].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation maligner Tumore der großen Speicheldrüsen, T = Größe und Ausdehnung des Primärtumor, N = Regionäre Lymphknotenmetastasen, M = Fernmetastasen [139]

* = Extraparenchymatöse Ausbreitung: klinische oder makroskopische Infiltration von Weichteilen oder Nerven, ausgenommen die unter T4a und T4b aufgelisteten. Der alleinige mikroskopische Nachweis entspricht nicht der extraparenchymatösen Ausbreitung als Klassifikationskriterium.

TNM-Klassifikation für große Speicheldrüsen		
T-Stadien	Tx	Primärtumor ist nicht beurteilbar
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	T1	Tumor ≤ 2cm, keine extraparenchymatöse Ausbreitung*
	T2	2cm < Tumor ≤ 4cm, keine extraparenchymatöse Ausbreitung*
	T3	Tumor > 4cm und/oder mit extraparenchymatöse Ausbreitung*
	T4a	Infiltration von Haut, Unterkiefer, äußeren Gehörgang, N.facialis
	T4b	Infiltration von Schädelbasis, Processus pterygoideus und/oder Umschluss von A. carotis interna
N-Stadien	Nx	Beurteilung regionärer Lymphknoten nicht möglich
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, Ausdehnung: ≤ 3cm
	N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, Ausdehnung: > 3cm und ≤ 6cm
	N2b	Metastase(n) in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, Ausdehnung: ≤ 6cm
	N2c	Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, Ausdehnung: ≤ 6cm
	N3	Metastasen in Lymphknoten, Ausdehnung: > 6cm
M-Stadien	Mx	Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich
	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen vorhanden

Auf Basis der TNM-Klassifikation werden die UICC (Union for International Cancer Control) Stadien I–IV gebildet. Daraus können prognostische Aussagen getroffen werden, wobei das Stadium I die beste Prognose und das Stadium IVC die schlechteste Prognose aufweist (Tabelle 2) [4].

Tabelle 2: Stadien-Einteilung I bis IVC der großen Speicheldrüsen anhand von T-, N- und M-Stadien. Sie bilden prognostische Gruppen (Stadium I: beste Prognose, Stadium IVC: schlechteste Prognose). T = Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T1: Tumor $\leq$ 2cm, T2: 2-4cm, T3: Tumor $>$ 4cm und/oder extraparenchymatöse Ausbreitung, T4a: Infiltration von Haut, Unterkiefer, äußeren Gehörgang und Nervus facialis, T4b: Infiltration von Schädelbasis, Processus pterygoideus und/oder Umschluss von A. carotis interna), N = Regionäre Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionäre Lymphknotenmetastase, N1: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, Ausdehnung $\leq$ 3cm, N2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3-6cm, N2b: Metastase(n) in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, $\leq$ 6cm, N2c: Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, $\leq$ 6cm, N3: Ausdehnung von Metastasen in Lymphknoten $>$ 6cm), M = Fernmetastasen (M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen vorhanden) [4]

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

1.1.2 Symptome und Klinik

Die Diagnose eines ACCs stellt oftmals eine Herausforderung dar, da der Tumor aufgrund seiner Seltenheit und seines langsamen Wachstums häufig lange Zeit unentdeckt bleibt. Jede Altersgruppe kann betroffen sein, jedoch gibt es einen Altersgipfel zwischen der 3. und 8. Lebensdekade und das mediane Erkrankungsalter beträgt 57,4 Jahre [41]. Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer (w:m = 1,2:1) [27]. Schmerzen und Paresen stellen neben der ansonsten häufig indolenten Schwellung wichtige klinische Symptome dar [27,30]. Neben den großen und kleinen Speicheldrüsen des Kopfes kann der seltene Tumor auch im Nasopharynx, in der Tränendrüse, im oberen Respirationstrakt, in der Lunge, in der Brustdrüse, in der Haut, in Mastoidzellen und im Genitaltrakt auftreten [55]. Selten manifestiert er sich auch intrakraniell durch Zellinvasion von der Schädelbasis oder durch hämatogene oder perineurale Ausbreitung. Der Befall von Hirnnerven schlägt sich in der jeweiligen spezifischen Symptomatik nieder [55].

So kommt es bei einer Tumorlokalisation in der Glandula parotis bei Befall des N. facialis zu einer Fazialisparese, was als sensibles klinisches Zeichen zu werten ist und bereits auf ein fortgeschrittenes Stadium (T4a) hinweist. In seltenen Fällen tritt das ACC als ulzerierende Läsion am Mundboden oder am Gaumen auf [60]. Eine nasale Obstruktion, Gesichtsschmerz, Epistaxis und Augenschmerzen können bei Befall der Nasennebenhöhlen (NNH) dominieren. Dyspnoe und Stridor können auf ein ACC im Larynx hindeuten [30].

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik des ACCs stützt sich zunächst auf die Anamnese und die klinische Untersuchung, bestehend aus Inspektion und Palpation. Relevant sind Hinweise zum aktuellen Beschwerdebild, der Dauer der Beschwerden, zum Verlauf, zur familiären Disposition und zu Begleit- und Vorerkrankungen. Bei Inspektion und bimanueller Palpation der Speicheldrüsen sollte auf Befunde wie Schwellungen, Schmerzen, Hautveränderungen, Funktionseinschränkungen, Mundtrockenheit, Fazialis- oder andere Hirnnervenparesen und Lymphknotenschwellungen geachtet werden. Bei einer auffälligen Läsion werden die Größe, die Konsistenz, die Verschieblichkeit zur Umgebung und zur Haut, sowie die Form untersucht.

Im Rahmen der Diagnostik werden verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt. Die Sonographie steht aufgrund ihrer unkomplizierten, nicht-invasiven Anwendung und Verfügbarkeit an erster Stelle. Dabei können Charakteristika wie Tumorgroße, Echogenität, Homogenität und Randbegrenzung sowie das Auftreten pathologischer Halslymphknoten ermittelt werden. Mit der Dopplersonographie kann auch die Durchblutung der suspekten Struktur und der Umgebung beurteilt werden. Die verschiedenen Aspekte der Sonographie liefern indirekte Hinweise auf eine mögliche Malignität, die jedoch allesamt nicht beweisend sind, und von der Erfahrung des Untersuchers abhängen. [96]

Zur Therapieplanung kommen die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel zum Einsatz. Sie geben einen Überblick über die anatomische und topographische Ausbreitung der Neoplasie und können im Vergleich zur Sonographie tiefere Gewebeschichten besser darstellen [96]. Mithilfe dieser Verfahren kann die Dignität des Tumors besser eingrenzt werden, wobei eine unscharfe Randbegrenzung, ein infiltratives Wachstum und eine spezifische Kontrastmittelaufnahme Malignitätskriterien darstellen. Es ist allgemein bekannt, dass die CT für die Darstellung raumfordernder Prozesse mit Angrenzung an Knochenstrukturen besondere Vorteile besitzt, wohingegen die MRT neben einer fehlenden Strahlenbelastung den Weichteilkontrast erheblich besser darstellt [74]. Hanna et al. [53] evaluierten die Sensitivität und Spezifität von CT und MRT zur Diagnose einer perineuralen Ausbreitung des ACCs entlang der Schädelbasis. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die MRT zur Diagnostik einer perineuralen Invasion mit bis zu 100% eine höhere Sensitivität, jedoch mit 85% eine etwas geringere Spezifität aufwies als das CT mit 88 bzw. 89%.

Roh et al. [104] untersuchten die Rolle der Positronen-Emissions-Tomographie mit (18F)-Fluorodeoxyglukose (18F-FDG PET) zum Management für Patienten mit Speicheldrüsentumoren und schlossen aus ihrer Studie, dass diese Methode für das initiale Staging und Monitoring nach Therapie nützlich ist, da es zervikale Metastasen und Fernmetastasen sensitiver als die CT darstellt. Allerdings muss die Methode mit Verwendung von 18F-FDG kritisch hinterfragt werden, denn Metastasen können im Ein-

zelfall falsch negativ erscheinen, falls der primäre Speicheldrüsentumor selbst kein FDG aufnimmt. Andersherum sind betroffene Speicheldrüsen häufig entzündlich verändert und nehmen in diesem Rahmen mehr FDG auf, was schlussendlich zu einem falsch-positiven Ergebnis führen kann [30].

Zur definitiven Diagnosestellung ist der histopathologische Tumornachweis der Goldstandard [30]. Die Feinnadelaspirationscytologie (FNAC), die Grobnadelpunktion (GNP, auch Gewebestanze) oder die offene Biopsie stehen zur präoperativen histologischen und zytologischen Abklärung zur Verfügung. Die anschließende zytologische bzw. histologische Beurteilung durch den Pathologen kann die Verdachtsdiagnose erhärten. Bei negativen biopsischen Ergebnissen und weiterhin klinischem Tumorverdacht oder bei unklaren Tumorgrenzen kann die intraoperative Schnellschnittdiagnostik hinzugezogen werden.

Die FNAC ist ein zytologisches diagnostisches Verfahren, das minimal-invasiv, schnell und kostengünstig durchführbar ist und nur eine geringe Belastung für den Patienten darstellt [120]. Dabei werden Zellen mit einer Injektionsnadel mit oder ohne Ultraschallkontrolle aus verdächtigen Raumforderungen durch Unterdruck gewonnen und von Pathologen mikroskopisch untersucht und beurteilt. Die Sensitivität für das Detektieren von malignen Entartungen der Speicheldrüsen beträgt je nach Erfahrung des Untersuchers bis zu 89%, sie kann jedoch auch deutlich darunterliegen. Die Spezifität liegt bei ca. 78-97% [78,120]. Die Qualität der Durchführung der FNAC und die anschließende zytologische Beurteilung hängen jedoch stark von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers ab und führen dabei häufig zu falsch-negativen Ergebnissen [30]. Außerdem kann keine histologische Beurteilung erfolgen, da die Gewebearchitektur nicht mehr vorhanden ist und häufige nur zwischen benignen und malignen Läsionen unterschieden werden kann, ohne jedoch die Entität exakt bestimmen zu können [120].

Die Grobnadelpunktion (GNP), auch Gewebestanze oder Stanzbiopsie genannt, wird nicht nur im Kopf-Hals-Bereich, sondern in unterschiedlichen medizinischen Fachgebieten angewendet, beispielsweise in der Gastroenterologie zur Punktion von Pankreas oder Leber, oder in der urologischen Prostata-Diagnostik. Vorteilhaft ist, dass sie wie die FNAC ebenfalls schnell auswertbar und kostengünstig ist. Im Gegensatz

zur FNAC besteht bei der GNP die Möglichkeit einer histologischen Diagnose, da Gewebezylinder entnommen werden. So kann auch bei inoperablen Patienten, bei denen keine offene Biopsie erfolgt ist, eine Gewebeprobe für die histologische Untersuchung gewonnen werden, um das weitere Therapieprozedere zu planen. Die Qualität der Untersuchung hängt ebenfalls von der Erfahrung des behandelnden Arztes ab. In der Regel ist die Punktion schmerzhafter als eine FNAC, sodass sie regelhaft in Lokalanästhesie durchgeführt wird. Komplikationen wie die Punktion von benachbarten Strukturen, Hämatome oder Blutungen treten im Allgemeinen selten auf. Zur Diagnose von Speicheldrüsenkarzinomen weist die GNP mit 94 bis 96% eine hohe Spezifität für benigne Erkrankungen und mit 80 bis 100% eine hohe Sensitivität für maligne Befunde auf [120,138].

Eine offene Biopsie, bei der durch einen operativen Eingriff Gewebe entnommen wird, ist meist indiziert, wenn FNAC oder GNP nicht ausreichend sicher zur Befundabklärung beitragen können, d.h. wiederholt negative Ergebnisse liefern trotz eines klinischen Tumorverdachts. Vorteile sind, dass der Chirurg unter Sicht biopsiert und bei Bedarf eine größere Gewebemenge entfernen kann. Diese kann nachfolgend histologisch untersucht werden. Nachteilig ist der höhere Aufwand bis hin zur Allgemeinnarkose mit weiteren Risiken, sowie das „anoperieren“ des Tumors, mit einem Restrisiko der Tumorzellverschleppung.

1.1.4 Differentialdiagnosen

Bei Verdacht auf ein ACC müssen die Differentialdiagnosen klinisch und pathologisch abgegrenzt werden.

Als benigne und wesentlich häufigere Tumoren der Speicheldrüsen treten das pleomorphe Adenom (PA), der Warthin-Tumor, das Onkozytom, das Zystadenom und das Basalzelladenom in absteigender Häufigkeit auf. Diese sind meist aufgrund ihres klinischen Befundes relativ sicher vom ACC abgrenzbar. Unter den malignen Neoplasien kommen das Mukoepidermoidkarzinom, gefolgt vom Adenokarzinom, neben dem ACC am häufigsten vor. Weniger häufig sind das Azinuszellkarzinom, das Adenokarzinom NOS (not otherwise specified), das Plattenepithelkarzinom und das Karzinom im PA. [65]

Die differentialdiagnostische Abgrenzung kann in der Regel nur durch die Aufarbeitung des Tumorgewebes durch den Pathologen erfolgen. Beim Auftreten von ACC im Bereich der Gesichtshaut oder der Gehörgänge ist die Abgrenzung zum Basalzellkarzinom oder Plattenepithelkarzinom ebenfalls von Bedeutung [19]. Bei den seltenen Manifestationen im Larynx oder Trachea ist die Abgrenzung zum Plattenepithelkarzinom, aber auch zu Sarkomen, wichtig [77,79].

1.1.5 Therapie

Chirurgische Therapie

Der Goldstandard und einzig kurative Ansatz in der Therapie des ACCs ist die radikale chirurgische Entfernung, häufig gefolgt von einer postoperativen adjuvanten Radiotherapie [18]. Die chirurgische Therapie kann Tumoren in frühen Stadien, die mit ausreichendem Sicherheitsabstand von mindestens 5 mm in alle Richtungen reseziert wurden, als alleinige Modalität heilen. Entscheidend für eine gute Prognose ist die ausreichend radikale Resektion unter Berücksichtigung der spezifischen perineuralen Wachstumsmuster. Neben der radikalen Resektion des Primärtumors sollte, zumindest bei auffälliger Bildgebung, eine Operation der lokoregionären Halslymphknoten im Sinne einer Neck Dissektion (ND) erfolgen. Dieser Operationsschritt ermöglicht die Komplettierung des sogenannten chirurgischen Stagings und den Ausschluss oder den Nachweis von okkulten Halslymphknotenmetastasen. George Crile beschrieb 1906 die klassische radikale Neck Dissection und verbesserte damit die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren [11,113]. Heutzutage ist die ND ein wichtiges diagnostisches und therapeutisches Verfahren bei Kopf-Hals-Karzinomen. Dabei werden mehrere Formen unterschieden. Bei der radikalen ND werden alle Lymphknoten einer Halsseite sowie nicht-lymphatische Strukturen wie Blutgefäße, Nerven, Speicheldrüsen und der M. sternocleidomastoideus entfernt. Diese Form der ND wird heute nur bei sehr fortgeschrittenen Tumoren gewählt, meist kommt die modifiziert-radikale ND zum Einsatz, bei welcher zumindest eine nicht-lymphatische Struktur reseziert wird. Bei sogenannten N0-Hälsen, d.h. sonographisch negativen Befunden, kommt die funktionelle ND zum Einsatz, welche weniger radikal ist und alle nicht-lymphatischen Strukturen schont. Bei Verdacht auf okkulte Lymphknotenmetastasen kann die selektive ND angewendet werden, bei der nur Lymphknoten definierter Le-

vel entfernt werden. Dabei nutzt man das Wissen über Metastasierungswege bestimmter Primärtumore.

Makroskopische Lymphknotenmetastasen sind beim ACC der Glandula parotis selten beschrieben, wobei die Inzidenz bei kleinen Speicheldrüsen höher zu sein scheint [30,42]. Min et al. [86] beschrieben eine generelle Inzidenz von ca. 10% für zervikale Lymphknotenmetastasen beim ACC. Lee et al. [69] untersuchten die elektive ND beim ACC der Speicheldrüsen und berichteten, dass ca. 15% der Patienten okkulte Metastasen aufwiesen. Den Autoren zufolge kann mit therapeutischer und elektiver ND eine höhere lokoregionäre Tumorkontrolle erzielt werden.

Strahlentherapie

Die Radiotherapie mit ionisierender Strahlung kommt bei Tumoren, die aufgrund ihrer Lage (z.B. im Nasopharynx) nicht sinnvoll chirurgisch resezierbar erscheinen, als primäre Therapie zum Einsatz. Zudem kommt sie als sogenannte adjuvante Therapie postoperativ beim Vorliegen von Risikofaktoren wie positiven Resektionsrändern, bei einem positiven Lymphknotenstatus oder bei fortgeschrittenen Tumorstadien zum Einsatz [21]. Eine inkomplette Resektion oder eine Resektion mit geringen Sicherheitsabständen ist beim ACC im Kopf-Hals-Bereich aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse ein typisches Problem [30].

Die Indikation zur adjuvanten Radiatio wird in Tumorkonferenzen häufig gestellt, der Nutzen wird jedoch durchaus kontrovers diskutiert. Marcinow et al. [80] gaben in ihrer Studie bekannt, dass eine adjuvante Strahlentherapie weder einen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben noch auf das Gesamtüberleben hat. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass bei adäquater Dosis das lokale Wachstum durch postoperative Bestrahlung begrenzt werden kann, wobei einige Autoren postulieren, dass das Auftreten von Lokalrezidiven häufig nur verzögert, jedoch nicht verhindert werden kann [25,30,111]. Mendenhall et al. [85] verglichen die Radiotherapie alleine gegenüber einer kombinierten Behandlung mit Resektion und Bestrahlung. Da ein signifikanter Patientenanteil nach inkompletter Resektion durch eine Radiotherapie geheilt werden konnte, empfehlen die Autoren den Einsatz einer postoperativen Be-

strahlung. Die postoperative Bestrahlung kann außerdem eine effektive Behandlung sein, wenn Nerven mikroskopisch von Tumor befallen sind [30].

Die hochenergetische Partikeltherapie mit Protonen oder Schwerionen stellt eine weitere mögliche Therapieoption dar. Micheal Goitein [48] nennt Vorteile und Nachteile dieses Verfahrens. Vorteile befinden sich in der Verwendung geringerer Bestrahlungsdosen und dem günstigen Tiefendosisverlauf der Strahlung im Vergleich zur Röntgenstrahlung. Durch die hochenergetische und dichtere Energieabgabe mit definierter, begrenzter Reichweite entfaltet sich die Wirkung der Ionen gezielter im Bereich des Tumors und schont das umliegende Gewebe, sodass toxische Nebenwirkungen reduziert werden können. Nichtsdestotrotz bestehen Probleme in der technischen Umsetzung und die Verfahren sind wesentlich teurer als die „klassische“ Strahlentherapie.

Takagi et al. [118] untersuchten 80 Patienten mit einem ACC im Kopf-Hals-Bereich, die entweder mit einer Protonen- oder einer Schwerionentherapie (Carbon) behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Partikeltherapie eine gute lokale Tumorkontrolle erzielte und Effekte in inoperablen Fällen oder bei T4-Tumoren vielversprechend waren. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Protonen- und einer Carbon-Ionen-Therapie bezüglich der 5-Jahresüberlebenszeit (63%), dem progressionsfreien Überleben (39%) und der lokalen Tumorkontrolle (75%).

Dagan et al. [32] beobachteten 84 Patienten mit nicht-metastasiertem sinunasalen Karzinom und kamen zu folgenden Ergebnissen: Die Protonentherapie erzielte eine lokale Tumorkontrolle nach 3 Jahren von 83%, wohingegen die Rate bei einer primären Radiotherapie 61% betrug. Weitere Studien bestätigen ebenfalls die gute lokale Tumorkontrolle durch Protonen- bzw. Carbon-Ionen-Therapie [9,71,88].

Studien zur Neutronentherapie bei Speicheldrüsenkarzinomen und beim ACC in Tränenrüsen lieferten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse bezüglich der lokalen Tumorkontrolle [39,46,57,84]. Huber et al. [57] untersuchten in ihrer retrospektiven Studie über Neutronen- versus kombinierter Neutronen- und Photonentherapie 75 Patienten mit inoperablem, inkomplett reseziertem oder rezidiertem ACC. Sie be-

trachteten die lokale Tumorkontrolle, die Überlebenszeiten, die Fernmetastasierung und die Komplikationen und kamen zu dem Ergebnis, dass die Neutronentherapie signifikant eine bessere lokale 5-Jahres-Tumorkontrolle (75%) erzielte als die kombinierte Therapie (39%). Allerdings wies die Neutronentherapie in dieser Studie keinen signifikanten Vorteil bezüglich der Überlebenszeiten auf, welche vom Auftreten von Fernmetastasen beeinträchtigt wurden.

Chemotherapie

Zur Behandlung des ACCs im fortgeschrittenen bzw. fernmetastasierten Stadium gibt es keine einheitlichen Therapieempfehlungen. Die Anzahl der verfügbaren Studien und die Fallzahlen sind aufgrund der Rarität des ACCs gering, obwohl Systemtherapien aufgrund der häufigen Fernmetastasierung des Tumors durchaus relevant sind [18]. Eine Chemotherapie wird in der Regel als palliative Behandlung bei symptomatischer, lokal rezidivierter oder fernmetastasierter Erkrankung eingesetzt [67]. Aufgrund des langsamen Wachstums und der relativ geringen Zellproliferation sind die Ansprechraten jedoch noch geringer als bei klassischen Kopf-Hals-Karzinomen [18].

Cisplatin bleibt das favorisierte und am häufigsten verordnete Medikament [21]. In einer retrospektive Studie von Samant et al. [107] in der 16 Patienten mit Cisplatin oder Carboplatin therapiert wurden, war der Tumor in 50% progredient, wobei eine partielle Remission in Einzelfällen erreicht werden konnte. Obwohl weitere Studien mit Epirubicin, Gemcitabine, Mitoxantrone und Paclitaxel erfolgten, konnten hier keine höheren Ansprechraten erzielt werden [18,97,127].

Immuntherapie

Neben der klassischen Chemotherapie stellen die Immuntherapie und die zielgerichtete Therapie einen vielversprechenden neuen Ansatz dar.

Zielgerichtete Therapien richten sich gegen spezifische Angriffspunkte, die bevorzugt in Tumorzellen vorkommen. Allgemein gesprochen werden antitumorale Mechanismen des Immunsystems aktiviert und Signalkaskaden blockiert, um die Tumorphroliferation und Metastasierung einzudämmen [18]. Studien zu Imatinib (c-Kit-

Inhibitor), Sunitinib (c-Kit- und VEGF-Inhibitor), Cetuximab (EGFR-Inhibitoren) und Lapatinib (EGFR-Inhibitor) ergaben molekular vielversprechende Ansätze, welche in klinischen Studien bisher jedoch noch keinen durchschlagenden Erfolg aufzeigen konnten [3,18,22,75,97]. Neue Ansätze mit dem VEGF-Inhibitor Dovotinib, dem Multi-tyrosin-Kinase-Inhibitor Sorafenib und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib werden derzeit in laufenden Studien untersucht, wobei ähnlich wie bei der Chemotherapie lediglich eine Stabilisierung der Erkrankung, jedoch keine Remission, erreicht werden konnte [18]. Generell besteht die Problematik der fehlenden randomisierten Studien aufgrund der Seltenheit des ACCs. Für eine ausreichende Fallzahl sind multizentrische bzw. internationale Studien notwendig [18].

Immuntherapien sollen dem Körper helfen Tumorzellen als „feindliche“ Zellen zu erkennen, um sie gezielt anzusteuern und zu zerstören. Vakzinierungen gegen Tumoren, die beispielsweise mit Tumorantigenen oder tumorassoziierten Antigenen durchgeführt werden, sind weitere interessante Ansätze. Es gibt vielversprechende erste Therapiestudien zu MAGE-A3-, MAGE-A4- und NY-ESO-1-Vakzinen bei Lungen-, Magen- und Ösophaguskarzinomen [1,105,130].

1.1.6 Pathophysiologie und Biomarker

In der Tumorgenese sind viele unterschiedliche molekulare Regulationsmechanismen und Gene beteiligt. Einige davon lassen sich als Parameter mit prognostischer oder diagnostischer Aussagekraft objektivieren. Diese Biomarker könnten auch therapeutische Ansatzpunkte einer Immuntherapie (vgl. Abschnitt 1.1.5 Therapie) sein und werden derzeit in diversen Studien untersucht. Im Folgenden sollen einige Aspekte und Mechanismen erläutert werden, die im Zusammenhang mit dem ACC untersucht wurden.

Onkogene Infektionen

Es bestehen Hypothesen, dass das Entstehen eines ACCs in Zusammenhang mit einer Infektion mit *Humanen Papillomaviren (HPV)* steht [102]. HPV-Infektionen mit dem Hochrisiko-Typ 16 finden sich im Kopf-Hals-Bereich bevorzugt im Oropharynx und HPV vom Typ 33 wurden in sinunasalen Karzinomen, die dem ACC ähnlich sind, ent-

deckt [13]. Auch das ACC der Zervix können mit einer HPV33-Infektion vergesellschaftet sein [33].

Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und mögliche therapeutische Implikationen

Wachstumsfaktoren dienen der Signalübermittlung über Bindung an spezifische Rezeptoren. Daraufhin werden Gene aktiviert oder inaktiviert. Es folgen Erläuterungen zur Rolle verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in der Karzino-genese und der Wachstumsregulation des ACCs, sowie mögliche therapeutische Implikationen.

C-Kit (CD117) ist ein transmembraner Tyrosinkinaserzeptor und wird durch Bindung an den Stammzellfaktor aktiviert. Dieser hat diverse Funktionen, unter anderem spielt er eine Rolle bei der Zelladhäsion, dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, der Apoptose und der Chemotaxis. Salehinejad et al. [106] analysierten mittels immunhistochemischer Färbungen die c-Kit-Expression im PA, im ACC, im polymorphen low-grade Adenokarzinom und im Mukoepidermoidkarzinom. Sie stellten fest, dass eine Immunreaktion in allen Typen der Speicheldrüsentumore gefunden werden konnte und dass sich mehr als 50% der Tumorzellen im ACC positiv anfärbten. Allerdings war die c-Kit-Expression nicht spezifisch für das ACC und es konnte kein klarer Unterschied in den Expressionsmustern zwischen benignen und malignen Speicheldrüsentumoren festgestellt werden. Bell et al. [8] publizierten, dass die c-Kit-Expression auf die inneren duktalem Epithelzellen der Speicheldrüsen beschränkt war, wohingegen *EGFR (epidermal growth factor receptor)*, ein Rezeptor für epitheliale Wachstumsfaktoren, hauptsächlich in den äußeren Myoepithelzellen exprimiert wurde. In dieser Studie war die duktalem c-Kit-Expression mit einem schlechteren 3- und 5-Jahresüberleben (68,9% und 58,5%, $p = 0,048$) assoziiert als die gleichzeitige EGFR- und c-Kit-Überexpression im ACC-Gewebe mit myoepithelialen Zellen (85,4% und 75,1%, $p = 0,048$).

An *EGFR* binden unter anderem folgende Liganden: EGF (epidermal growth factor), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und Epregrulin. Nach Bindung von EGF und TNF- α an

den Rezeptor lösen diese diverse intrazelluläre Signalwege aus. Sie haben physiologischerweise Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung, aber auch pathophysiologisch in der Neoangiogenese und Metastasierung. Studien konnten belegen, dass EGFR im ACC überexprimiert wird, und mit dem histologischen Tumorgrad korreliert. Eine Korrelation mit der Prognose konnte nicht nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von EGFR und TNF- α in Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich mit schlechterem Überleben korreliert war [72].

HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) ist ein humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor auf Chromosom 17. Eine Amplifikation und Überexpression haben beim Mammakarzinom, beim Magenkarzinom, sowie beim Ösophaguskarzinom einen erheblichen prognostischen und therapeutischen Stellenwert [103]. Immunhistochemisch konnte zwar eine Überexpression von Her2/neu im ACC in Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Die Häufigkeit dieser Überexpression war mit 16% jedoch zu gering, um eine effektive Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab durchzuführen. [29,38]

VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein Signalmolekül, welches nach Bindung an den VEGF-Rezeptor den NF- κ B-Signalweg (nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells") aktiviert. Dies vermittelt Angiogenese bzw. Vaskulogenese, also die Neubildung von Gefäßen durch Einwanderung und Teilung neuer Endothelzellen. In sauerstoffarmen Zellen entsteht der Transkriptionsfaktor HIF-1- α (Hypoxie-induzierter Faktor-1- α), welcher das Erythropoetin-Gen und die VEGF-Expression aktiviert. Eine Studie von Kondo et al. [63] zeigte, dass unter hypoxischen Bedingungen eine HIF-1- α -abhängige VEGF-Überexpression die Entwicklung von ACC-Metastasen begünstigt.

Interessanterweise können anhand der c-kit-, EGFR- und VEGFR-Expressionen keine Vorhersagen zu Prognose oder Rezidivwahrscheinlichkeit getroffen werden [68].

CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4) ist ein Chemokinrezeptor, der die Chemotaxis im Rahmen einer Immunantwort vermittelt. Er wird im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom in den Zellen des ACCs überexprimiert. CXCL12, der Ligand von CXCR4, kommt vor allem im Knochenmark, in der Lunge und in der Leber vor. Dies würde möglicherweise das hämatogene Metastasierungsmuster des ACCs erklären, da z.B. das Plattenepithelkarzinom, welches primär lymphogen metastasiert, kein CXCR4 exprimiert [89].

Der *Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2* (fibroblast growth factor) ist einer der 23 Mitglieder der FGF-Familie. Er spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung. Ding et al. [37] wiesen speziell für ACC-Zelllinien eine proliferationsstimulierende Wirkung von FGF-2 nach.

Transkriptionsfaktoren

Die Transkription als Teil der Proteinbiosynthese ist ein wichtiger Schritt in der Genexpression und wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert und koordiniert. Veränderungen in der Genexpression und -repression tragen zur Entstehung von Tumoren bei [134].

SOX4 ((sex determining region Y)-box 4) ist ein Transkriptionsfaktor aus der HMG-Box-Familie (high mobility group box) der DNA-bindenden Proteine, dessen Gen im ACC häufig überexprimiert wird [72]. Physiologischerweise trägt es zur normalen Entwicklung des Ausflusstraktes am Herzen, der Pro-B-Lymphozyten-Differenzierung und zur Entwicklung des zentralen Nervensystems während der Embryogenese bei. Im ACC scheint dieser Transkriptionsfaktor für die Regulation des Zellüberlebens, der Proliferation und der Apoptose wichtig zu sein. Pramoonjago et al. [100] wiesen mittels gezieltem Knockdown des SOX4-Proteins ein reduziertes Zellüberleben und Apoptosezunahme in einer ACC-abgeleiteten Zelllinie (ACC3) nach.

Tang et al. [119] untersuchten den *Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Slug*, der in 71,90% der Fälle eine Überexpression im ACC-Gewebe zeigte. Die Expression korrelierte signifikant mit der Tumorgroße, dem TNM-Stadium, dem Gewebetyp, der peri-

neuralen Invasion und dem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen. Slug scheint prognostisch wegweisend zu sein und es wird vermutet, dass er eine wichtige Rolle bei Invasion und Metastasierung des ACCs spielt.

Marker perineuraler Invasion

Da eine perineurale Invasion beim ACC häufig vorliegt, wird nach biomolekularen und prognostischen Ursachen und Markern geforscht. So sind die Wachstumsfaktoren *NGF* (nerv growth factor) und *BDNF* (brain-derived neurotropic factor) und die *Tyrosinkinase A* bei vorliegender perineuraler Invasion häufig überexprimiert [64,131].

Genetische Aberrationen

MYB ist ein Protoonkogen, welches zur Myeloblastosis(*MYB*)-Familie gehört. Onkogene entstehen durch Mutation eines Protoonkogens und greifen in die Genregulation und Genaktivität ein. Dadurch tragen sie zur Entstehung von Neoplasien bei. Aufgrund einer t(6;9)-Translokation von *MYB* und dem Transkriptionsfaktor-Gen *NFIB* (nuclear factor 1B) entstehen Fusionsprodukte von *MYB* und *NFIB*, welche von West et al. [137] im ACC nachgewiesen werden konnten. Mitani et al. [87] fanden Hinweise, dass *MYB-NFIB-Fusionstranskripte* in adenoidzystischen Primärtumoren und im metastasierten ACC der Glandula parotis, jedoch in keinem anderen Tumortyp der Drüse signifikant nachweisbar sind. Außerdem war in deren Studie *MYB* in dem Großteil der ACC-Proben immunhistochemisch überexprimiert. Die Autoren nahmen daher an, dass eine *MYB-NFIB-Fusion* mit einer *MYB* Überexpression zusammenhängt. In einer Studie von Brill et al. [17] waren in 64% der Fälle *MYB-NFIB-Fusionen* in Speicheldrüsen-ACC und ACC anderer Lokalisationen zu finden. *MYB-NFIB-Fusionen* scheinen folglich spezifisch für das ACC zu sein.

Außerdem färbten sich in einer experimentellen Studie von Pusztaszeri et al. [101] 80% der Gewebeproben mit ACC positiv an, wobei Gewebe des pleomorphen Adenoms keine *MYB*-Expression zeigte.

Neben (Proto-)Onkogenen spielen *Tumorsuppressorgene* im Körper des Menschen eine große Rolle. Sie arretieren den Zellzyklus und verhindern dadurch die Proliferati-

on entarteter oder beschädigter Zellen. Nun können entweder geschädigte DNA-Bereiche repariert werden oder es wird, bei Misserfolg der Reparatur, der Zelltod durch Expression apoptotischer Gene herbeigeführt. Bei Mutation der Tumorsuppressorgene kann sich geschädigte DNA replizieren und folglich können maligne Tumore entstehen. Die Bedeutung von Mutationen des bekannten Tumorsuppressorgens *p53*, welches bei vielen Tumoren eine Rolle spielt, tritt bei Speicheldrüsentumoren selten auf [49,61]. Es scheint allerdings eher in späteren Tumorstadien relevant zu sein, und könnte Hinweise darauf geben, ob ein „low-grade“ ACC in ein „high-grade“ ACC mutiert [72].

Signalmoleküle

Ou Yang et al. [93] untersuchten die Auswirkung der *induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)* auf die VEGF-Expression im ACC. Hierzu wurde die iNOS in ACC-Zellen eingeschleust und festgestellt, dass eine Hemmung der iNOS die VEGF-Expression vermindert. Dadurch wird die Zellproliferation und die Invasion der ACC-Zellen herunter reguliert und deren Apoptose gesteigert. Die Autoren schlossen daraus, dass die iNOS als mögliches therapeutisches Ziel in der ACC-Behandlung dienen könnte [93]. Bei der Interpretation von in-vitro-Versuchen mit ACC-Zelllinien muss allerdings stets die Reinheit und die Herkunft der verwendeten Zelllinien in Frage gestellt werden [98].

Adhäsionsmoleküle scheinen in fortgeschrittenen Tumorstadien bei lokaler Invasion und Metastasierung wichtig zu sein. Ein Verlust der Adhäsion kann zur Ablösung neoplastischer Zellen vom Primärtumor führen. Diese Zellen können folglich leichter in andere Körperregionen metastasieren. Aufgrund der häufigen Fernmetastasierung ist dieser mögliche Mechanismus beim ACC von besonderem Interesse. Liu et al. [72] untersuchten die Biologie des ACCs und den Einfluss über- oder unterexprimierter Signalmoleküle. *E-Cadherin*, ein transmembranes Glykoprotein, wird auf Epithelzellen exprimiert und vermittelt calciumabhängig eine Zell-Zell-Adhäsion. Eine verminderte E-Cadherin-Expression hat sich als prognostisch ungünstiger Faktor erwiesen. *β-6-Integrin* wird während Gewebereparaturen und Tumorgenese vermehrt exprimiert.

Die Expression ist in malignen Speicheldrüsentumoren höher als in benignen Tumoren.

Ki-67 ist ein Protein, welches während der aktiven mitotischen Phase des Zellzyklus exprimiert wird. Es dient als Proliferationsmarker in immunhistochemischen Färbungen und gibt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren. Eine hohe Expression weist somit auf vermehrte mitotische Aktivität und Zellproliferation hin. Ki-67 wird, im Gegensatz zum polymorphen Low-grade Adenokarzinom, im ACC vermehrt exprimiert und eignet sich daher dazu, die beiden Tumorentitäten histologisch voneinander zu unterscheiden. Darüber hinaus ist Ki-67 mit einer schlechten Überlebensrate korreliert. [72]

1.2 Tumorspezifische Antigene

Tumor-Hoden-Antigene, sogenannte Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene), sind Immunproteine, welche mit Ausnahme des Hodengewebes in seltenen Fällen auch im ovariellen, plazentaren und trophoblastischen Gewebe exprimiert werden, jedoch nicht in anderem gesunden Gewebe. Somit sind CT-Antigene spezifisch für malignes Tumorgewebe. Van der Bruggen et al. [123] isolierten aus einer humanen Melanom-Zelllinie 1991 erstmals das Antigen MAGE-A1 (melanoma-associated antigen), welches von humanen Leukozytenantigenen (HLA) präsentiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird.

Die Familie der Tumor-Hoden-Antigene umfasst BAGE, GAGE, MAGE und NY-ESO-1 [14,24,70]. Je nach Genstruktur und gewebespezifischer Genexpression werden Antigene der MAGE-Familie mit über 20 Mitgliedern [115] in MAGE-I und MAGE-II unterteilt. MAGE-A-, -B- und -C-Gene befinden sich auf dem X-Chromosom und gehören MAGE-I an, welche in Hodengewebe und malignen Tumoren exprimiert werden [26,34,50,108]. Die Untergruppe MAGE-II hingegen, der MAGE-D,-E,-F1,-G1,-H1,-I,-K1,-L2 und Necdin angehören, wird in normalem Gewebe, nicht jedoch in kanzerogenem Gewebe, exprimiert [26,108,141]. Somit zählen MAGE-A-, -B- und -C zu den tumorspezifischen CT-Antigenen.

Die Funktion der MAGE-Gene ist derzeit noch Gegenstand aktueller Forschung [108]. Möglicherweise sind sie jedoch während der embryonalen Entwicklung in Keimbahnzellen aktiv und werden anschließend durch DNA-Methylierung und Histondeacetylierung inaktiviert [141]. Bei neoplastischen Transformationen werden MAGE-Gene wieder aktiviert. Ihre Transkripte können als Antigene vom Immunsystem erkannt werden, was zum Angriff auf die MAGE-explorierenden Zellen führt [35,108].

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort werden Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (insbesondere durch dendritische Zellen) aufgenommen, und in Lymphknoten über humane Leukozytenantigene (HLA) der Klasse II den CD4-positiven T-Zellen (CD4⁺-T-Zellen) präsentiert, welche Plasmazellen zur Antikörperproduktion anregen. Kernhaltige Zellen oder entartete Zellen präsentieren Antigene über HLA-Klasse-I-Rezeptoren, an die sich CD8-positive T-Lymphozyten (CD8⁺-T-Zellen) binden. Diese werden durch die Antigenerkennung kostimuliert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die in periphere Gewebe wandern und die Apoptose von Tumorzellen initiieren [70,133,135].

Spermatogonien tragen hingegen keine HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle und induzieren somit keine Immunantwort [108,115]. Die Mechanismen, welche zur tumorspezifischen und hodenspezifischen Antigenexpression führen, sind weitestgehend unklar. Die epigenetische Genregulation scheint in diesem Zusammenhang wichtig zu sein. Forscher gehen davon aus, dass durch Demethylierung von stillgelegten Genen durch synthetische Nukleoside wie 5'-Azacytidine und 5'-Aza-2'-Deoxycytidine die Gene aktiviert werden und folglich die Antigenexpression induziert werden kann [35,108,115,132].

Die tumorspezifische Antigenexpression möchte man sich im Rahmen der Vakzinierung zu Nutzen machen, um eine Immunantwort gegen den Tumor zu generieren. Der Begriff Vakzinierung beschreibt dabei nicht den Einsatz als Impfstoff, sondern meint im Zusammenhang mit der Immuntherapie die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems durch antigenpräsentierende Zellen. Folglich werden Antikörper gegen die tumorspezifischen Antigene generiert [135].

Die tumorspezifische Expression und hohe Immunogenität der CT-Antigene sind entscheidende Vorteile zur diagnostischen Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumoren und stellen essentielle Faktoren für eine mögliche zielgerichtete Immuntherapie dar [23,66,109].

1.3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expressionen der CT-Antigene pan-MAGE, MAGE-A1, MAGE-C1, MAGE-C2 und NY-ESO-1 mittels Immunhistochemie (IHC) in einer multizentrischen Kohorte von 84 ACC-Gewebeproben nachzuweisen. Durch die Korrelation der generierten Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten und deren Überlebenszeiten soll schließlich diskutiert werden, ob Schlussfolgerungen für den Einsatz einer Immuntherapie gezogen werden können. Dabei soll besonders auf folgende Parameter geachtet werden:

- Gibt es eine CT-Antigen-Expression im ACC des Kopf-Hals-Bereichs und wie hoch ist diese innerhalb der Patientenkohorte?
- Korreliert die Expression der CT-Antigene mit klinischen Parametern wie dem Tumorstadium, der perineuralen Invasion, dem histologischen Muster, den Resektionsrändern, dem Alter, dem Geschlecht oder dem Ort des Primärtumors?
- Welche Faktoren beeinflussen die Überlebenszeit und die progressionsfreie Zeit und gibt es prognostisch relevante Marker in der vorliegenden Kohorte?
- Welche Therapieansätze wurden bislang verfolgt und kann ein therapeutisches Vorgehen gegen CT-Antigene in Zukunft in Betracht gezogen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit den Universitätskliniken in Pittsburgh (University Medical Centers of Pittsburgh, USA), Köln und Ulm eine multizentrische retrospektive Studie durchgeführt. Hierzu wurden klinische Daten der Patienten mit der Diagnose eines ACCs erhoben und statistisch ausgewertet. Zur Beurteilung der CT-Antigenexpression wurden Tumorproben mittels IHC gefärbt.

2.2 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden Patienten der genannten Universitätskliniken ausgewählt, bei denen die Erstdiagnose eines ACCs zwischen 1984 und 2014 gestellt wurde. Von anfänglich 94 Fällen aus Pittsburgh, 24 aus Köln und 16 aus Ulm blieben nach Betrachtung der Einschluss- und Ausschlusskriterien (s.u.) 49 Fälle aus Pittsburgh, 19 aus Köln und 16 aus Ulm, in der Summe somit 84 Fälle erhalten.

Alle Patienten der Universität Ulm wurden schriftlich über Ziel und Ablauf der Studie informiert und eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde eingeholt. Bei den externen Patienten lagen Zustimmungen des Institutional Review Boards vor. Die Studie wurde von der Ethikkommission Ulm geprüft und genehmigt (Ethikvotum Nr. 304/13).

Einschlusskriterien:

- Erstdiagnose eines ACCs im Kopf-Hals-Bereich
- Mindestalter: 18 Jahre
- Vorliegen klinischer Daten
- Vorliegen von Histologie/Paraffin-Blöcken
- Schriftliches Einverständnis

Ausschlusskriterien:

- Rezidivtumore
- Andere Speicheldrüsenkarzinome als das ACC
- Vorbehandelte Karzinome

2.3 Erhebung klinischer Daten

Klinische Daten wurden retrospektiv erhoben. Informationen über Patienten aus Ulm wurden über die elektronische Patientenakte ePA (Wilken, Ulm) und ISH-MED (SAP) eingeholt. Daten über Patienten aus Köln und Pittsburgh wurden aus deren Patientenkarteien entnommen. Die Daten wurden in einer SPSS-Datenbank (IBM® SPSS® Statistics Version 21) gesammelt und pseudonymisiert. Für die anschließende anonymisierte Auswertung wurde das Datum der Erstdiagnose, das Geschlecht, das Alter, die Primärlokalisation des Tumors, die TNM-Klassifikation, der Resektionsstatus, das Vorhandensein perineuraler Invasion, das histologische Wachstumsmuster, die vorgenommene Therapie, das Auftreten von Rezidiven und/oder Fernmetastasen, der Zeitpunkt des letzten Patientenkontaktes und der derzeitige Status (lebend oder verstorben) kollektiviert. Da nicht von allen Patienten die vollständigen Informationen vorlagen, variiert in der vorliegenden Auswertung die Gesamtzahl verschiedener Parameter.

2.4 Immunhistochemische Färbungen

2.4.1 Material

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde Paraffin-fixiertes Gewebe verwendet. Die pathologischen Institute der Kliniken in Pittsburgh und Köln stellten bereits auf Objektträgern fixiertes Tumorgewebe der Patienten mit ACC zur Verfügung. Es waren jeweils 3 bis 10 Leerschnitte pro Patient verfügbar. Die Paraffin-fixierten Gewebeblöcke der Patienten aus Ulm wurden mit dem Mikrotom in 3-4 µm Dicke geschnitten, auf Objektträger fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Verifizierung des Färbedurchgangs wurden Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Humanes Hodengewebe färbt sich physiologisch mit den verwendeten Anti-CT-Antikörpern an und diente deshalb als Positivkontrolle. Die Negativkontrollen bestanden aus humaner Schleimhaut (Zunge) und gesundem Speicheldrüsengewebe (Glandula parotis).

Zur Analyse der tumorspezifischen Antigene wurden die folgenden, kommerziell erworbenen Antikörper verwendet: Antikörper gegen pan-MAGE (Klon M3H67), MAGE-A1 (Klon MA454), NY-ESO-1 (Klon E978), MAGE-C1 (Klon CT7-33) und MAGE-C2 (Klon CT10).

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien alphabetisch geordnet aufgelistet:

1. Alkoholreihe (2x100%-, 95%-, 75%-, 50%-Propanol): Verdünnungen mit 2-Propanol, 20842.330, VWR International S.A.S., Fontenay-Sous-Bois, France
2. Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako® North America Inc., USA, S3022
3. Antikörper gegen pan-MAGE (Klon M3H67), MAGE-A1 (Klon MA454), NY-ESO-1 (Klon E978), MAGE-C1 (Klon CT7-33) und MAGE-C2 (Klon CT10): Monoclonal antibody core facility at Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), New York
4. Dako® Pen, Dako® Denmark, S2002
5. Dampfgarer MultiGourmet®, Braun®, Germany
6. EDTA-Puffer (1molar, pH 8,0), Herstellung:
 - a. 0,37 g EDTA-Pulver (EDTA disodium salt dihydrate p.A., AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
 - b. 900 ml Aquadest.
 - c. Einstellung auf pH=8,0 mit Natriumhydroxid 1mol/l 1N (VWR International S.A.S., Fontenay-Sous-Bois, France)
 - d. Volumenauffüllung auf 1000 ml mit Aquadest.
7. EnVision+System-HRP (DAB) For Use With Mouse Primary Antibodies, Dako® North America Inc., USA , K4007
8. Mayer's Hematoxylin solution®, SIGMA MHS32-1L, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Germany
9. Menzel®-Gläser Superfrost Ultra Plus Objektträger, J4800AMNZ
10. Menzel®-Gläser Deckgläser, 24×50 mm, # 1,5
11. Microscopy Aquatex, Merck® KGaA, Darmstadt, Germany, 1.08562.0050
12. Protein Block, Serum-Free, Ready-to-use, Dako® North America Inc., USA, X0909
13. TBS-Puffer:
 - a. 60,5 g Tris (tri-Sodim-citrate-dihydrate p.A., AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
 - b. 87,6 g Natriumchlorid (Sodium chloride, Sigma-Aldrich®Chemie GmbH, Steinheim, GmbH)

- c. 800 ml Aquadest.
 - d. Einstellung auf pH=7,5 mit Hydrochlorid (hydrochlorid acid #37%, VWR International S.A.S., Fontenay-Sous-Bois, France)
 - e. Volumenauffüllung auf 1000 ml mit Aquadest.
14. TBST-Puffer (0,1%, pH 7,5) aus 100 ml TBS-Puffer, 900 ml Aquadest. und 1 ml Tween®
15. Tween® 20 for molecular biology, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
16. Xylol: Xylenes, 33817-2,5l, Sigma-Aldrich®Chemie GmbH, Steinheim, Germany

2.4.2 Prinzip der Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Hier werden Antigene durch spezifische Antikörper im Gewebe detektiert und dargestellt. Durch eine Kopplung des verwendeten Antikörpers mit einem Detektionssystem können so bereits geringe Mengen an Antigenen im Präparat sichtbar gemacht werden. Ziel ist es, ein Signal am Ort des Antigens mit ausreichender Stärke zu visualisieren, um dieses auswerten zu können. Man unterscheidet hierbei die direkte von der indirekten Methode.

In der direkten Methode ist der primäre Antikörper direkt mit einem Enzym gekoppelt. Nach Zugabe eines Substrats oder Chromogens reagiert dieses mit dem Enzym unter Bildung eines Farbstoffs. Die Bindung des ersten Antikörpers macht das Antigen somit sichtbar.

Die indirekte Methode wird auch Zwei-Schritt-Methode genannt, denn der spezifische primäre Antikörper, der an das gesuchte Antigen bindet, ist unmarkiert, also nicht mit einem Enzym versehen. Die Färbung erfolgt erst in einem zweiten Schritt, bei dem ein zweiter, mit einem Enzym gekoppelter Antikörper (Sekundärantikörper) auf die Probe aufgebracht wird. Dieser bindet spezifisch an den ersten Antikörper. Durch eine Enzym-Substrat-Reaktion führt dies zur Farbdarstellung. Die indirekte IHC ist empfindlicher als die direkte Methode, da der Sekundärantikörper zur Signalverstärkung führt. In der vorliegenden Studie wurde das indirekte Verfahren angewandt. [76]

2.4.3 Färbeprotokoll

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung in einer Xylolreihe (Xylenes, Sigma-Aldrich®Chemie GmbH), bei der die Objektträger für je drei Minuten nacheinander in drei Gefäße mit Xylol gelegt wurden. Anschließend wurden die Schnitte zur Rehydrierung für je 1 Minute in einer absteigenden Alkoholreihe (Verdünnungen mit 2-Propanol, VWR International S.A.S.), bestehend aus 2 Behältern mit 100%igem Isopropanol, und je einem Behälter mit 95%-, 75%-, 50%igem Isopropanol, behandelt.

Die Präparate wurden zur Antigendemaskierung einer Hitzebehandlung, dem sog. „heat-induced epitope retrieval“ (HIER), unterzogen. Dies erfolgte in einem EDTA-Puffer (Ethylendiamintetraessigsäure, 1mM, pH 8,0) und für 20 Minuten in einem Dampfgarer (Multi Gourmet®, Braun®, Germany). Nach Abkühlung in einem Bad mit destilliertem Wasser (Aquadest.-Bad) wurden die Gewebestücke auf dem Objektträger mit Dako Pen (Dako® Denmark) umkreist, um ein Verlaufen der Substanzen zu verhindern. Danach erfolgte für einige Minuten ein Bad in TBST-Puffer (Tris-buffered-saline-tween, pH 7,5).

Für die nun folgende Behandlung wurde das „DakoEnVision + System HRP®(DAB) For Use With Mouse Primary Antibodies“ (Dako® North America Inc., USA) verwendet. Zunächst wurden die Schnitte fünf Minuten lang mit dem Peroxidase-Block inkubiert, um falsch positive Färbungen zu verhindern. Zwischen den folgenden Schritten erfolgte für jeweils fünf Minuten eine Waschung der Präparate in frischem TBST-Puffer. Nach dem Peroxidase-Block wurde für zehn Minuten ein Protein-Block (Dako® „Serum-free, Ready-To-Use“, Dako North America Inc., USA) angewendet, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Anschließend erfolgte das Aufbringen des primären Antikörpers, welcher mit Antibody Diluent (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako® North America Inc., USA) verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten.

Nach sorgfältiger Titrierung der Primärantikörper wurden folgenden Verdünnungen und Konzentrationen verwendet:

MAGE-A1 (Klon MA454) 1:150 → 22,00 µg/ml

NY-ESO-1 (Klon E978)	1:200 → 5,35 µg/ml
Pan-MAGE (Klon M3H67)	1:1000 → 1,300 µg/ml
MAGE-C1 (Klon CT7-33)	1:1800 → 1,275 µg/ml
MAGE-C2 (Klon CT10)	1:1500 → 2,465 µg/ml

Nach zweimaliger Waschung in TBST-Puffer für je fünf Minuten wurde der sekundäre Antikörper für weitere 30 Minuten auf die Präparate aufgebracht. Das am Sekundärantikörper gekoppelte Enzym, eine Horseradish Peroxidase (HRP), katalysierte die Konversion von DAB in ein braunes Farbprodukt. Nach einem frischen TBST-Pufferbad (fünf Minuten) wurde das DAB-Chromogen (Dako® North America, Inc., USA) für zehn bis fünfzehn Minuten aufgetragen (DAB = Diaminobenzidin, Herstellung aus 1 ml Substratpuffer und 1 Tropfen DAB-Chromogen).

Nach erneuter gründlicher Spülung mit Aquadest. erfolgte für ein bis zwei Minuten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Mayer's®Hematoxylin Solution, Sigma-Aldrich®, Chemie, GmbH, Steinheim, Germany), um spezifische Zellstrukturen wie die Zellkerne darzustellen. Im Anschluss wurden die Objektträger für zehn Minuten mit Leitungswasser gespült. Im letzten Schritt erfolgte die Fixierung mit zwei Tropfen Aquatex (MERCK®, KGaA, Darmstadt, Germany) und Deckgläsern (Menzel®Superfrost Ultra Plus).

2.4.4 Etablierung

Zu Beginn wurde das Färbeprotokoll mit den Antikörpern an Positivkontrollen (Hodengewebe), Negativkontrollen (Parotisgewebe und Mundschleimhaut) sowie Probetumorschnitten etabliert und die optimalen Antikörper-Konzentrationen wurden titriert. Es wurde das oben im Text beschriebene Färbeprotokoll verwendet, wobei nachfolgend beschriebene Unterschiede bestanden.

So wurde die Antigendemaskierung bei NY-ESO-1 zunächst in einem Citratpuffer-Bad, pH = 6, durchgeführt. Aufgrund mäßiger Ergebnisse wurde NY-ESO-1 versuchsweise im EDTA-Puffer (pH = 8) behandelt. Dies erzielte bessere Ergebnisse, weshalb dieser Puffer im Weiteren bei allen Antikörpern verwendet wurde.

Initial wurde zur Hitzebehandlung ein Autoklav (120°C für 1 Stunde) verwendet. Dieses Verfahren wurde jedoch durch einen Dampfgerar (s.o.) ersetzt, da sich hierdurch die Bindung des Primärantikörpers an die Antigene verbesserte. Folglich konnte die unspezifische Hintergrundfärbung verringert werden.

Das Problem der diffusen Hintergrundfärbung konnte mit dem Protein-Block noch weiter verbessert werden.

Die primären Antikörper wurden in definierten Konzentration geliefert (MAGE-A1: 1:150 → 22 µg/ml, NY-ESO-1: 1:50 → 21,4 µg/ml, pan-MAGE: 1:1350 → 1,8 µg/ml, MAGE-C1: 1:450 → 5,1 µg/ml, MAGE-C2: 1:750 → 4,93 µg/ml). Es wurden verschiedene Verdünnungen getestet und eine optimale Verdünnung für jeden Antikörper titriert.

Die Etablierung des Antikörpers gegen NY-ESO-1 stellte sich aufgrund diffuser und unspezifischer Färbungen als besonders schwierig heraus. Deshalb wurde dieser Antikörper versuchsweise über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dies ergab jedoch eine zu starke, unspezifische Färbung, sodass man wieder zur 30-Minuten-Inkubation zurückkehrte. Anfangs wurde der NY-ESO-1-Antikörper nur einmal für fünf Minuten im TBST-Bad belassen. Dies wurde jedoch auf zweimal fünf Minuten erhöht. Dadurch wurde der Objektträger noch präziser gewaschen und die Hintergrundfärbung konnte weiter reduziert werden. Außerdem wurde nach Auftragen des DAB-Chromogens auf eine sehr gründliche Waschung im Aquadest.-Bad geachtet.

2.4.5 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die Ergebnisse der IHC wurden unter dem Mikroskop (Zeiss, Seriennummer 3833000530) beurteilt. Dabei wurden unterschiedliche Vergrößerungen, hauptsächlich aber die 10-fache und 20-fache Vergrößerung zur Übersicht und die 40-fache Vergrößerung zur Detailansicht, verwendet. Mithilfe von AxioVision wurden Photographien der mikroskopischen Darstellung angefertigt. Zur Bearbeitung der Fotos wurde PhotoScape X Version 2.3 verwendet.

Zur Bestimmung der zytoplasmatischen und nukleären Expressionen der Antigene wurde ein etabliertes Auswertungssystem verwendet [66,114]. Dazu wurden zunächst der prozentuale Anteil der angefärbten Tumorzellen (IHC-%) und die Färbintensität (IHC-Intensität) mikroskopisch beurteilt. Die Intensitäten wurden mit 0 für negativ, 1+ für schwach, 2+ für mäßig und 3+ für stark positiv angegeben. Aus IHC-Intensität und IHC-% konnte schließlich ein Endresultat (IHC-Ergebnis) ermittelt werden. Negativ waren alle Schnitte, bei denen weniger oder gleich 10% der Tumorzellen angefärbt wurden und welche zusätzlich eine Färbintensität von 0 oder 1+ aufwiesen. Schwach positiv waren solche mit >10% bzw. ≤ 70% angefärbten Tumorzellen und einer Färbintensität von 1+ oder mit ≤ 30% und 2+. Von mäßig positiven Schnitten sprach man entweder bei > 70% Tumorzellanfärbung und einer Farbintensität von 1+ oder > 30 bzw. ≤ 70% und 2+ oder ≤ 30% und 3+. Stark angefärbt waren solche mit > 70% Tumorzellanfärbung und einer 2+-Farbintensität, oder > 30% und 3+ (Tabelle 3).

Tabelle 3: Immunhistochemische Bewertung der MAGE (Melanoma-associated antigen)-Expression nach negativ (keine Expression), schwach, mäßig und stark positiv angefärbt; IHC = Immunhistochemie, IHC-% = Anteil der angefärbten Tumorzellen, IHC-Intensität = Färbintensität der Schnitte

IHC-Ergebnis	IHC-Intensität	IHC-% [%]
negativ	0, 1+	≤ 10
schwach positiv	1+	> 10 bis ≤ 70
	2+	≤ 30
mäßig positiv	1+	> 70
	2+	> 30 bis ≤ 70
	3+	≤ 30
stark positiv	2+	> 70
	3+	> 30

2.5 Statistische Auswertung

Die Auswertungen der anonymisierten Daten und statistische sowie graphische Analysen wurden mit IBM® SPSS® Statistics Version 21 erstellt.

Es wird zunächst eine Nullhypothese H_0 aufgestellt, welche davon ausgeht, dass kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht. Diese kann im Rahmen statistischer Tests abgelehnt oder beibehalten werden. Wird die H_0 -Hypothese abgelehnt, greift die Alternativhypothese H_1 , welche besagt, dass ein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht. Dafür wird ein Signifikanzniveau ermittelt, welches die Grenzwahrscheinlichkeit, ab der man nicht mehr an den Zufall glaubt, angibt. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit, auch p-Wert, Signifikanz oder Irrtumswahrscheinlichkeit genannt, ist die errechnete Wahrscheinlichkeit der gewonnenen Daten, die rein zufällig unter der Nullhypothese entstanden sind. Man spricht von einem signifikanten Test, wenn der p-Wert kleiner oder gleich dem gewählten Signifikanzniveau ist, und somit H_0 abgelehnt wird. In dieser Studie wurden die statistischen Tests zweiseitig durchgeführt und es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

Überlebenszeitanalysen wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Dabei wurden Korrelationen der Variablen mit Überlebenszeiten mit dem Logrank-Test und dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson untersucht. Zum Vergleich mehrerer Variablen wurde die Cox-Regression verwendet. Für Patienten dieser Studie wurden mediane Lebenszeiten ermittelt. Das Eintreten des Todes aufgrund des Tumors ist im Diagramm als eine Stufe dargestellt.

Unter zensierten Daten versteht man Patienten, die aus unterschiedlichen Gründen in der Beobachtung verloren gegangen sind („lost to follow-up“) und deren Status „lebend“ oder „verstorben“ nicht klar ist.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

3.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das mediane Alter aller Patienten ($n = 84$) bei Erstdiagnose eines ACCs lag bei 54 Jahren. Der weibliche Anteil betrug mit 52,4% ($44/84$) etwas mehr als der männliche Anteil mit 47,6% ($40/84$). Die Verteilung innerhalb der Geschlechtergruppen war ähnlich, denn das mediane Alter der Männer betrug 55 Jahre, das der Frauen 53,5 Jahre. Der jüngste Patient war 24 Jahre und der älteste 88 Jahre alt (Abbildung 1). 38,1% ($32/84$) waren jünger oder gleich 50 Jahre alt, 61,9% ($52/84$) waren älter als 50 Jahre.

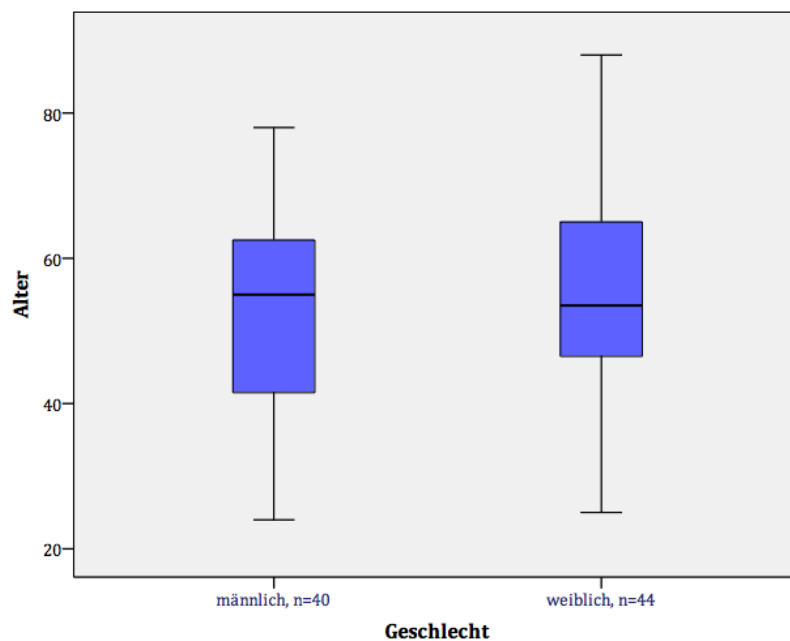


Abbildung 1: Altersverteilung der Patienten mit Erstdiagnose eines adenoidzystischen Karzinoms (ACC) des Kopf-Hals-Bereichs in Abhängigkeit vom Geschlecht; Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum 1984 bis 2014, die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, Linie in der Box = Median, Länge der Box = Interquartilsabstand (Streuungsmaß), unteres Whisker = Minimum, oberes Whisker = Maximum; n = Anzahl der Patienten

3.1.2 Ursprungsorte des Primärtumors

In 45,2% (38/84) der Fälle wurde das ACC in den großen Speicheldrüsen Glandula parotis, GSM oder GSL diagnostiziert. Kleine Speicheldrüsen an Gaumen, Mundboden, Zunge, NNH oder allgemein im Kopf-Hals-Bereich machten 54,8% (46/84) aus.

Abbildung 2 veranschaulicht die Ursprungsorte des Tumors bei Erstdiagnose. Der häufigste Prädilektionsort lag mit 31,0% (26/84) in der Glandula parotis. Dem folgten mit 21,4% (18/84) die NNH, und mit 10,7% (9/84) die GSM. Andere primäre Lokalisationen des ACC waren die kleinen Speicheldrüsen des Gaumens ($8/84 = 9,5\%$), des Mundbodens ($4/84 = 4,8\%$), der Zunge und die GSL (jeweils $3/84 = 3,6\%$). Befallene Stellen im Kopf-Hals-Bereich, wie beispielsweise Nasenabhang, Gehörgang oder Tränendrüse, wurden unter „andere“ zusammengefasst und machten insgesamt 15,5% (13/84) aus.

Zur Vereinfachung der statistischen Berechnungen wurden die großen Speicheldrüsen zu einer Gruppe mit 38 Patienten ($38/84 = 45,2\%$) und die Tumore aller anderen Orte zu einer weiteren Gruppe („extraglandulär“) mit 46 Patienten ($46/84 = 54,8\%$) zusammengefasst.

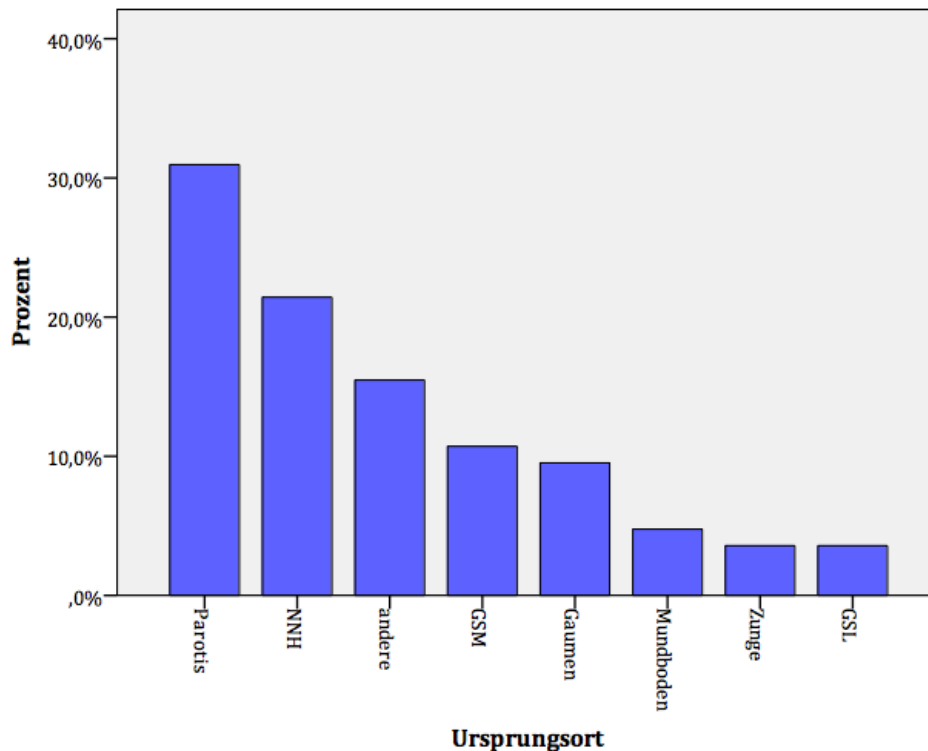


Abbildung 2: Verteilung der Ursprungsorte des Primärtumors von Patienten mit der Erstdiagnose eines adenoidzystischen Karzinoms (ACC) des Kopf-Hals-Bereichs. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. GSM = Glandula submandibularis, NNH = Nasennebenhöhlen, GSL = Glandula sublingualis

3.1.3 TNM-Klassifikation

Bei Erstdiagnose wurden in dieser Patientenkohorte folgende pathologische T-Stadien diagnostiziert: pT1 in 14 Fällen ($14/71 = 19,7\%$), pT2 in 15 Fällen ($15/71 = 21,1\%$), pT3 in 12 Fällen ($12/71 = 16,9\%$) und mit 30 Fällen am häufigsten pT4 ($30/71 = 42,3\%$, Tabelle 4).

Obwohl das ACC im Gegensatz zu den meisten Kopf-Hals-Tumoren bevorzugt hämatogen metastasiert, ist der Lymphknotenstatus für das chirurgische Staging von besonderem Interesse. Nach ND und Diagnostik des Lymphknotenstatus in der Pathologie ergab sich folgende Verteilung. Der Großteil der Patienten – 80,0% (56/70) – wies

keine Lymphknotenmetastasen (pN0) auf. In 8 Fällen (8/70 = 11,4%) konnte der Befall eines Halslymphknotens (pN1) und in 6 Fällen (6/70 = 8,6%) der Befall mehrerer Halslymphknoten (pN2) nachgewiesen werden. Zusammengefasst zeigte sich somit eine zervikale Lymphknotenmetastasierungsrate von 20,0% (14/70, Tabelle 4).

Der Status der Fernmetastasen wurde klinisch eingeteilt. Bei Erstdiagnose wiesen 95,6% (65/68) der Patienten keine Fernmetastasen auf. Bei nur 4,4% (3/68) wurden Fernmetastasen diagnostiziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verteilung der TNM-Stadien bei Erstdiagnose eines adenoidzystischen Karzinoms des Kopf-Hals-Bereichs der Universitätskliniken Ulm, Köln, Pittsburgh von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl der vollständigen Datensätze variiert zwischen 68 und 71. pT = Größe und Ausdehnung des Primärtumors, pN = regionaler Lymphknotenstatus, cM = Fernmetastasen, p = pathologisch bestimmt, c = klinisch bestimmt

T-Stadien	Prozent	Häufigkeit
pT1	19,7	14/71
pT2	21,1	15/71
pT3	16,9	12/71
pT4	42,3	30/71
N-Stadien	Prozent	Häufigkeit
pN0	80,0	56/70
pN1	11,4	8/70
pN2	8,6	6/70
M-Stadien	Prozent	Häufigkeit
cM0	95,6	65/68
cM1	4,4	3/68

3.1.4 Besondere Eigenschaften des Tumors

Die Neigung des ACCs zur perineuralen Invasion spiegelte sich in dieser Arbeit wider, denn in 70,0% (42/60) infiltrierte das ACC das perineurale Gewebe. In 30,0% (18/60) lag kein Wachstum entlang von Nerven vor (Tabelle 5).

Die Tumore wiesen histologisch am häufigsten, mit 36,9% (31/84), den tubulären Typ auf. Dem folgte mit 23,8% (20/84) der cribriforme Wachstumstyp und mit 20,2% (17/84) die solide Form. Der gemischte Typ aus solider, tubulärer und cribriformer Komponente lag in 16 von 84 Fällen (19,0%) vor (Tabelle 5).

3.1.5 Therapie

Wie bereits erläutert, besteht die Standard-Primärtherapie des ACCs aus der radikalen chirurgischen Resektion des Karzinoms (siehe 1.1.5 Therapie). Je nach Befundlage wird eine postoperative Bestrahlung durchgeführt. 81,5% (66/81) der Patienten wurden operiert und anschließend bestrahlt. 18,5% (15/81) wurden ausschließlich operiert (Tabelle 5).

Die chirurgischen bzw. histopathologischen Resektionsränder sind zur Abschätzung der Prognose und zur Planung der weiteren Therapie von großer Bedeutung. Das chirurgische Präparat wird an den Schnitträndern markiert, um die genaue anatomische Zuordnung zu gewährleisten. Danach werden die Resektionsränder im histologischen Schnitt identifiziert. So kann im Bedarfsfall, wenn technisch möglich, nachreseziert werden. In 50,0% (37/74) der Fälle waren die Resektionsränder negativ, es lag also eine R0-Resektion vor. In exakt gleich vielen Fällen (37/74 = 50,0%) bestanden positive Resektionsränder (R+). Davon lagen in 48,6% (36/74) mikroskopisch, histopathologisch positive Resektionsränder (R1) und in einem Fall (1/74 = 1,4%) makroskopisch positive Absetzungsränder (R2) vor (Tabelle 5).

3.1.6 Tumorprogression und Überlebenszeiten

Betroffene Patienten werden nach Abschluss der Primärtherapie einer engmaschigen Nachsorge unterzogen, um das Auftreten von Rezidiven oder Fernmetastasen frühzeitig zu erkennen. Bei Tumorfreiheit spricht man von kompletter Remission. Eine

Progression beschreibt jegliches Fortschreiten der Erkrankung, gemessen vom Zeitpunkt nach OP bis zum Beginn der Progression oder dem Todeszeitpunkt des Patienten (unabhängig von der Todesursache). Unter Progression zählen Rezidive, Größenwachstum und Metastasen. Dabei ist das Fortschreiten an sich gemeint, das heißt der Patient muss nach der OP nicht unbedingt tumorfrei gewesen sein.

In statistischen Auswertungen wird die Zeit des Nicht-Fortschreitens als progressionsfreie Überlebenszeit (progression free survival, PFS) in Monaten oder Wochen angegeben.

Die Gesamtüberlebenszeit (overall survival, OS) beschreibt den Zeitraum zwischen Erstdiagnose bis zum Versterben des Patienten. In dieser Studie wurden alle Patienten, die an den Folgen des ACCs starben, unter „Tod“ kodiert.

Andere Todesursachen wurden als „lost to follow-up“ eingestuft und der Patient wurde in der Statistik zensiert. Im Folgenden sollen die eben erläuterten Begriffe in Bezug auf diese Arbeit dargestellt werden.

Progression

In diesem Patientenkollektiv schritt die Tumorerkrankung in 54,9% (45/82) im weiteren Krankheitsverlauf fort. Bei 40,2% (33/82) der Patienten blieb der Zustand stabil ohne Hinweis auf Tumorprogress oder Rezidiv (Tabelle 5). Die mediane Zeit vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Auftreten der ersten Progression betrug 26,5 Monate.

24 Patienten (24/46 = 52,2%) erlitten im Krankheitsverlauf Fernmetastasen, 22 Patienten (22/46 = 47,8%) lokoregionäre Metastasen. Pulmonale Tumorabsiedlungen traten bei 12 Patienten (12/17 = 70,6%) auf, Metastasen im knöchernen Skelett bei 3 Patienten (3/17 = 17,6%) und zerebrale Metastasen bildeten sich bei 2 Patienten (2/17 = 11,8%, Tabelle 5). Die mediane Zeit vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Auftreten von Fernmetastasen betrug 35,8 Monate.

Tabelle 5: Eigenschaften, Therapie und deren Häufigkeiten der Patientenkohorte einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des adenoidzystischen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl der vollständigen Datensätze variiert zwischen 60 und 84. GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als GSD, R0 = negative Resektionsränder, R+ = positive Resektionsränder, OS = Gesamtüberleben, PFS = progressionsfreies Überleben

Eigenschaft/Variable		Häufigkeiten (Prozente [%])
Ort des Primärtumors	GSD	38/84 (45,2)
	AND	46/84 (54,8)
Perineurale Invasion	Nein	18/60 (30,0)
	Ja	42/60 (70,0)
Wachstumsmuster	Tubulär	31/84 (36,9)
	Cribriform	20/84 (23,8)
	Solide	17/84 (20,2)
	Gemischt	16/84 (19,0)
Therapie	Operation	15/81 (18,5)
	Operation+	66/81 (81,5)
	Radiatio	
Status der Resektionsränder	R0	37/74 (50,0)
	R+	37/74 (50,0)
	R1	36/74 (48,6)
	R2	1/74 (1,4)
Progression	Ja	45/82 (54,9)
	Nein	33/82 (40,2)
Ort der Progression	Lokoregionär	22/46 (47,8)
	Fern	24/46 (52,2)
Ort der Fernmetastasen	Pulmonal	12/17 (70,6)
	Knöchern	3/17 (17,6)
	Zerebral	2/17 (11,8)

Progressionsfreies Überleben (PFS)

Unter 76 Patienten dieser Kohorte betrug das mediane PFS 36,1 Monate, wobei die Zeiten zwischen 0,25 Monaten und 323 Monaten variierten.

Gesamtüberleben (OS)

Zur Analyse des Gesamtüberlebens standen Daten von 82 Patienten zur Verfügung. Das mediane OS lag hier bei 82,3 Monaten. Die dokumentierten Überlebenszeiten rangierten zwischen 0,25 Monaten und 323 Monate.

41,5% (34/82) der Patienten, die von 1984 bis 2014 beobachtet wurden, verstarben an den Folgen des ACCs. 58,5% (48/82) überlebten den untersuchten Zeitraum oder sie wurden der Rubrik „Lost to follow-up“ zugeordnet, da eine aktuelle Verlaufskontrolle nicht möglich war.

Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten

In dieser Studie betrugen die Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten nach 5 Jahren 59,8% (49/82), nach 10 Jahren 31,8% (26/82) und nach 15 Jahren 20,7% (17/82).

3.1.7 Prognostische Marker

Prognostische Marker geben wichtige Hinweise für den Verlauf der Erkrankung, für das PFS und das OS. Im Rahmen dieser Studie wurden klinische Daten untereinander und mit Überlebenszeiten korreliert. Die Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt werden. Einen Überblick geben Tabellen 6 und 7.

Korrelation klinischer Daten mit Überlebenszeiten

Eine *perineurale Invasion* (Pn1) erwies sich als ein signifikant prognostischer Faktor für Überlebenszeiten. Das mediane OS betrug bei Pn1-Patienten 130,8 Monate, wobei Patienten mit Pn0-Tumoren das mediane OS nicht erreichten ($p = 0,025$, $n = 60$, Abbildung 3-A, Tabelle 6). Das mediane PFS betrug bei perineuraler Invasion 42 Monate, bei fehlender perineuraler Invasion jedoch 267,3 Monate. Die Unterschiede wurden mit einer Signifikanz von 0,039 ($n = 56$) statistisch belegt werden (Abbildung 3-B, Tabelle 6).

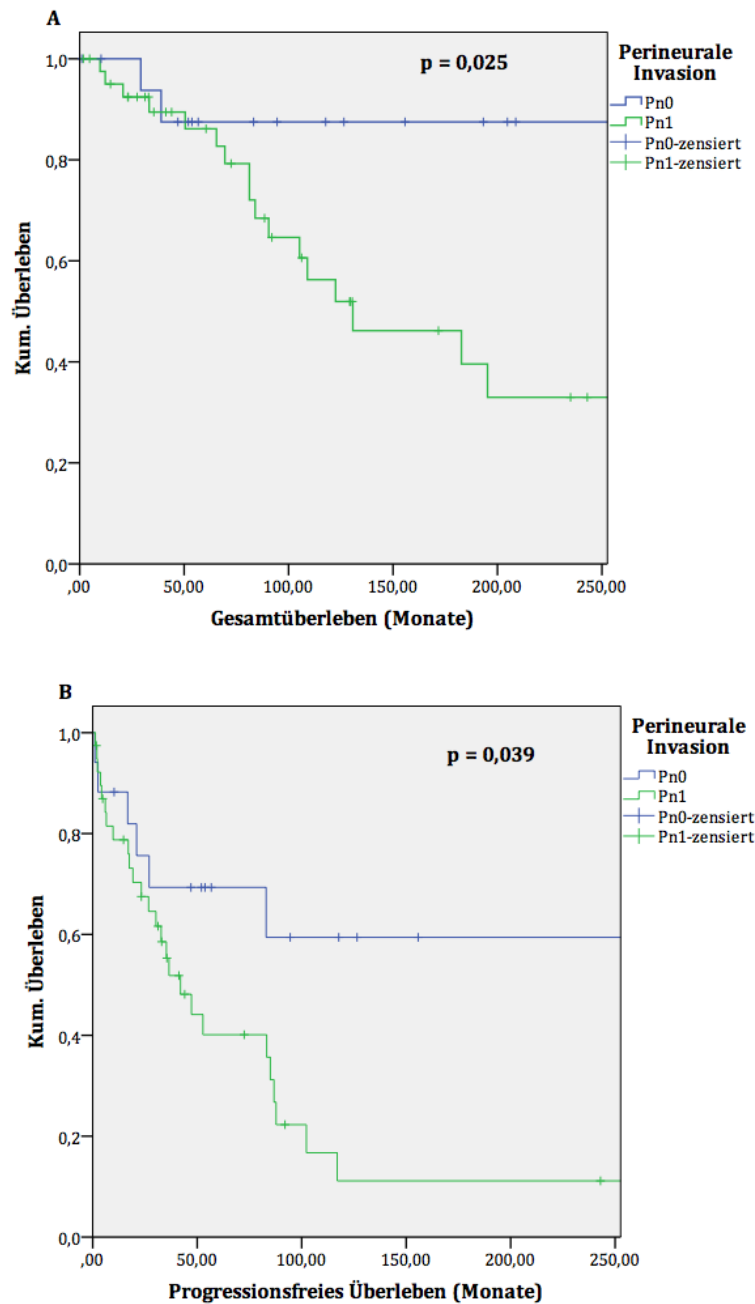


Abbildung 3: Analyse des Gesamtüberlebens (A) und des progressionsfreien Überlebens (B) bei perineuraler Invasion, Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des adenoidzystischen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84; die Anzahl der vollständigen Datensätze ergibt für (A) 60 und für (B) 56. Eine perineurale Invasion wirkte sich prognostisch ungünstig auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben aus. Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion, p = Signifikanz

Positive Tumorresektionsränder (R+) nach chirurgischer Therapie beeinflussten das Gesamtüberleben signifikant ($p = 0,028$, $n = 74$), denn Patienten mit dem Nachweis von Tumor in Resektionsrändern zeigten ein medianes OS von 105,3 Monaten, solche mit negativen Resektionsrändern (R0) erreichten es nicht (Abbildung 4, Tabelle 6). Patienten mit R+ wiesen einen Trend zu kürzerem progressionsfreien Überleben, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,103$, $n = 68$). Das mediane PFS für R0 lag bei 85,0 Monaten, das für R+ bei 39,5 Monaten (Tabelle 6).

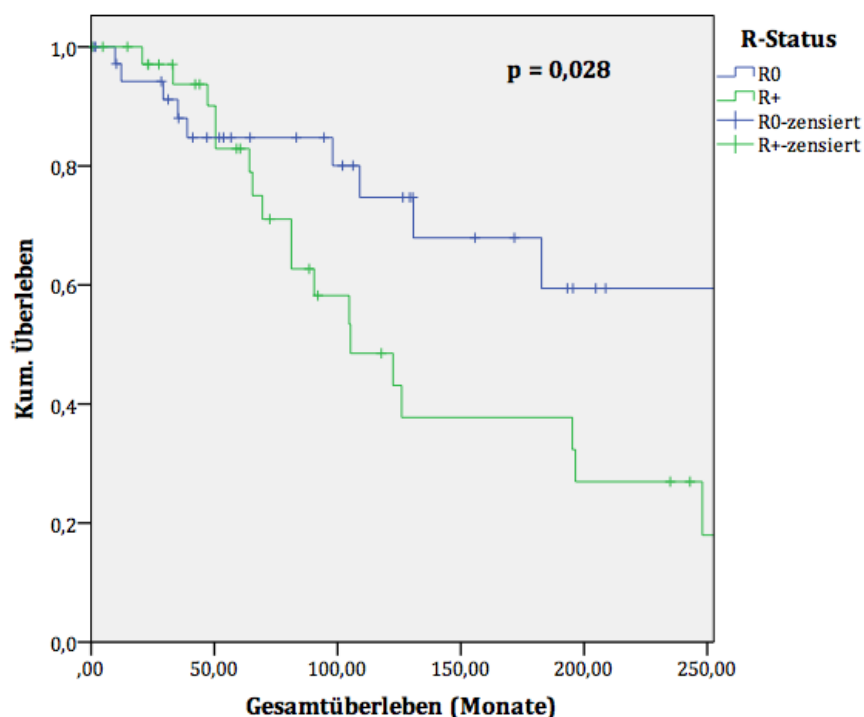


Abbildung 4: Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC) mit positiven oder negativen Resektionsrändern (R-Status) nach chirurgischer Therapie. Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84; die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 74. Ein positiver Resektionsstatus nach chirurgischer Entfernung des Tumors wirkte sich ungünstig auf das Gesamtüberleben aus. R+ = positiver Resektionsrand (Tumor im Randbereich nachweisbar), R0 = negativer Resektionsrand (kein Tumor nachweisbar), p = Signifikanz

Das Gesamtüberleben von Patienten mit Primärtumoren an verschiedenen Lokalisationen im Kopf-Hals-Bereich unterschied sich in Bezug auf den *Ort des Primärtumors* mit $p = 0,047$ signifikant ($n = 82$). So zeigten Patienten mit „extraglandulären“ Tumoren (d.h. Tumoren, welche nicht von den großen Speicheldrüsen ausgingen) ein reduziertes medianes OS von 122,5 Monaten, wohingegen Patienten mit Tumoren in großen Speicheldrüsen längere Überlebenszeiten aufwiesen; das mediane OS wurde dabei nicht erreicht (Abbildung 5, Tabelle 6). Es zeigte sich kein signifikanter Trend im PFS ($p = 0,301$, $n = 76$), obwohl das mediane PFS beim Befall großer Speicheldrüsen 83,3 Monate betrug und bei „extraglandulärem“ Befall 42,0 Monate (Tabelle 6).

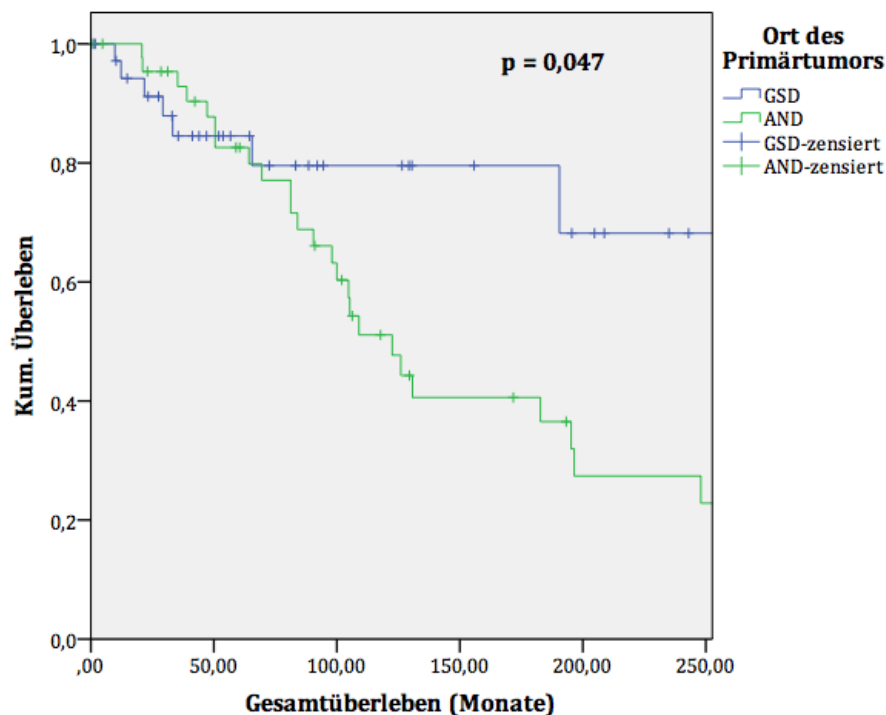


Abbildung 5: Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit unterschiedlichen Lokalisationen des Primärtumors eines adenoidzystischen Karzinoms (ACC). Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Primärtumoren in den großen Speicheldrüsen waren prognostisch günstiger als Tumoren anderer Lokalisation. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 82. GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als große Speicheldrüsen, p = Signifikanz

Ein positiver pathologisch gesicherter *Lymphknotenstatus* (pN+) war mit kürzerem Überleben (medianes OS nicht erreicht) assoziiert als ein negativer Lymphknotenstatus (pN0, medianes OS nicht erreicht, Abbildung 6, Tabelle 6) und erwies sich somit als ein prognostisch ungünstiger Faktor ($p = 0,008$, $n = 34$). Medianes PFS bei pN0 betrug 86,8 Monate, bei pN+ 30,3 Monate ($p = 0,287$, $n = 34$, Tabelle 6).

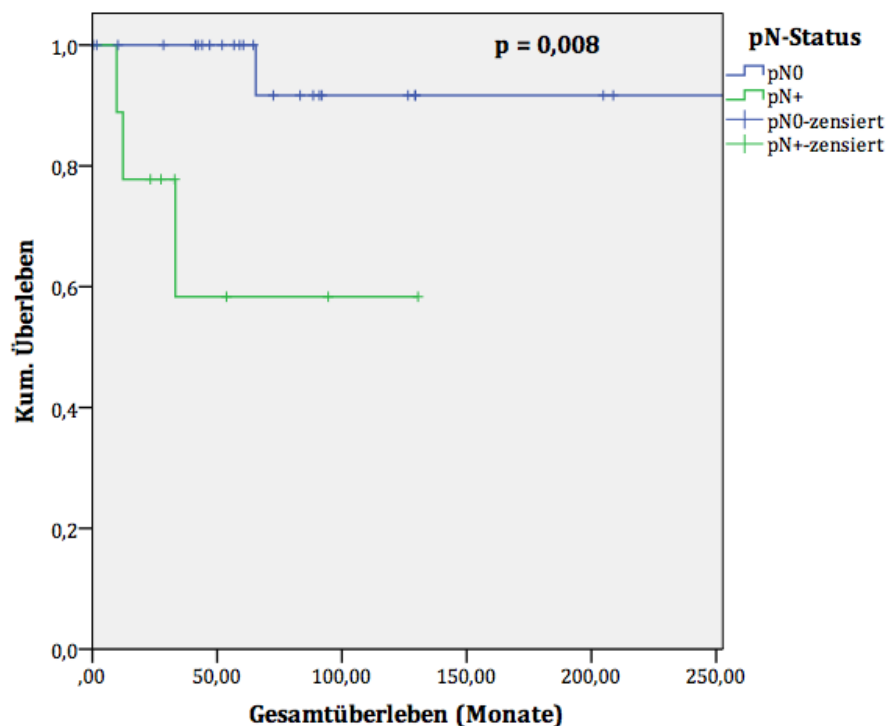


Abbildung 6: Analyse des Gesamtüberlebens bzgl. des Lymphknotenstatus (pN-Status) von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Eine Lymphknotenmetastasierung zeigte eine prognostisch ungünstige Tendenz für das Gesamtüberleben. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84; die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 34. pN0 = pathologisch gesicherter negativer Lymphknotenstatus, pN+ = pathologisch gesicherter positiver Lymphknotenstatus, p = Signifikanz

Das *histologische Wachstumsmuster* erwies sich als ein weiterer signifikanter Faktor ($p = 0,012$, $n = 82$), einhergehend mit einem geringeren medianen OS für ein solides Wachstumsmuster. Zur Auswertung wurden die drei Typen solide, tubulär und cribriform in die zwei Gruppen „solide“ ($16/82 = 19,5\%$) versus „nicht solide“ ($66/82 = 80,5\%$) eingeteilt. Das mediane OS betrug bei Tumoren mit soliden Wachstumsmustern 90,5 Monate im Gegensatz zu denen mit nicht solidem Muster 195,3 Monaten (Abbildung 7, Tabelle 6). Das mediane PFS verhielt sich bei einem solidem Muster mit 35,8 Monaten versus 76,0 Monaten bei nicht solidem Muster nicht signifikant ($p = 0,086$, $n = 76$, Tabelle 6).

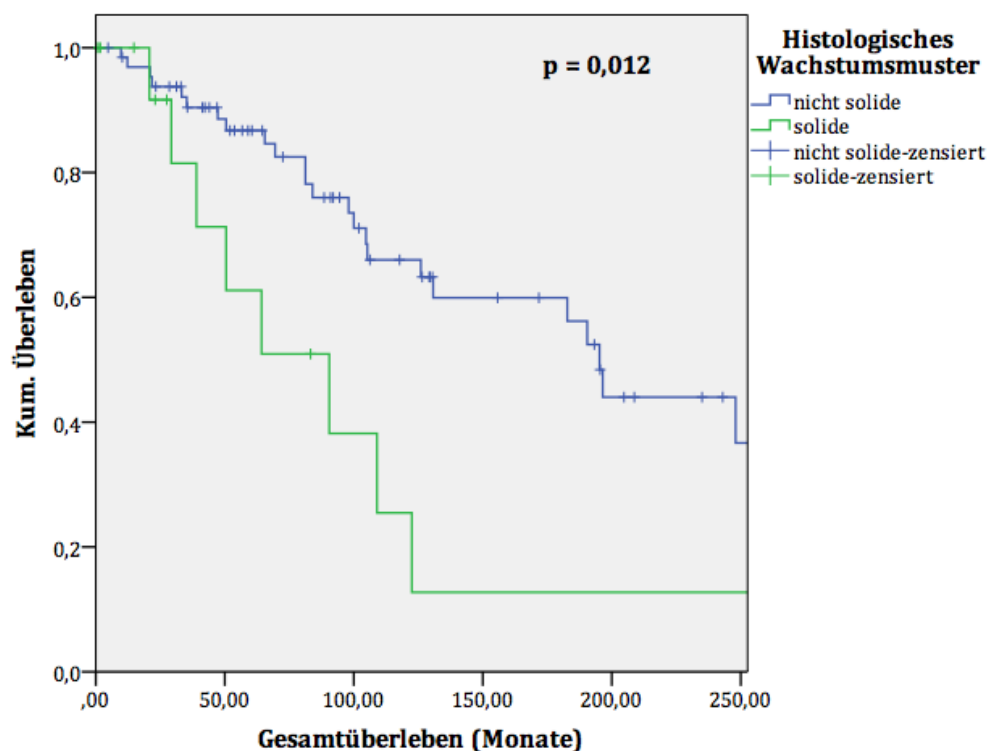


Abbildung 7: Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem histologisch in „solide“ und „nicht solide“ eingeteilten adenoidzystischen Karzinoms (ACC); Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84; die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 82. Ein solides Wachstumsmuster ist mit schlechterem Gesamtüberleben assoziiert. P = Signifikanz

Patienten mit einem ACC in *T3-* bzw. *T4-Stadien* wiesen mit 294,3 und 130,8 Monaten signifikant ($p = 0,044$, $n = 71$) eine geringere mediane Überlebenszeit auf als Patienten mit Tumoren in niedrigeren Stadien (medianes OS nicht erreicht, Abbildung 8-A, Tabelle 6).

Das mediane PFS war für Patienten mit T2-Tumor mit 83,0 Monaten länger als für Patienten mit T4-Tumor mit 35,8 Monaten ($p = 0,006$, $n = 67$, Abbildung 8-B, Tabelle 6).

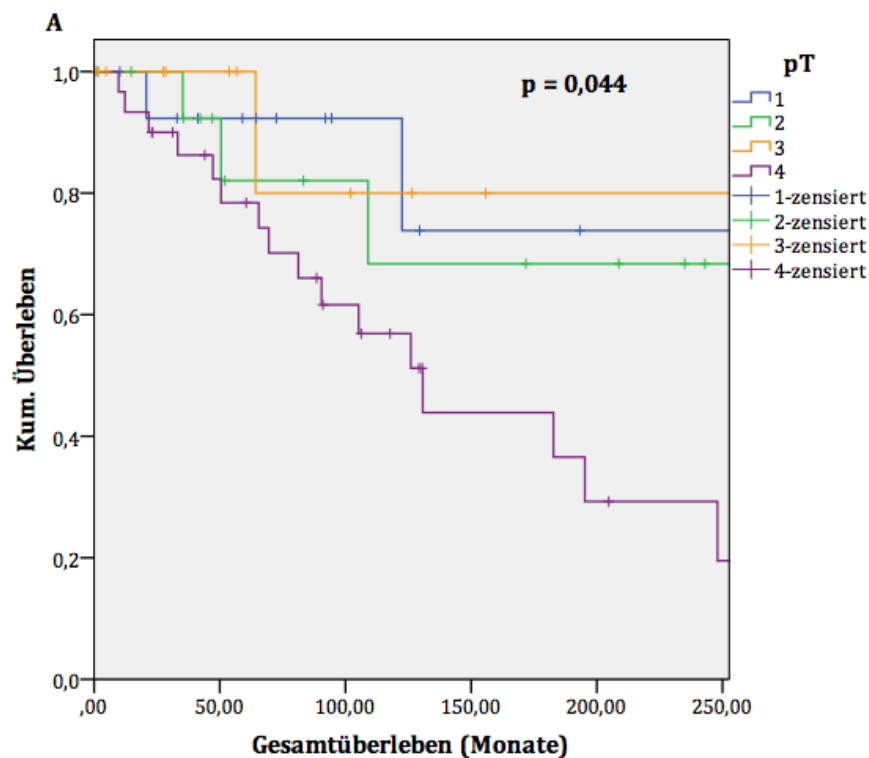


Abbildung 8-A: Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC) unterschiedlicher Tumorstadien. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt bei 71. Das Überleben für Patienten mit Tumoren im T4-Stadium ist signifikant kürzer als in niedrigeren Stadien. pT = pathologisch bestimmtes T-Stadium (= Größe und Ausdehnung des Tumors), p = Signifikanz

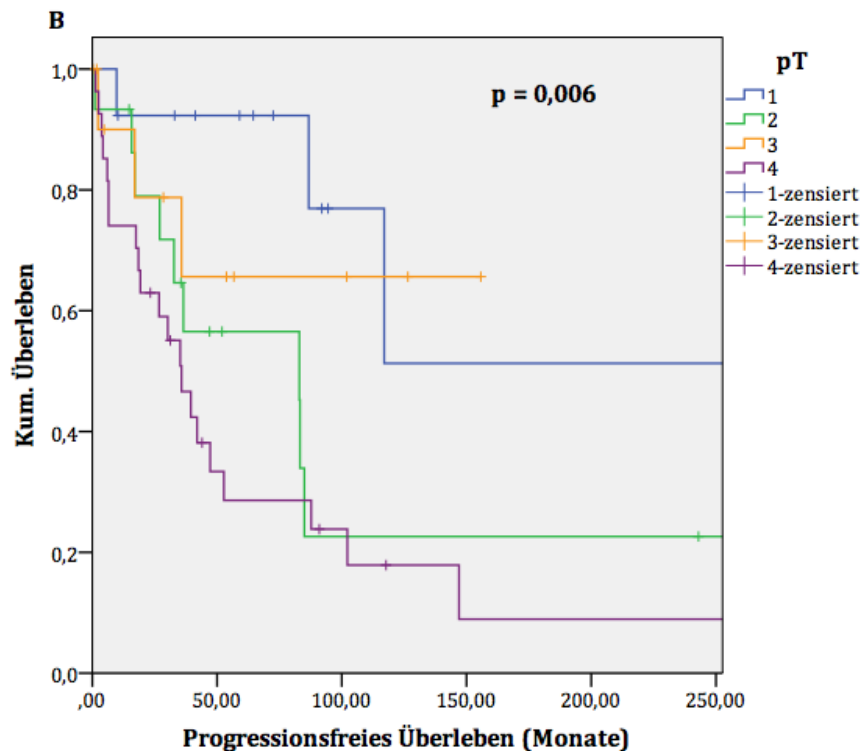


Abbildung 8-B: Analyse des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC) unterschiedlicher Tumorstadien. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 67. Das Überleben für Patienten mit Tumoren im T4-Stadium ist signifikant kürzer als in niedrigeren Stadien. pT = pathologisch bestimmtes T-Stadium (= Größe und Ausdehnung des Tumors), p = Signifikanz

Auch das Vorliegen von *Fernmetastasen bei Erstdiagnose* war signifikant mit einem niedrigeren medianen OS ($p = 0,002$, $n = 68$) und medianen PFS ($p < 0,0001$, $n = 64$) assoziiert. Bei Patienten mit Fernmetastasen betrug das mediane OS 12,3 Monate und das mediane PFS 8,8 Monate. Patienten, die bei Erstdiagnose keine Fernmetastasen aufwiesen, erzielten mit 248,0 Monaten ein wesentlich längeres medianes OS und erlitten erst später (medianes PFS = 11,8 Monate) einen Tumorprogress (Abbildung 9, Tabelle 6).

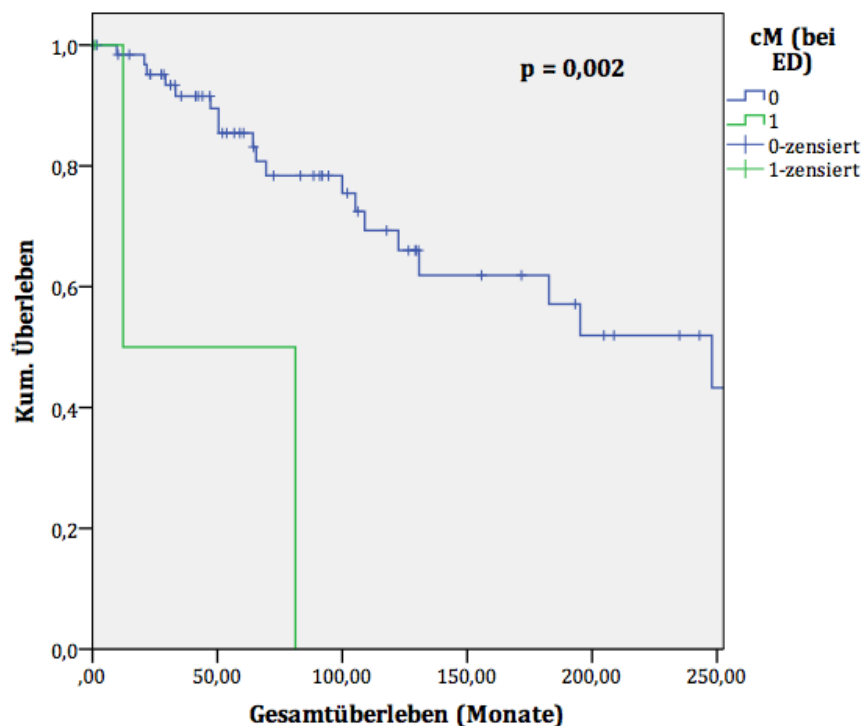


Abbildung 9: Analyse des Gesamtüberlebens bei Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC) mit oder ohne Fernmetastasen bei Erstdiagnose. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 68. Patienten mit Fernmetastasen bei Erstdiagnose zeigten ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben. P = Signifikanz, cM= klinisch bestimmter Status der Fernmetastasen, ED = Erstdiagnose

Patienten, die *im Krankheitsverlauf an Fernmetastasen* erkrankten, wiesen verglichen mit Patienten, die an einer *lokoregionären Tumorprogression* litten, mit 81,3 Monaten versus 195,3 Monaten ein signifikant kürzeres OS auf ($p = 0,003$, $n = 46$; Abbildung 10, Tabelle 6). Das mediane PFS ergab beim Vorliegen von Fernmetastasen versus lokoregionären Progressionen mit 21,0 versus 27,0 Monaten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,242$, $n = 45$, Tabelle 6).

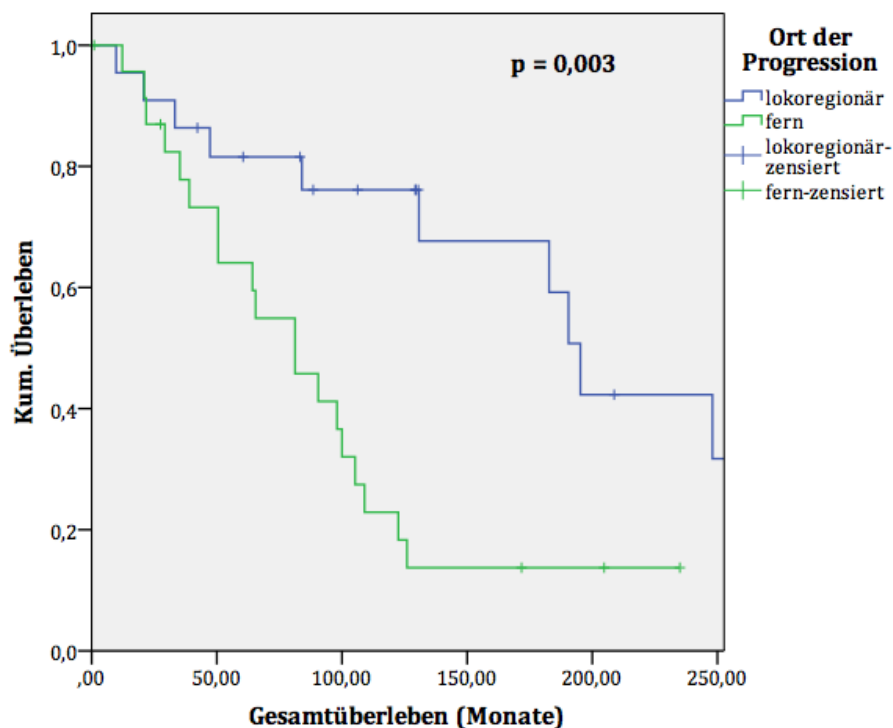


Abbildung 10: Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit einem lokoregionär rezidierten oder fern metastasierten adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 46. Patienten, die im Krankheitsverlauf an Fernmetastasen litten, lebten kürzer als solche mit lokoregionärer Tumorprogression. P = Signifikanz

Darüber hinaus stellten sich die *Lokalisationen der Fernmetastasen* als prognostisch relevant für das Gesamtüberleben heraus ($p = 0,020$, $n = 17$). Das mediane OS betrug bei pulmonalen Metastasen 100,0 Monate, bei knöchernen Metastasen 29,3 Monate und bei zerebralen Metastasen 21,8 Monate (Abbildung 11-A, Tabelle 6). Das mediane PFS zeigte ebenso signifikant nachweisbare Unterschiede auf ($p = 0,003$, $n = 17$). So betrug es bei pulmonalen Raumforderungen 35,8 Monate, bei zerebralen Raumforderungen 18,5 Monate und bei knöchernen Metastasen nunmehr 16,8 Monate (Abbildung 11-B, Tabelle 6).

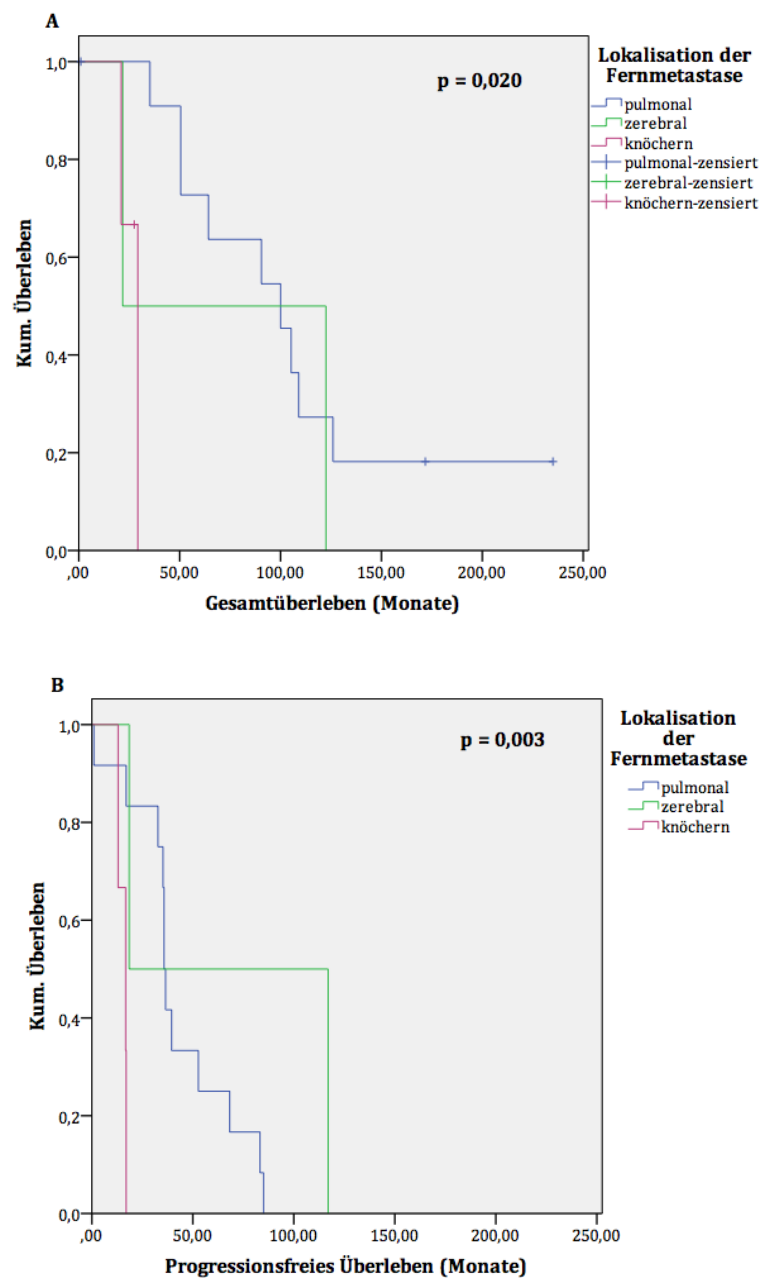


Abbildung 11: Analyse der Gesamt (A)- und progressionsfreien Überlebenszeit (B) von Patienten mit pulmonal, knöchern und zerebral fermetastasierten adenoidzystischen Karzinomen (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl des vollständigen Datensatzes ergibt 17. Patienten mit pulmonalen Fernmetastasen hatten ein etwas längeres progressionsfreies Überleben als zerebral oder knöchern metastasierte Karzinome. P = Signifikanz

Weiterhin wurde das *Alter* bezüglich prognostischer Wertigkeit untersucht. Dazu wurden die Probanden in zwei Gruppen, einmal ≤ 50 Jahre und einmal > 50 Jahre, aufgeteilt. Hier konnten jedoch statistisch keine Unterschiede im OS ($p = 0,485$, $n = 82$) und PFS ($p = 0,192$, $n = 76$) nachgewiesen werden. Ein gewisser Trend bestand dennoch, denn in der Altersgruppe ≤ 50 Jahre betrugen das mediane OS 248,0 Monate und das mediane PFS 85,0 Monate, wohingegen die Überlebenszeiten in der Altersgruppe > 50 Jahre dementsprechend mit 130,8 Monaten und 36,5 Monaten niedriger waren (Tabelle 6).

Das *Geschlecht* korrelierte nicht signifikant mit dem OS ($p = 0,448$, $n = 82$) und dem PFS ($p = 0,592$, $n = 76$). Das mediane OS betrug bei Männern 190,5 Monate und bei Frauen 182,8 Monate, das mediane PFS bei Männern 66,3 Monate und bei Frauen 68,3 Monate (Tabelle 6).

Tabelle 6: Analyse der medianen Gesamt- (OS) und progressionsfreien Überlebenszeiten (PFS) bezogen auf die klinischen Daten von Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84.

* = Auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (zweiseitig), - = Werte wurden nicht erreicht, p = Signifikanz, T1-T4 = Größe und Ausdehnung des Tumors, pN0 = pathologisch gesichert keine Lymphknotenmetastasen, pN+ = pathologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen, cM0 = keine Fernmetastasen bei Erstdiagnose eines ACCs (klinisch bestimmt), cM1 = klinisch bestimmte Fernmetastasen bei Erstdiagnose eines ACCs, Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion, R0 = negative Resektionsränder, R+ = positive Resektionsränder, GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als GSD

Variable	Medianes OS [Monate]	p (OS)	Medianes PFS [Monate]	p (PFS)
Geschlecht:				
Männlich	190,5	0,448	66,3	0,592
Weiblich	182,8		68,3	
Alter:				
≤ 50	248,0	0,485	85,0	0,192
> 50	130,8		36,5	
T1	-	0,044*	-	0,006*
T2	-		83,0	
T3	294,3		-	
T4	130,8		35,8	
pN0	-	0,008*	86,8	0,287
pN+	-		30,3	
cM0	248,0	0,002*	11,8	< 0,0001*
cM1	12,3		8,8	
Progression:				
Fernmetastasen	81,3	0,003*	21,0	0,242
Lokoregionär	195,3		27,0	
Fernmetastasen:				
Pulmonal	100,0	0,020*	35,8	0,003*
Zerebral	21,8		18,5	
Knöchern	29,3		16,8	

Fortsetzung der Tabelle 6 auf Seite 52.

Fortsetzung der Tabelle 6 von Seite 51.

Variable	Medianes OS [Monate]	p (OS)	Medianes PFS [Monate]	p (PFS)
Ort des Primärtumors:				
GSD	-	0,047*	83,3	0,301
AND	122,5		42,0	
OP	-	0,023*	83,0	0,259
OP+Radiato	109,0		52,8	
R0	-	0,028*	85,0	0,103
R+	105,3		39,5	
Pn0	130,8	0,025*	267,3	0,039*
Pn1	-		42,0	
Wachstumsmuster:				
Solide	90,5	0,012*	35,8	0,086
Nicht solide	195,3		76,0	

Kreuztabellen klinischer Daten

Neben der Festlegung der prognostischen Faktoren hinsichtlich Überlebenszeiten wurde zusätzlich deren Zusammenhang untersucht (Tabelle 7).

Bei Betrachtung der perineuralen Invasion stellte sich heraus, dass Patienten mit Pn1-Tumoren signifikant ($p < 0,0001$) häufiger, nämlich in 92,6% (25/27), positive Resektionsränder aufwiesen als Patienten mit Pn0-Tumoren (2/27 = 7,4%; Tabelle 7-1).

Tumoren in großen Speicheldrüsen konnten mit 59,5% (22/37) signifikant ($p = 0,036$) häufiger R0 reseziert werden als Tumoren in anderen als großen Speicheldrüsen (15/37 = 40,5%; Tabelle 7-1). Letztere wuchsen außerdem mit 54,8% (23/42) signifikant ($p = 0,020$) öfter perineural als Tumoren in großen Speicheldrüsen (19/42 = 45,2%; Tabelle 7-2).

Männliche Patienten neigten eher zu lokoregionären Metastasen ($14/22 = 63,6\%$) als weibliche Patientinnen ($8/22 = 36,4\%$), wobei sich dieser Zusammenhang nicht signifikant verhielt ($p = 0,351$; Tabelle 7-3).

Betrachtet man allerdings das Alter ≤ 50 Jahre versus > 50 Jahre, so fällt auf, dass Patienten jüngeren Alters signifikant ($p = 0,046$) seltener sowohl lokoregionäre Rezidive ($4/22 = 18,2\%$) als auch Fernmetastasen ($11/24 = 45,8\%$) ausbildeten als ältere Patienten, die in $81,8\%$ ($18/22$) an lokoregionärer Progression und in $54,2\%$ ($13/24$) an Fernmetastasen litten (Tabelle 7-3).

Ferner wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Ursprungsort des ACCs und Lokalisation der Progression gab (Tabelle 7-3). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren in großen Speicheldrüsen und Tumoren anderer Drüsen festgestellt werden ($p = 0,595$). Patienten, die an ACC in großen Speicheldrüsen erkrankten, erlitten sowohl weniger lokoregionäre ($9/22 = 40,9\%$) als auch weniger Fernmetastasen ($8/24 = 33,3\%$) als Patienten, welche ACC in anderen Drüsen aufwiesen ($13/22 = 59,1\%$ bzw. $16/24 = 66,7\%$).

Bei Unterteilung der Ursprungsorte fällt auf, dass sich lokoregionäre Progressionen am häufigsten in der Glandula parotis ($8/22 = 36,4\%$) bildeten. Der zweithäufigste Ort waren die NNH ($6/22 = 27,3\%$), welche außerdem mit dem Auftreten von Fernmetastasen assoziiert schienen ($6/24 = 25,0\%$). Diese Zusammenhänge verhielten sich jedoch nicht signifikant ($p = 0,347$).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den T-Stadien und einer Progression bestand in dieser Studie nicht ($p = 0,448$). Allerdings konnte eine Tendenz zu mehr Metastasierung in einem höheren Tumorstadium erkannt werden. So erkrankten Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren im T4-Stadium öfter an lokoregionären Metastasen ($14/20 = 70,0\%$) und an Fernmetastasen ($9/18 = 50,0\%$) als Patienten mit Tumoren niedrigerer Stadien (Tabelle 7-3).

Patienten mit R+-Status erhielten signifikant ($p = 0,042$) häufiger eine adjuvante Bestrahlung ($32/57 = 56,1\%$) als Patienten mit R0-Status ($25/57 = 43,9\%$), welche hin-

gegen häufiger (11/15 = 73,3%) nur mit einer Operation behandelt wurden als R+-Patienten (4/15 = 26,7%). Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen T- und N-Stadien erhoben werden ($p = 0,244$ bzw. $0,142$), obwohl die meisten Patienten mit einem pT4-Primarius zusätzlich zur Operation adjuvant bestrahlt wurden (27/55 = 49,1%). Dafür wurden signifikant ($p = 0,017$) mehr Patienten mit perineuraler Invasion nach Abschluss der operativen Therapie bestrahlt (37/48 = 77,1%) als Patienten ohne perineurale Invasion (11/48 = 22,9%, Tabelle 7-4).

Tabelle 7: Kreuztabellen 1-4 mit Häufigkeiten und p-Werten von klinischen Daten und Tumoreigenschaften von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl der vollständigen Datensätze variiert zwischen 33 und 74. * = Auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (zweiseitig), Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion; R0 = negative Resektionsränder, R+ = positive Resektionsränder; pN0 = pathologisch gesicherter negativer Lymphknotenstatus, pN+ = pathologisch gesicherter positiver Lymphknotenstatus; GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als große Speicheldrüsen, GSM = Glandula submandibularis, NNH = Nasennebenhöhlen; LR = lokoregionär, FM = Fernmetastasen; p = Signifikanz

1)

	R0	R+	Zeilensumme	p
Pn0	16 (53,3%)	2 (7,4%)	18	<0,0001*
Pn1	14 (46,7%)	25 (92,6%)	39	
Spaltensumme	30 (100%)	27 (100%)	57	
Primärtumor:				0,036*
GSD	22 (59,5%)	13 (35,1%)	35	
AND	15 (40,5%)	24 (64,9%)	39	
Spaltensumme	37 (100%)	37 (100%)	74	

Fortsetzung der Tabelle 7 auf Seite 55.

Fortsetzung der Tabelle 7 von Seite 54.

2)

	Pn0	Pn1	Zeilensumme	p
Primärtumor:				
GSD	14 (77,8%)	19 (45,2%)	33	0,020*
AND	4 (22,2%)	23 (54,8%)	27	
Spaltensumme	18 (100%)	42 (100%)	60	

3)

	LR-Metastasen	FM	Zeilensumme	p
Männer	14 (63,6%)	12 (50,0%)	26	0,351
Frauen	8 (36,4%)	12 (50,0%)	20	
Spaltensumme	22 (100%)	24 (100%)	46	
Alter ≤ 50	4 (18,2%)	11 (45,8%)	15	0,046*
Alter > 50	18 (81,8%)	13 (54,2%)	31	
Spaltensumme	22 (100%)	24 (100%)	46	
Primärtumor:				
GSD	9 (40,9%)	8 (33,3%)	17	0,595
AND	13 (59,1%)	16 (66,7%)	29	
Spaltensumme	22 (100%)	24 (100%)	46	
Primärtumor:				
Parotis	8 (36,4%)	5 (20,8%)	13	0,347
GSM	1 (4,5%)	3 (12,5%)	3	
NNH	6 (27,3%)	6 (25,0%)	12	
Mundboden	0 (0,0%)	3 (12,5%)	3	
Gaumen	1 (4,5%)	3 (12,5%)	4	
Zunge	1 (4,5%)	0 (0,0%)	1	
Andere	5 (22,7%)	4 (16,7%)	9	
Spaltensumme	22 (100%)	24 (100%)	46	
T1	2 (1,0%)	1 (5,6%)	3	0,448
T2	3 (1,5%)	6 (33,3%)	9	
T3	1 (1,0%)	2 (11,1%)	3	
T4	14 (70,0%)	9 (50,0%)	23	
Spaltensumme	20 (100%)	18 (100%)	38	

Fortsetzung der Tabelle 7 auf Seite 56.

Fortsetzung der Tabelle 7 von Seite 54/55.

4)

	OP	OP + Radiatio	Zeilensumme	p
R0	11 (56,1%)	25 (43,9%)	36	0,042*
R+	4 (26,7%)	32 (56,1%)	36	
Spaltensumme	15 (100%)	57 (100%)	72	
T1	5 (35,7%)	9 (16,4%)	14	0,203
T2	3 (21,4%)	12 (21,8%)	15	
T3	3 (21,4%)	7 (12,7%)	10	
T4	3 (21,4%)	27 (49,1%)	30	
Spaltensumme	14 (100%)	55 (100%)	69	
pN0	9 (90,0%)	15 (65,2%)	24	0,142
pN+	1 (10,0%)	8 (34,8%)	9	
Spaltensumme	10 (100%)	23 (100%)	33	
Pn0	7 (58,3%)	11 (22,9%)	18	0,017*
Pn1	5 (41,7%)	37 (77,1%)	42	
Spaltensumme	12 (100%)	48 (100%)	60	

3.2 Immunhistochemische Ergebnisse

3.2.1 Deskriptive Statistik

Nach immunhistochemischer Färbung der Paraffin-fixierten Gewebeschnitte wurden diese mikroskopisch beurteilt und photographisch festgehalten. Die Färbungen wurden in negativ und positiv klassifiziert und letzteres in schwach positiv, moderat positiv und stark positiv unterteilt (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 2.4.5 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse). Da die Ergebnisse nach Färbung aller Patientenproben für die Antikörper gegen MAGE-A1, MAGE-C1 und MAGE-C2 nicht zu verwerten waren, d.h. keine verlässliche Etablierung mit Positiv- und Negativ-Kontrolle möglich war, werden im Folgenden die Ergebnisse der Antikörper gegen pan-MAGE und NY-ESO-1 dargestellt, bei welchen eine sehr gute und reproduzierbare Etablierung erfolgte.

Die Färbung mit dem *Antikörper gegen NY-ESO-1* war in 57,1% (48/84) der 84 Fälle positiv. Darunter färbten sich 60,4% (29/48) schwach positiv, 25,0% (12/48) moderat positiv und 14,6% (7/48) stark positiv an. 42,9% (36/84) der angefärbten Schnitte ergaben ein negatives Ergebnis.

In der mikroskopischen Untersuchung ließen sich nukleäre und zytoplasmatische Färbungen unterscheiden. Im Zytoplasma exprimierten sich die NY-ESO-1-Antigene in 14,3% aller Fälle (12/84), wo sich der Großteil schwach positiv (9/12 = 75%) und die Minderheit (3/12 = 25,0%) moderat positiv anfärbte.

In 54,8% aller Fälle (46/84) zeigten die Tumorzellen eine nukleäre Expression, wovon sie sich in 60,9% (28/46) schwach positiv, in 23,9% (11/46) moderat positiv und in 15,2% (7/46) stark positiv anfärbten.

Betrachtete man die NY-ESO-1-positiven Gewebeproben und untersuchte sie hinsichtlich zytoplasmatischer und/oder nukleärer Expression, fiel auf, dass sich in 79,2% (38/48) entweder eine zytoplasmatische *oder* eine nukleäre Expression und in 20,8% (10/48) eine zytoplasmatische *und gleichzeitig* eine nukleäre Expression zeigte (Tabelle 8, Abbildung 12).

Tabelle 8: Häufigkeiten und prozentuale Anteile der Tumorzellfärbung mit dem NY-ESO-1-Antikörper des Patientenkollektivs einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des adenoidzystischen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. Die NY-ESO-1-Antigen-Expressionen sind in schwach, moderat und stark positiv und in zytoplasmatisch und/oder nukleär unterteilt.

NY-ESO-1-Expression	Häufigkeiten	Prozent [%]
Positiv	48/84	57,1
Schwach positiv	29/48	60,4
Moderat positiv	12/48	25,0
Stark positiv	7/48	14,6
Negativ	36/84	42,9
Zytoplasmatische Expression	12/84	14,3
Schwach positiv	9/12	75,0
Moderat positiv	3/12	25,0
Nukleäre Expression	46/84	54,8
Schwach positiv	28/46	60,9
Moderat positiv	11/46	23,9
Stark positiv	7/46	15,2
Zytoplasmatisch ODER nukleär	38/48	79,2
Zytoplasmatisch UND nukleär	10/48	20,8

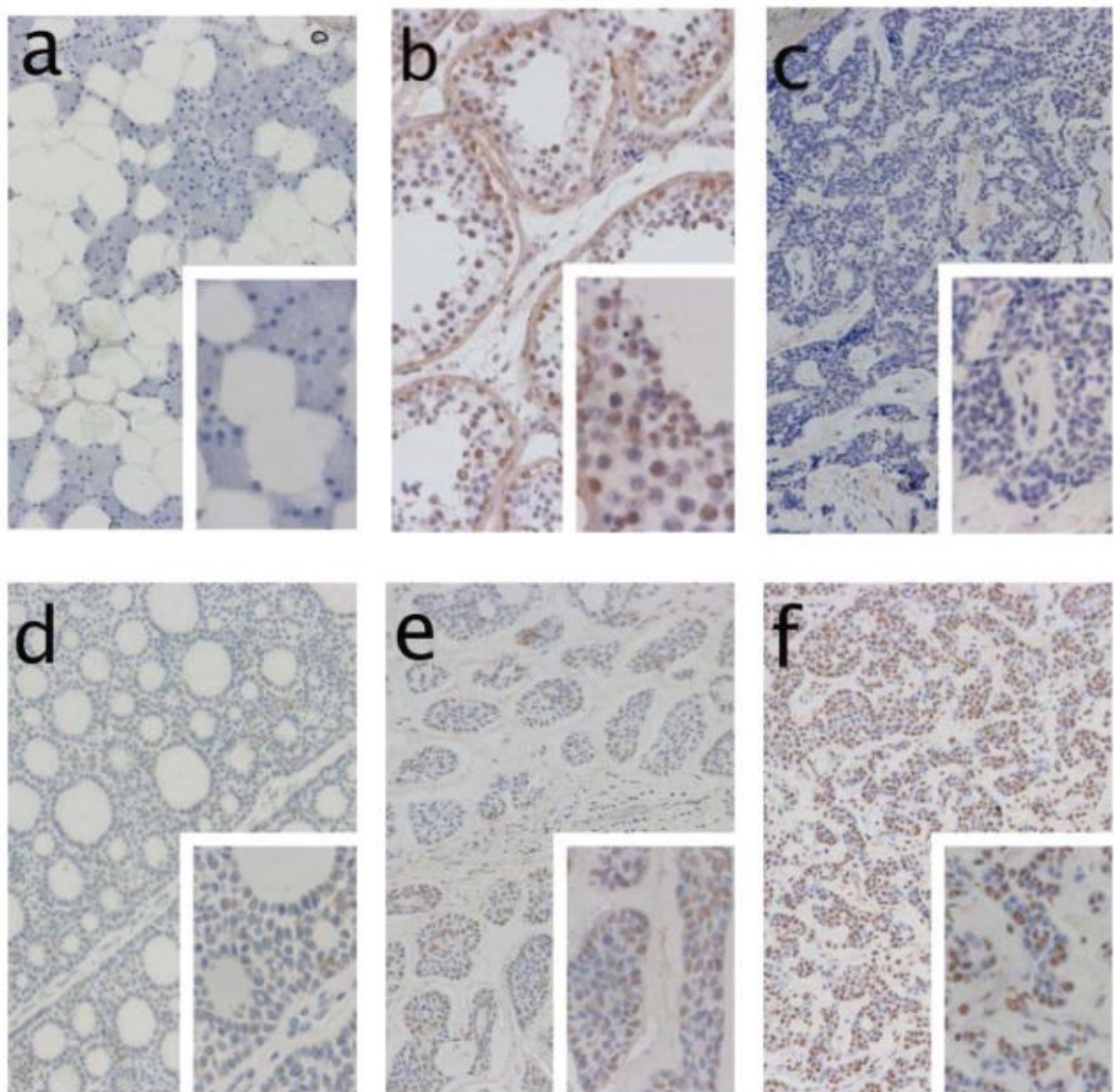


Abbildung 12: Immunhistochemische Ergebnisse nach Anfärbung des Gewebes mit adenoidzystischem Karzinom (ACC) mit dem Antikörper gegen NY-ESO-1-Antigen. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. 20-fache- und 40-fache-Vergrößerungen unter dem Lichtmikroskop. (a) Negativkontrolle (Parotisgewebe), (b) Positivkontrolle (humanes Hodengewebe), (c) Negative Tumorzellfärbung, (d) Schwache Färbung, tubuläres Wachstumsmuster, (e) Moderate Färbung, solides Wachstumsmuster, (f) Starke Tumorzellfärbung, solides Wachstumsmuster [129]. Mit freundlicher Genehmigung von Head & Neck, John Wiley and Sons.

Analog der Auswertungen zum NY-ESO-1-Antikörper wurden diese am *pan-MAGE-Antikörper* durchgeführt. Pan-MAGE zeigte in 33,3% (28/84) eine positive Färbung und in 66,7% (56/84) keine Färbung.

Unter den Positiven färbten sich 42,9% (12/28) schwach positiv, 39,3% (11/28) moderat positiv und 17,9% (5/28) stark positiv an.

Die pan-MAGE-Antigene wurden in 26,2% aller Fälle (22/84) im Zytoplasma exprimiert. Die Zytoplasma-Färbung war in 68,1% (15/22) schwach positiv, in 18,2% (4/22) moderat positiv und in 13,6% (3/22) stark positiv.

Eine Kernfärbung zeigte sich in 28,6% aller Patientenproben (24/84) und konnte zu 50,0% (12/24) in schwach positiv, zu 37,5% (9/24) in moderat positiv und zu 12,5% (3/24) in stark positiv unterteilt werden.

35,7% der pan-MAGE-positiven Fälle (10/28) wurden entweder zytoplasmatisch *oder* nukleär angefärbt. 64,3% (18/28) wiesen gleichzeitig eine zytoplasmatische *und* eine nukleäre Expression auf (Tabelle 9, Abbildung 13).

Tabelle 9: Häufigkeiten und prozentuale Anteile der Tumorzellfärbung mit dem pan-MAGE (Melanoma-associated antigen) Antikörper des Patientenkollektivs einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des adenoidzystischen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. Die NY-ESO-1-Antigen-Expressionen sind in schwach, moderat und stark positiv und in zytoplasmatisch und/oder nukleär unterteilt.

Pan-MAGE-Expression	Häufigkeiten	Prozent [%]
Positiv	28/84	33,3
Schwach positiv	12/28	42,9
Moderat positiv	11/28	39,3
Stark positiv	5/28	17,9
Negativ	56/84	66,7
Zytoplasmatische Expression	22/84	26,2
Schwach positiv	15/22	68,2
Moderat positiv	4/22	18,2
Stark positiv	3/22	13,6
Nukleäre Expression	24/84	28,6
Schwach positiv	12/24	50,0
Moderat positiv	9/24	37,5
Stark positiv	3/24	12,5
Zytoplasmatisch ODER nukleär	10/28	35,7
Zytoplasmatisch UND nukleär	18/28	64,3

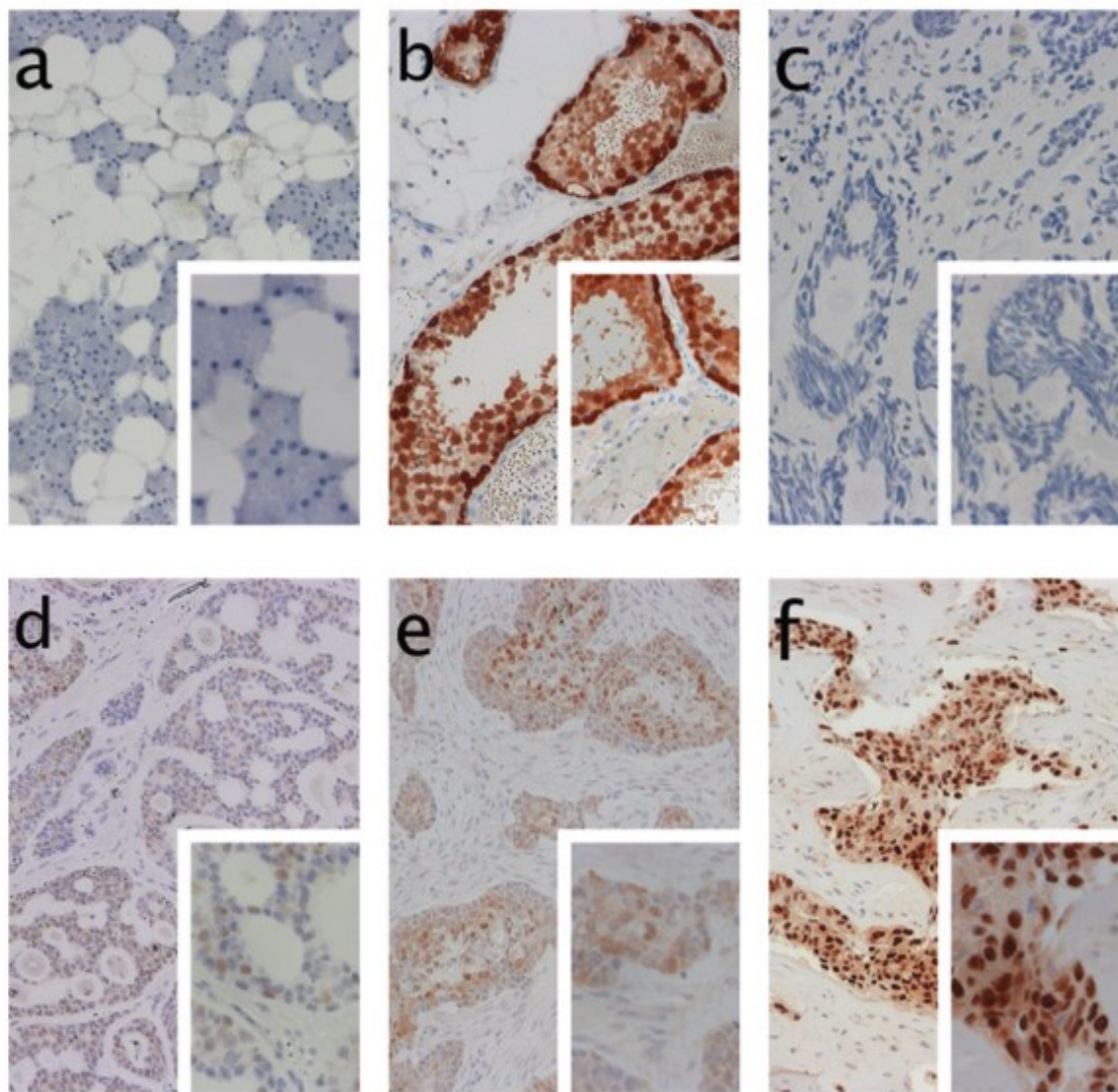


Abbildung 13: Immunhistochemische Ergebnisse nach Anfärbung des Gewebes mit adenoidzystischem Karzinom (ACC) mit dem Antikörper gegen pan-MAGE-Antigen. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. 20-fache- und 40-fache-Vergrößerungen unter dem Lichtmikroskop. (a) Negativkontrolle (humanes Parotisgewebe), (b) Positivkontrolle (humanes Hodengewebe), (c) Negative Tumorzellfärbung, (d) Schwache Färbung, cribriformes Wachstumsmuster, (e) Moderate Färbung, solides Wachstumsmuster, (f) Starke Tumorzellfärbung [129].

Mit freundlicher Genehmigung von Head & Neck, John Wiley and Sons.

Des Weiteren wurde die simultane Expression von NY-ESO-1- und pan-MAGE-Antigenen untersucht. Bei dieser Analyse exprimierten 23,8% aller Fälle (20/84) beide Antigene *gleichzeitig*, 42,9% (36/84) der Patientenproben zeigten entweder eine NY-ESO-1- oder eine pan-MAGE-Expression und 33,3% (28/84) wiesen keine Antigenexpression auf (Tabelle 10).

Tabelle 10: Häufigkeiten und prozentuale Anteile einer NY-ESO-1- und/oder pan-MAGE-Expression von Patienten einer Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Ulm und Köln zur Untersuchung des adenoidzystischen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84.

Expression	Häufigkeiten	Prozent [%]
Negativ	28/84	33,3
NY-ESO-1 ODER pan-MAGE	36/84	42,9
NY-ESO-1 UND pan-MAGE	20/84	23,8

3.2.2 Prognostische Auswirkung der CT-Antigen-Expression

Korrelation klinischer Daten mit der Antigenexpression

Nach Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Ergebnisse (negative oder positive Antigenexpression) im Zusammenhang mit prognostisch wichtigen Merkmalen wie dem Ursprungsort des ACCs, dem Lymphknotenstatus (pN+/pN0), dem Status der Resektionsränder (R+/R0), der perineuralen Invasion (Pn1), dem Ort der ersten Progression (lokoregionär oder fern) und dem Wachstumsmuster (tubulär, solide, cribriform oder gemischt) untersucht (Tabellen 11-1 und 11-2).

Eine *NY-ESO-1-Expression* konnte mit 64,6% (31/48) signifikant ($p = 0,037$) häufiger in „extraglandulären“ Tumoren (andere als große Speicheldrüsen) als in Tumoren großer Speicheldrüsen ($17/48 = 35,4\%$) ermittelt werden (Tabelle 11-1).

Des Weiteren trat eine NY-ESO-1-Färbung häufiger in histologisch tubulärem ACC-Gewebe ($20/48 = 41,7\%$) auf als in cribriformem, solidem oder gemischtem Gewebe

($p = 0,007$). Solide Wachstumsmuster wiesen indes häufiger ($11/17 = 64,7\%$) eine NY-ESO-1-Expression auf als eine negative Anfärbung ($6/17 = 35,3\%$, Tabelle 11-1). Positive Anfärbungen mit dem NY-ESO-1-Antikörper korrelierten hingegen nicht signifikant mit einer perineuralen Invasion ($p = 0,464$), dem Status der Resektionsränder ($p = 0,483$), dem Lymphknotenstatus ($p = 0,307$) und dem Ort der Progression ($p = 0,595$). Dementsprechend bestehen keine Unterschiede in der Antigenexpression dieser klinischen Merkmale (Tabelle 11-1)

Eine *pan-MAGE-Expression* hingegen hängt signifikant ($p = 0,045$) mit dem Halslymphknotenstatus zusammen, denn bei pan-MAGE-Negativität wurden mehr Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung ($20/24 = 83,3\%$) gezählt als Patienten mit positivem Lymphknotenstatus ($4/24 = 16,7\%$). Andersherum wiesen auch Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung häufiger ($20/25 = 80\%$) keine pan-MAGE-Expression auf als Patienten mit lymphknotenmetastasiertem ACC (Tabelle 11-2). Eine perineurale Invasion ($p = 0,859$), der Ort des Primärtumors ($p = 0,215$), der Status der Resektionsränder ($p = 0,144$), der Ort der Progression ($p = 0,936$) und das histologische Wachstumsmuster ($p = 0,217$) korrelierten nicht signifikant mit einer pan-MAGE-Expression (Tabelle 11-2).

Tabelle 11-1: Korrelation der NY-ESO-1-Expression mit den klinischen Daten von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl der vollständigen Datensätze variiert zwischen 34 und 84. Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion, PT = Primärtumor, GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als GSD, R0 = negative Resektionsränder, R+ = positive Resektionsränder, pN0 = pathologisch gesichert keine Lymphknotenmetastasen, pN+ = pathologisch gesichert Lymphknotenmetastasen, LR = lokoregional, WM = Wachstumsmuster (histologisch), p = Signifikanz, * = Auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (zweiseitig).

Klinische Daten	NY-ESO-1- positiv	NY-ESO-1- negativ	Zeilensumme	p
Pn0	10 (34,5%)	8 (25,8%)	18	0,464
Pn1	19 (65,5%)	23 (74,2%)	42	
Spaltensumme	29 (100%)	31 (100%)	60	
Ort des PT:				0,037*
GSD	17 (35,4%)	21 (58,3%)	38	
AND	31 (64,6%)	15 (41,7%)	46	
Spaltensumme	48 (100%)	36 (100%)	84	
R0	19 (46,3%)	18 (54,5%)	37	0,483
R+	22 (53,7%)	15 (45,5%)	37	
Spaltensumme	41 (100%)	33 (100%)	74	
pN0	9 (64,3%)	16 (80,0%)	25	0,307
pN+	5 (35,7%)	4 (20,0%)	9	
Spaltensumme	14 (100%)	20 (100%)	34	
Progression:				0,595
LR	13 (44,8%)	9 (52,9%)	22	
Fern	16 (55,2%)	8 (47,1%)	24	
Spaltensumme	29 (100%)	17 (100%)	46	
WM:				0,007*
Cribriform	14 (29,2%)	6 (16,7%)	20	
Tubulär	20 (41,7%)	11 (30,6%)	31	
Solide	11 (22,9%)	6 (16,7%)	17	
Gemischt	3 (6,25%)	13 (36,1%)	16	
Spaltensumme	48 (100%)	36 (100%)	84	

Tabelle 11-2: Korrelation der pan-MAGE (Melanoma-associated antigen)-Expression mit den klinischen Daten von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84, die Anzahl der vollständigen Datensätze variiert zwischen 34 und 84. Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion, PT = Primärtumor, GSD = große Speicheldrüsen, AND = andere als GSD, R0 = negative Resektionsränder, R+ = positive Resektionsränder, pN0 = pathologisch gesichert keine Lymphknotenmetastasen, pN+ = pathologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen, LR = lokoregional, WM = Wachstumsmuster (histologisch), p = Signifikanz, * = Auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (zweiseitig).

Klinische Daten	Pan-MAGE- positiv	Pan-MAGE- negativ	Zeilensumme	p (Pan-MAGE)
Pn0	6 (28,6%)	12 (30,8%)	18	0,859
Pn1	15 (71,4%)	27 (69,2%)	42	
Spaltensumme	21 (100%)	39 (100%)	60	
Ort des PT:				0,215
GSD	10 (35,7%)	28 (50,0%)	38	
AND	18 (64,3%)	28 (50,0%)	46	
Spaltensumme	28 (100%)	56 (100%)	84	
R0	10 (38,5%)	27 (56,3%)	37	0,144
R+	16 (61,5%)	21 (43,8%)	37	
Spaltensumme	26 (100%)	48 (100%)	74	
pN0	5 (50,0%)	20 (83,3%)	25	0,045*
pN+	5 (50,0%)	4 (16,7%)	9	
Spaltensumme	10 (100%)	24 (100%)	34	
Progression:				0,936
LR	8 (47,1%)	14 (48,3%)	22	
Fern	9 (52,9%)	15 (51,7%)	24	
Spaltensumme	17 (100%)	29 (100%)	46	
WM:				0,217
Cribriform	9 (32,1%)	11 (19,6%)	20	
Tubulär	11 (39,3%)	20 (35,7%)	31	
Solide	6 (21,4%)	11 (19,6%)	17	
Gemischt	2 (7,1%)	14 (25,0%)	16	
Spaltensumme	28 (100%)	56 (100%)	84	

Korrelation der Antigenexpression mit Überlebensdaten

Ferner wurden die Expressionen der MAGE-Antigene mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben korreliert.

Die *NY-ESO-1-Expression* korrelierte statistisch nicht signifikant mit dem Gesamtüberleben ($p = 0,223$), allerdings konnte ein Trend erkannt werden. Während das mediane OS von NY-ESO-1-negativen Patienten 282,0 Monate betrug, lag es bei NY-ESO-1-positiven Patienten bei einem niedrigeren medianen OS von 130,8 Monaten (Tabelle 12, Abbildung 14-A).

Das mediane PFS für NY-ESO-1-negative Patienten betrug 83,3 Monate, wohingegen das mediane PFS für NY-ESO-1-positive Patienten mit 66,3 Monaten etwas kürzer war. Hier lässt sich demnach ebenfalls eine Tendenz zu niedrigerem progressionsfreien Überleben für NY-ESO-1-positive Patienten erkennen, der jedoch statistisch nicht signifikant ist ($p = 0,507$). Somit könnten die Unterschiede im PFS und OS auch rein zufällig entstanden sein (Tabelle 12, Abbildung 14-B).

Tabelle 12: Analyse der Expression von NY-ESO-1-Antigen bezüglich des Gesamtüberlebens (OS) und des progressionsfreien Überlebens (PFS) von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. P = Signifikanz, OS = overall survival, PFS = progression free survival

	Medianes OS [Monate]	P (OS)	Medianes PFS [Monate]	P(PFS)
NY-ESO-1 negativ	282,0	0,223	83,3	0,507
NY-ESO-1 positiv	130,8		66,3	

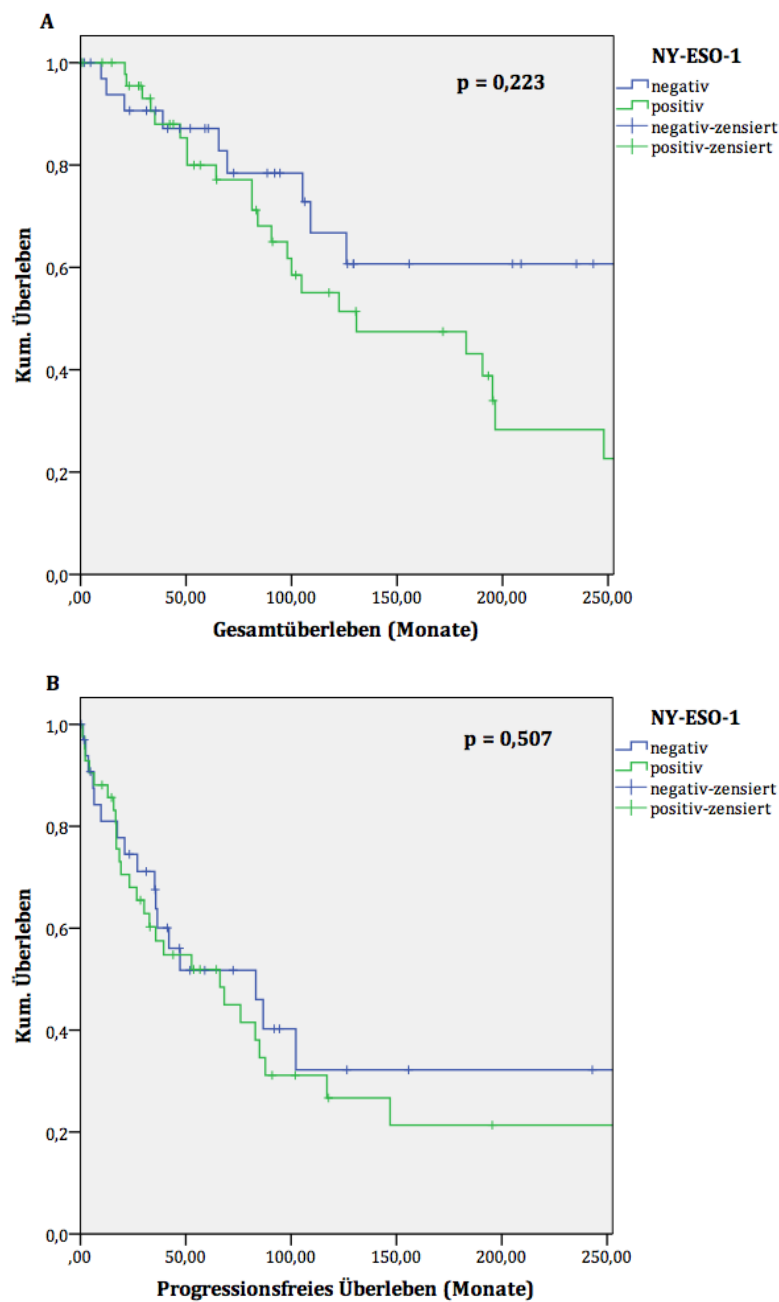


Abbildung 14: Analyse der Gesamtüberlebenszeit (A) und der progressionsfreien Überlebenszeit (B) bei NY-ESO-1-positiven und –negativen Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Eine NY-ESO-1 Expression ist mit schlechterem Überleben assoziiert (nicht signifikant). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. P = Signifikanz

Die Betrachtung der Überlebenszeiten nach Behandlung des Tumorgewebes mit dem pan-MAGE-Antikörper ergab, dass das mediane OS bei positiver *pan-MAGE-Expression* 105,3 Monate und bei pan-MAGE-negativen Patienten 190,5 Monaten betrug. Dennoch kann der Trend zu geringerem Überleben bei pan-MAGE-Expression statistisch nicht belegt werden ($p = 0,096$, Tabelle 13, Abbildung 15-A).

Bei pan-MAGE-negativen Patienten war das mediane PFS mit 76,0 Monate etwas länger als mit 52,8 Monaten bei pan-MAGE-positiven Patienten. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,572$, Tabelle 13, Abbildung 15-B).

Tabelle 13: Analyse der Expression von pan-MAGE (Melanoma associated antigen)-Antigen bezüglich des Gesamtüberlebens (OS) und des progressionsfreien Überlebens (PFS) von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. P = Signifikanz, OS = overall survival, PFS = progression free survival

	Medianes OS [Monate]	P (OS)	Medianes PFS [Monate]	P(PFS)
pan-MAGE negativ	190,5	0,096	76,0	0,572
Pan-MAGE positiv	105,3		52,8	

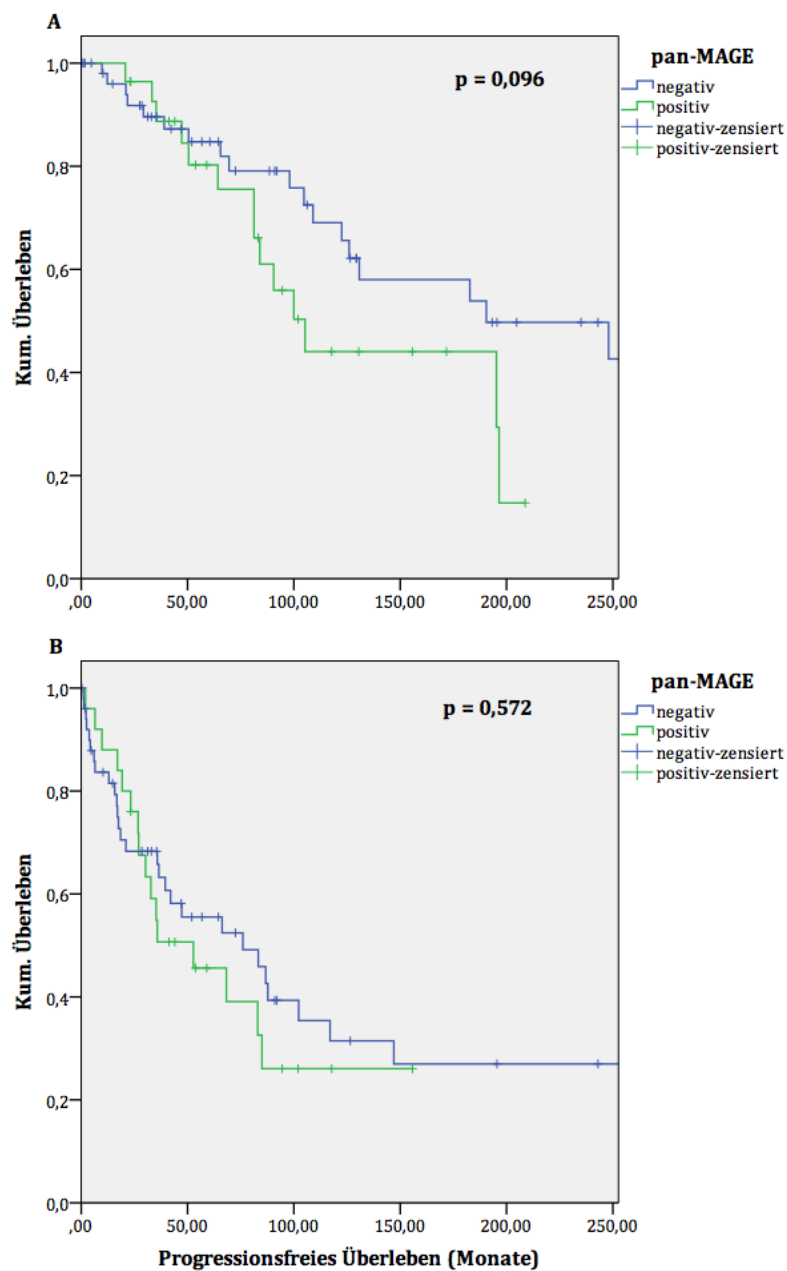


Abbildung 15: Analyse der Gesamtüberlebenszeit (A) und der progressionsfreien Überlebenszeit (B) bei pan-MAGE (Melanoma associated antigen) -positiven und -negativen Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC). Patienten mit Tumoren mit pan-MAGE-Expression wiesen ein kürzeres Überleben auf (nicht signifikant). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung des ACCs im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. P = Signifikanz.

Bei Betrachtung der *Expressionsstärken der Antigene* konnten diesbezüglich keine prognostischen Schlüsse gezogen werden.

Die NY-ESO-1-Expressionsstärke schwach, moderat oder stark positiv stellte mit 182,8, 122,5 und 90,5 Monaten keinen signifikanten prognostischen Faktor für das mediane OS ($p = 0,481$) dar. Auch das mediane PFS, welches bei schwacher, moderater und starker Expression 39,5, 68,3 und 52,8 Monate betrug, erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p = 0,534$). Bei negativer Expression betrugen das mediane OS 282,0 und das mediane PFS 83,3 Monate.

Bei pan-MAGE-Expression betrug das mediane OS bei schwacher, moderater und starker Anfärbung 84,0, 196,5 und 81,3 Monate, verglichen mit 190,5 Monaten bei negativer Antigenexpression ($p = 0,056$). Medianes progressionsfreies Überleben betrug bei pan-MAGE-positiven Patienten bei schwacher und moderater Expression 35,8 und 52,8 Monate, gegenüber pan-MAGE-negativen Patienten mit 76,0 Monaten ($p = 0,838$).

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich das Überleben bei Patienten unterschied, die entweder *NY-ESO-1 und pan-MAGE gleichzeitig* (= Gruppe 1), oder *keines der Antigene* (= negativ = Gruppe 2), oder *entweder NY-ESO-1 oder pan-MAGE* (= Gruppe 3) exprimierten (Tabelle 14, Abbildung 16).

Im Vergleich der Gruppen 1 ($20/84 = 23,8\%$) und 2 ($28/84 = 33,3\%$) war das mediane OS bei Expression beider Antigene mit 90,5 Monaten geringer als das mediane OS bei negativer Expression mit 282,0 Monaten ($p = 0,047$, Abbildung 16-A).

Das mediane PFS war bei Patienten mit Tumoren mit negativer Antigenexpression 47,3 Monate lang, wohingegen es bei Patienten mit positiver Antigenexpression 35,8 Monate betrug. Dieser Trend verhielt sich nicht signifikant ($p = 0,372$).

Zwischen den beiden Gruppen 1 und 3 ($36/84 = 42,9\%$) bestand kein signifikanter Unterschied in der Korrelation des Überlebens mit der Antigenexpression ($p = 0,063$). Das mediane OS betrug bei Patienten der Gruppe 1 90,5 Monate, wohingegen das der Gruppe 3 190,5 Monate betrug. Außerdem wiesen die beiden Patientengruppen im Vergleich keine statistischen Unterschiede bezüglich der progressionsfreien

Überlebenszeiten auf ($p = 0,157$), wobei Gruppe 1 im Median nach 35,8 Monaten eine Progression zeigte, Gruppe 3 erst nach 87,8 Monaten.

Patienten der Gruppe 2 tendierten mit 282,0 Monaten zu einem längeren medianen OS als Patienten der Gruppe 3 mit 190,5 Monaten. Dieser Zusammenhang war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,876$). Auch der Vergleich des medianen PFS mit 47,3 Monaten für Gruppe 2 und 87,8 Monaten für Gruppe 3 wies keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,649$).

Bei Vergleich der medianen Zeiten für das OS und für das PFS innerhalb der drei Gruppen wurde das Signifikanzniveau von 0,05 nicht erreicht ($p = 0,089$ bzw. $p = 0,365$, Abbildung 16-B).

Somit erwies sich die NY-ESO-1- und pan-MAGE-Koexpression gegenüber einer negativen Expression als ein signifikant schlechter prognostischer Faktor hinsichtlich des Gesamtüberlebens.

Tabelle 14: Analyse von negativer und positiver pan-MAGE (Melanoma associated antigen) - und/oder NY-ESO-1-Expression hinsichtlich des Gesamtüberlebens (OS) und des progressionsfreien Überlebens (PFS). Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh, Köln und Ulm zur Untersuchung von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzinom im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Patienten beträgt 84. * = Auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (zweiseitig), Gruppe 1 = NY-ESO-1 *und* pan-MAGE, Gruppe 2 = negativ, Gruppe 3 = NY-ESO-1 *oder* pan-MAGE, Pearson Chi-Quadrat-Test, p = Signifikanz, OS = overall survival, PFS = progression free survival

	Medianes OS [Monate]	p(OS)	Medianes PFS [Monate]	p(PFS)
Gruppe 1	90,5	0,047*	35,8	0,372
Gruppe 2	282,0		47,3	

Gruppe 1	90,5	0,063	35,8	0,157
Gruppe 3	190,5		87,8	

Gruppe 2	282,0	0,876	47,3	0,649
Gruppe 3	190,5		87,8	

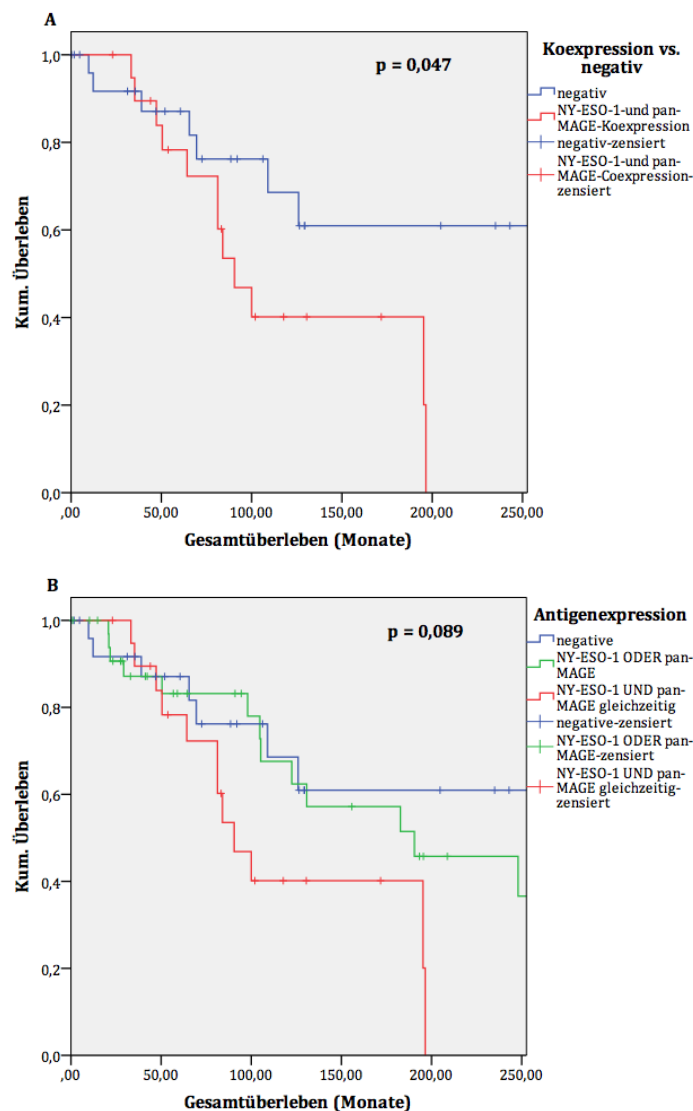


Abbildung 16: Analyse der Gesamtüberlebenszeiten von Patienten mit einem adeno-
idzystischen Karzinom (ACC): (A) Vergleich einer NY-ESO-1- und pan-MAGE (Mela-
noma associated antigen) -Koexpression mit einer negativen Antigenexpression, (B)
Vergleich von Patienten mit Tumoren mit negativer Antigenexpression, NY-ESO-1-
UND/ODER pan-MAGE-Expression. Studie an den Universitätskliniken Pittsburgh,
Köln und Ulm zur Untersuchung von Patienten mit einem adenoidzystischen Karzi-
nom im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum von 1984 bis 2014. Die Gesamtzahl der Pati-
enten beträgt 84, die Anzahl der gesamten Datensätze bei A) beträgt 47 und bei B) 84.
Patienten mit Expression beider Antigene wiesen schlechtere Überlebenszeiten auf
als Patienten ohne Expression oder mit Expression nur eines Antigens. P = Signifi-
kanz.

Zusammenfassend lässt sich über das ACC sagen, dass sich höhere T-Stadien, ein positiver Lymphknotenstatus, eine Fernmetastasierung, Primärtumore in anderen als den großen Speicheldrüsen, positive Resektionsränder, eine perineurale Invasion und ein solides Wachstumsmuster in dieser Patientenkohorte prognostisch ungünstig auf das mediane OS und/oder das mediane PFS auswirkten.

Immunhistochemisch zeigte sich eine NY-ESO-1-Expression in 57,1% (48/84) der Fälle und eine pan-MAGE-Expression in 33,3% (28/84) der Fälle. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang einer NY-ESO-1-Expression mit dem vermehrt vorkommenden Auftreten des Primärtumors in anderen als den großen Speicheldrüsen ($31/48 = 64,6\%$, $p = 0,037$) nachgewiesen werden. Histologisch nicht solide Wachstumsmuster, worunter die tubulären und cribriformen Muster fallen, zeigten ein besseres medianes Überleben (195,3 Monate) als solide Muster (90,5 Monate, $p = 0,012$). Eine solide Histologie war häufiger mit einer NY-ESO-1-positiven Reaktion assoziiert ($11/17 = 64,7\%$) als mit einer NY-ESO-1-negativen Anfärbung ($6/17 = 35,3\%$). Eine ausgebliebene pan-MAGE-Expression wurde häufiger in Gewebe von Patienten mit negativem Lymphknotenbefall ($20/24 = 83,3\%$) gesehen als in Gewebe von Patienten mit pN+-Status ($4/24 = 16,7\%$, $p = 0,045$).

Patienten mit einem ACC mit NY-ESO-1-Expression tendierten mit 130,8 Monaten zu einem kürzeren medianen OS ($p = 0,223$) und wiesen mit 66,3 Monaten ein kürzeres PFS auf ($p = 0,507$) als Patienten mit antigennegativen Tumoren mit 282,0 Monaten (medianes OS) und 83,3 Monaten (medianes PFS). Ähnlich verhielt es sich bei der pan-MAGE-Expression mit einem medianen OS von 105,3 Monaten ($p = 0,096$) und einem medianen PFS von 52,8 Monaten ($p = 0,572$) bei Patienten mit pan-MAGE-positiven Tumoren verglichen mit 190,5 Monaten (medianes OS) und 76,0 Monaten (medianes PFS) bei Patienten mit antigennegativen Tumoren. Patienten, deren ACCs in der IHC eine NY-ESO-1- und gleichzeitig eine pan-MAGE-Expression zeigten, lebten im Median signifikant ($p = 0,047$) kürzer (90,5 Monate) als Patienten mit Tumoren mit negativer Expression (282,0 Monate).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Patienten mit der sehr seltenen malignen Erkrankung eines ACCs im Kopf-Hals-Bereich. Obwohl die Inzidenz für ein ACC gering ist, war es durch ein multizentrisches Vorgehen möglich die Patientenzahl auf insgesamt 84 Fälle zu erhöhen und dadurch die Validität der Untersuchungen zu stärken.

Im Rahmen der Studie wurden die, nach unserem Wissensstand und Sichtung der Literatur, größte Kohorte an Patienten mit ACC im Kopf-Hals-Bereich auf CT-Antigene und erstmalig deren prognostische Relevanz untersucht. Diese spezifischen und stark immunogenen Proteine stellen, wie bei anderen Entitäten bereits gezeigt, vielversprechende Zielmoleküle für immuntherapeutische Behandlungsansätze dar. Die Expression dieser Antigene ist mit Ausnahme von Hoden- und Plazentagewebe auf maligne Tumore beschränkt [20,23]. Antikörper gegen MAGE- und NY-ESO-1-Antigene, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden für die IHC etabliert und bisweilen schon in einigen Studien, beispielsweise beim Plattenepithel-, Ovarialkarzinom, malignen Melanom und Hodgkin Lymphom, erfolgreich angewendet [43,58,59,82,143].

In dieser Arbeit war pan-MAGE in 33,3% (28/84) und NY-ESO-1 in 57,1% (48/84) der immunhistochemisch untersuchten Tumorproben überexprimiert. Die NY-ESO-1-Expression zeigte sich unter den positiven Präparaten in 60,4% schwach, in 25,0% moderat und in 14,6% stark positiv. Pan-MAGE-positive Gewebeschnitte färbten sich in 42,9% schwach positiv, in 39,3% moderat und in 17,9% stark positiv an. NY-ESO-1 war in 20,8% (10/48) der antigenpositiven Fälle gleichzeitig zytoplasmatisch *und* nukleär exprimiert, pan-MAGE in 64,3% (18/28). Eine zytoplasmatische *oder* nukleäre Antigenexpression zeigte sich beim NY-ESO-1-Antikörper in 79,2% (28/84) und beim pan-MAGE-Antikörper in 35,7% (10/28). Eine Koexpression beider Antigene konnte in 23,8% (20/84) aller Fälle beobachtet werden.

In der Literatur finden sich nur vereinzelt Studien zur Expression der CT-Antigene beim ACC [73,90,94]. Park et al. [94] führten eine Studie durch, in der 31 Fälle mit PA und 17 Fälle mit ACC histopathologisch untersucht wurden. Dort wurden immuno-

tochemisch MAGE-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, Verdünnung 1:200) zu 100% und MAGE-A4 (ABGENT, San Diego, Kalifornien, Verdünnung 1:200) zu 95% in ACC-Gewebe exprimiert ($p < 0,05$). MAGE-A zeigte sich im ACC-Gewebe in der Mehrzahl der Fälle ($8/17 = 47\%$) stark positiv, im nicht-tumorös veränderten Gewebe negativ und in Gewebe mit PA in 5 Fällen ($5/31 = 16\%$) schwach positiv. MAGE-A4 präsentierte sich in Gewebe mit PA nur in einem Fall ($1/31 = 3\%$) positiv, wohingegen gesundes Speicheldrüsengewebe negativ blieb. Diese deutliche Überexpression in der untersuchten Kohorte aus 17 Fällen lässt sich unter anderem durch die Festlegung der Grenzen für die Antigenexpression erklären, denn bei den Analysen von Park et al. wurde eine immunhistochemische Tumorzellanfärbung von über 1% als positiv angesehen [94]. In der vorliegenden Studie hingegen sind die Auswertungen an einen standardisierten Score angelehnt [114] und jede Expression von über 10% wurde als positiv angesehen. Dieses System wurde ebenfalls in einer vergleichbaren Studie von Laban et al. [66] verwendet. Dort wurden 453 Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich immunhistochemisch auf eine MAGE-Expression untersucht, wobei sich Anfärbungen mit pan-MAGE in 36,2% und mit NY-ESO-1 in 4,3% aller Tumorpatienten zeigten.

Des Weiteren untersuchten Park et al. die Genexpression durch RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion). Dabei wurden MAGE-A3 und -A4 im ACC, jedoch nicht im PA, exprimiert [94]. Auch andere Studien mit RT-PCR ergaben, dass sich MAGE-Gene in ACC-Zelllinien von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, jedoch nicht in gutartigem Tumorgewebe oder in normalem Gewebe, exprimieren [73,90,95].

Das PA zeigt in einigen Fällen ähnliche histologische Wachstumsformen wie das ACC. Gemäß der Studie von Park et al. kann nun die immunhistologische Färbung mit MAGE-A zur Differentialdiagnostik zwischen PA und ACC verwendet werden, da keine MAGE-A- und MAGE-A4-Expression beim PA nachgewiesen werden konnte, allerdings klar bei bis zu 100% beim ACC [94].

In dieser Arbeit ergaben die Berechnungen zu den Überlebenszeiten für NY-ESO-1-positive-Patienten ein medianes OS von 130,8 Monate und für NY-ESO-1-negative Patienten ein medianes OS von 282,0 Monate ($p = 0,223$). Pan-MAGE-positive Patienten wiesen ein medianes OS von 105,3 Monaten auf, wohingegen das mediane OS bei pan-

MAGE-negative Patienten 190,5 Monate betrug ($p = 0,096$) Die kürzeren medianen Überlebenszeiten für pan-MAGE- bzw. NY-ESO-1-positive Patienten im Vergleich zu Patienten mit negativer Antigenexpression lassen einen prognostischen Trend erkennen, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Die CT-Antigenexpression stellte sich in vergleichbaren Studien unter anderem beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches, beim kleinzelligen Lungenkarzinom, beim medullärem Mammakarzinom und beim Urothelkarzinom als ein unabhängiger prognostischer Marker für ein geringes Gesamtüberleben heraus [51,66,82,110].

Eine simultane Expression von NY-ESO-1 und pan-MAGE ($20/84 = 23,8\%$) ergab in der vorliegenden Studie eine prognostische Bedeutung, denn es zeigte sich ein signifikant ($p = 0,047$) kürzeres medianes OS für Tumoren mit simultaner Expression (90,5 Monate) im Vergleich zu solchen mit negativer Expression (282,0 Monate, $28/84 = 33,3\%$). NY-ESO-1 als auch pan-MAGE exprimierten sich am häufigsten schwach positiv ($29/48 = 60,4\%$ bzw. $12/28 = 42,9\%$). Technische Aspekte der IHC sind als möglicher Kofaktor für die häufige geringe Expression zu beachten. Die Paraffin-Schnitte wurden zeitnah nach Anfertigung bearbeitet. Die Tumorböcke waren aufgrund der langen Nachbeobachtungszeit jedoch zum Teil bis zu 20 Jahre alt, sodass auch oxidative Prozesse nicht außer Acht zu lassen sind [31]. Patienten mit Tumoren, die NY-ESO-1 schwach positiv exprimierten ($29/48 = 60,4\%$), zeigten, verglichen mit moderat positiven ($12/48 = 25,0\%$) und stark positiven Färbungen ($7/48 = 14,6\%$), das längste mediane Überleben (182,8 Monate versus 122,5 Monate und 90,5 Monate), welches sich jedoch statistisch nicht signifikant verhielt ($p = 0,481$). Bei der pan-MAGE-Färbung konnte kein solcher Trend erkannt werden, denn Patienten mit moderat positiv exprimierenden Tumoren ($11/28 = 39,3\%$) hatten im Vergleich zu schwach ($12/28 = 42,9\%$) und stark positiven Expressionen ($5/28 = 17,9\%$) das längste Überleben (196,5 Monate versus 84 Monate und 81,3 Monate).

Eine NY-ESO-1-Expression trat statistisch signifikant ($p = 0,037$) häufiger in Gewebe auf, welches nicht aus den drei großen Kopfspeicheldrüsen stammte ($31/48 = 64,6\%$), wohingegen sich in Gewebe aus den großen Speicheldrüsen häufiger keine

NY-ESO-1-Expression zeigte ($21/36 = 58,3\%$). Die Mechanismen, die dies begünstigen, bleiben ungeklärt.

Die pan-MAGE-negativen Gewebeproben wurden signifikant ($p = 0,045$) häufiger Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung ($20/24 = 83,3\%$) zugeteilt als Patienten mit lymphknotenmetastasiertem ACC ($4/24$ ($16,7\%$)). Ein negativer Lymphknotenstatus korrelierte außerdem signifikant mit besserem Überleben ($p = 0,008$).

Die vorliegende Studie ist die erste, welche die prognostische Auswirkung der CT-Antigen-Expression beim ACC untersucht. Zunächst wurden in der Kohorte wichtige prognostische Marker untersucht, um die interne und externe Validität zu überprüfen. So etwa wurden die perineurale Invasion ($p = 0,025$), die positiven Resektionsränder ($p = 0,028$), der positive Lymphknotenstatus ($p = 0,008$), das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose ($p = 0,002$) und im Verlauf der Erkrankung ($p = 0,003$) und der Ort des Primärtumors ($p = 0,047$) als signifikante Faktoren für das Überleben bestätigt.

In der Literatur [27,80,91] wird beschrieben, dass das ACC in kleinen Speicheldrüsen eine schlechtere Prognose aufweist als das ACC in großen Speicheldrüsen. Trenkić et al. [122] postulierten, dass benigne Tumoren in Speicheldrüsen generell häufiger vorkommen, aber kleine Speicheldrüsen in größerer Anzahl maligne entarten als große Speicheldrüsen. In der vorliegenden Arbeit wiesen 45,2% ($38/84$) der Patienten mit ACC einen Befall der großen Kopfspeicheldrüsen auf. Den Rest (54,8%) machten Patienten mit einem ACC in kleinen Speicheldrüsen und anderen Drüsen aus. In dieser Kohorte wiesen Patienten mit Befall der großen Speicheldrüsen eine bessere Prognose auf, denn sie lebten signifikant länger (medianes OS nicht erreicht) als solche mit Befall „anderer Drüsen“, zu denen die kleinen Speicheldrüsen gezählt wurden (medianes OS = 122,5 Monate, $p = 0,047$).

In einer Studie von Marcinow et al. [74] überlebten Patienten mit Tumoren im sinunasalen Bereich einen kürzeren Zeitraum (medianes OS = 105 Monate) als Patienten mit Tumoren in der Mundhöhle (medianes OS = 313 Monate) oder in großen Speicheldrüsen (medianes OS = 237 Monate). Shum et al. [112] konnten in ihrer retrospektiven Studie mit 29 Patienten zeigen, dass am häufigsten (66%) die kleinen

Speicheldrüsen des Gaumens und der Maxilla betroffen waren, und sich initial bereits häufig ein fortgeschrittenes Stadium zeigte. Ihnen zufolge waren ungefähr 78% der Tumoren in kleinen Speicheldrüsen maligne, wovon das ACC 15% ausmachte [112]. Patienten aus der Kohorte der vorliegenden Arbeit, deren primäre Tumorlokalisation eine andere war als die großen Kopfspeicheldrüsen, wiesen signifikant häufiger eine perineurale Invasion ($p = 0,020$) und positive Resektionsränder ($p = 0,036$) auf, welche ihrerseits Faktoren für schlechtes Überleben darstellten. Gründe dafür liegen in der komplexen Anatomie des Gesichtsbereichs, denn benachbarte Strukturen wie die Orbita, die Tränendrüse und die Schädelbasis, sowie multiple nervale Strukturen, erschweren dem Operateur die vollständige bzw. radikale in sano Resektion. Darüber hinaus stellt das perineurale Tumorwachstum die sichere Resektion mit adäquaten Resektionsgrenzen in Frage und kann, wie in der Literatur beschrieben, die Quelle eines Tumorrezidivs darstellen [81].

Weiterhin werden das Alter, das Geschlecht und ein Diabetes mellitus als Prognosefaktoren in der Literatur beschrieben [10,25]. Frauen, Patienten mit lokalisertem ACC und jüngere Patienten scheinen bessere Überlebenschancen zu haben [41]. Choi et al. [25] konnten in ihrer Studie mit 88 Patienten zeigen, dass Patienten mit sinunasalem ACC und solche mit Diabetes mellitus ein signifikant höheres Risiko für Lokalrezidive aufweisen. In der Patientenkohorte der vorliegenden Studie, konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Risiko für Lokalrezidive bei Patienten mit sinunasalem ACC ermittelt werden. Bei 6 aus 22 Patienten (27,3%) mit Tumoren im Bereich der NNH entwickelten sich im Verlauf lokale Rezidive. Nach Patienten mit Tumoren der Glandula parotis ($8/22 = 36,4\%$) war diese Gruppe am häufigsten von lokalen Rezidiven betroffen. Somit kann der Trend bestätigt werden, dass Patienten mit ACC im sinunasalen Bereich zu Lokalrezidiven neigen. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass Tumorresektionen im sinunasalen Bereich durch die engen anatomischen Verhältnisse erschwert durchführbar sind bzw. die Sicherheitsabstände in Richtung Orbita und Schädelbasis möglicherweise nicht immer ausreichend gewählt werden konnten [5]. Zudem werden Patienten mit Tumoren dieser Lokalisation erst sehr spät z.B. durch Nasenbluten oder eine Nasenatmungsbehinderung sympto-

matisch, wenn bereits ein ausgedehntes Tumorwachstum vorliegt. Diabetes mellitus wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Das Alter (≤ 50 , > 50) bildete in dieser Studie keinen prognostisch signifikanten Faktor hinsichtlich des medianen OS ($p = 0,485$) und des medianen PFS ($p = 0,192$). Patienten ≤ 50 Jahre ($32/84 = 38,1\%$) lebten im Median mit 148,0 Monaten minimal länger als Patienten > 50 Jahre ($52/84 = 61,9\%$) mit 130,8 Monaten. Das mediane PFS zeigte mit 85 Monaten versus 36,5 Monaten einen klareren Trend auf. Patienten > 50 Jahre entwickelten signifikant ($p = 0,046$) häufiger eine lokoregionäre Progression ($18/22 = 81,8\%$) und Fernmetastasen ($13/24 = 54,2\%$) als Patienten ≤ 50 Jahre. Bhayani et al. [10] kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass ein Alter ≥ 45 Jahre mit dem Auftreten von Fernmetastasen zusammenhängt. Aufgrund der Natur des ACCs langsam zu wachsen und auch nach Jahrzehnten noch Fernmetastasen auszubilden, wäre es logisch anzunehmen, dass jüngere Patienten langfristig ein höheres Risiko aufweisen an Fernmetastasen zu leiden als ältere Patienten. Eine Studie der Eurocare Arbeitsgruppe stimmte dieser Schlussfolgerung zu, zog aber auch den Einwand heran, dass ältere Patienten häufiger mit Tumoren in Spätstadien diagnostiziert werden [10,28]. Patienten höheren Alters suchen womöglich aufgrund anderer, ihnen ernstzunehmender erscheinenden Grunderkrankungen Ärzte erst auf, wenn die Tumorausdehnung massiv vorangeschritten ist.

Das Geschlecht wies in dieser Studie weder prognostische Relevanz bezüglich des Ortes der Progression ($p = 0,351$) noch bezüglich des medianen OS ($p = 0,448$) oder des PFS ($p = 0,592$) auf. Bezüglich des weiblichen Geschlechts lassen sich widersprüchliche Aussagen finden. Marcinow et al. [80] postulierten, dass das weibliche Geschlecht ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Auftreten von Rezidiven sei. Ellington et al. [41] hingegen publizierten, dass Frauen eine bessere Gesamtprognose hätten als Männer. Von einigen Autoren wurde diskutiert, ob Hormone einen Einfluss auf die Prognose bezüglich des Geschlechts ausüben könnten. So publizierten Nasser et al. [92], dass Speicheldrüsenkarzinome, darunter auch das ACC, Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimierten. In zwei berichteten Fällen stabilisierte sich der Verlauf des ACCs durch eine Therapie mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen [40]. Allerdings zeigte sich in der Studie von Pires et al. [99] keine

Östrogenrezeptor-Expression. Somit spielen Östrogene und Progesteron vermutlich nur eine untergeordnete Rolle in der Tumorgenese des ACCs [80]. Dennoch scheint es möglich, dass die Prognose bei Frauen durch das Vorkommen von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren beeinflusst werden könnte. Diese Hormonhypothesen werden auch von der Arbeit von Thierauf et al. [121] gestützt, in welcher der Verlust des Submaxillary Gland Androgen-regulated Protein 3A (SMR3A) im ACC geschlechtsspezifisch zu sein scheint, denn eine Expression verhielt sich umgekehrt proportional zum männlichen Geschlecht ($p = 0,009$). SMR3A kommt im menschlichen Speichel vor und gehört einer Genfamilie an, welche Opiorphine (körpereigene Opioide) produziert. Die Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal eine im Vergleich zu normalem Drüsengewebe herabgesetzte SMR3A-Expression in ACC in Speicheldrüsen demonstrieren. Dies führt zu der Hypothese, dass eine SMR3A-Expression in der Pathogenese des ACC eine Rolle spielen könnte. Obwohl sich ein Trend für SMR3A als ein ungünstiger Risikofaktor für Überleben bei Patienten mit ACC erkennen ließ, stellte sich dieses Protein nicht als ein prognostischer Biomarker für ACC in der untersuchten Kohorte heraus [121].

In der vorliegenden Arbeit traten in 52,2% (24/46) der Fälle Fernmetastasen und in 47,8% (22/46) eine lokoregionäre Progression auf. In der Literatur wird angegeben, dass sich Fernmetastasen in 33-50% der Fälle im Verlauf der Erkrankung manifestieren [54]. Ebenso berichtete die Arbeitsgruppe von Spiro et al. [116], dass von 196 Patienten 38% Fernmetastasen entwickelten. Verglichen mit der Literatur befindet sich in der vorliegenden Arbeit die Rate an Fernmetastasen eher am oberen Rand des zu erwartenden Intervalls. Metastasen, vor allem in der Lunge, sind beim ACC häufig über viele Jahre asymptomatisch und nur durch hochauflösende CT-Untersuchungen darstellbar. In der Routine-Röntgen-Untersuchung des Thorax können diese leicht übersehen werden. Darüber hinaus können die Lungenfiliae zum Teil erst nach vielen Jahren visualisiert werden, obwohl einige Autoren postulieren, dass die Erkrankung bereits bei Erstdiagnose als Systemerkrankung zu betrachten ist [10,30]. Möglicherweise entstanden zudem Differenzen in den Ergebnissen aufgrund von Unterschieden in Eigenschaften des Patientenkollektivs und in der Größe der Patientenkohorte. Weitere Ergebnisse unserer Studie über die Lage der Fernmetastasen spiegeln sich in der

Literatur wider [54], denn am häufigsten traten Lungenmetastasen ($12/17 = 70,6\%$), gefolgt von Knochen ($3/17 = 17,6\%$) - und Gehirnmetastasen ($2/17 = 11,8\%$), auf. Lebermetastasen treten selten auf und konnten in unserer Kohorte nicht beschrieben werden.

Das Vorliegen einer soliden Komponente im histologischen Wachstumsmuster stellte sich in dieser Kohorte – wie in der Literatur ebenfalls beschrieben – als ein negativer prognostischer Marker dar ($p = 0,012$). Patienten, deren ACC histologisch solide Muster aufwiesen ($17/84 = 20,2\%$), lebten mit 90,5 Monaten im Median deutlich kürzer als Patienten mit ACC und nicht solider Histologie ($67/84 = 79,8\%$) mit 195,3 Monaten. Van Weert et al. [126] berichteten ebenfalls, dass das Vorliegen einer soliden Komponente im histologischen Tumorpräparat ein prognostisch schlechter Faktor sei.

Die 5-, 10- und 15-Jahresüberlebensraten von den 84 Patienten der Kohorte dieser Arbeit betrugen 59,8%, 31,8% und 20,7%. Die Angaben decken sich mit denen der Literatur, denn Van Weert et al. [125] berichteten von ihrer Studie mit 105 Patienten über 5-, 10- und 20-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten von 68%, 52% und 28%. Chundru et al. [27] beschrieben ein generelles Überleben von 75% nach 5 Jahren, von 20% nach 10 Jahren und von 10% nach 15 Jahren. Ellington et al. [41] führten eine große Studie mit 3026 Patienten mit ACC im Kopf-Hals-Bereich durch und ermittelten 5-, 10- und 15-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten von 90,3%, 79,9% und 69,2%. In einer Studie von Lee et al. [68] lebten nach 5 Jahren 88,2% der 48 Patienten mit ACC in der Glandula parotis. Diese unterschiedlichen Angaben zu Überlebenszeiten resultieren unter anderem in den Unterschieden der Studien bezüglich Qualität und Länge des Beobachtungszeitraums [30] und in Differenzen im Geschlecht, dem Familienstand, dem Ort des Primärtumors, den Therapiemaßnahmen und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen [41,68]. Die geringen mittel- und langfristigen Überlebensraten ergeben sich aus dem Auftreten von lokalen (Spät-)Rezidiven und Fernmetastasen, die sich typischerweise zuerst in der Lunge manifestieren [30]. Diese sind in den ersten Jahren der Erkrankung meist asymptomatisch, langfristig jedoch prognoselimitierend. Van der Wal et al. [124] konnten in einer Studie aufzeigen, dass die

durchschnittliche Zeit zwischen Auftreten einer Lungenmetastase und dem Tod 32,3 Monate betrug, was sich auch in der vorliegenden Arbeit mit 35,8 Monaten bestätigt. Die Standardtherapie des ACCs im Kopf-Hals-Bereich stellt die radikale operative Resektion des Tumors dar [18]. Der Großteil der Patienten erhielt mit 81,5% (66/81) eine Operation mit adjuvanter Bestrahlung. Der Anteil der Patienten mit einer alleinigen operativen Versorgung betrug 18,5% (15/81). Unter den Patienten, die operiert und adjuvant bestrahlt wurden, befanden sich signifikant mehr Patienten mit positiven Resektionsrändern (32/57 = 56,1%, $p = 0,042$) und mehr mit einer perineuralen Invasion (37/48 = 77,1%, $p = 0,017$) als Patienten in einer R0-Situation (25/57 = 43,9%) und ohne perineuraler Invasion (11/48 = 22,9%). Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenen Stadien wurden zwar häufiger adjuvant bestrahlt (27/55 = 49,1%) als solche mit Tumoren in niedrigeren Stadien, dieser Unterschied verhielt sich jedoch in unserer Studie nicht signifikant ($p = 0,142$). Die Empfehlung zur Radiotherapie bei Risikopatienten mit positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion und fortgeschrittenem Tumorstadium lässt sich in der Literatur analog zu anderen Speicheldrüsenmalignomen wiederfinden [21,36,80]. Patienten unserer Studienkohorte, die operiert und bestrahlt wurden lebten insgesamt kürzer (medianes OS = 109,0 Monate) als Patienten nach alleiniger Operation (medianes OS nicht erreicht; $p = 0,023$). Dies lässt sich auf die höheren Tumorstadien, die perineurale Invasion und andere Risikofaktoren zurückführen, welche trotz multimodaler Therapie ein schlechteres Outcome bedingen als weniger fortgeschrittene Tumoren. In einer Studie von Marcinow et al. [80] nahm der Zusatz der adjuvanten Radiotherapie keinen statistisch signifikanten Einfluss auf Überlebenszeiten im Gegensatz zur rein kurativen operativen Resektion. Choi et al. [25] untersuchten in einer retrospektiven Studie an 88 Patienten die Rolle von postoperativer Radiotherapie beim ACC im Kopf-Hals-Bereich und kamen zu den Ergebnissen, dass bei Verwendung einer adäquaten Dosis das krankheitsfreie Intervall verlängert werden konnte und sich das ACC lokal besser kontrollieren lässt. Möglicherweise hängt der Erfolg der Therapie zusätzlich von Umweltfaktoren, Komorbiditäten oder Tumoreigenschaften ab, die in den Studien nicht berücksichtigt wurden. Im Falle eines inoperablen Rezidivs oder von Fernmetastasen sind die Behandlungsoptionen sehr limitiert, was eine erneute (palliative) Radiotherapie oder systemische Therapie notwendig macht. Bisherige Systemtherapien

mit klassischen Chemotherapien oder auch zielgerichteten Therapien zeigen jedoch kaum Wirksamkeit [18].

Neue immuntherapeutische Behandlungsstrategien zeigten in klinischen Studien erste hoffnungsvolle Ergebnisse [8,18]. Grundsätzlich soll eine Immuntherapie das körpereigene Immunsystem passiv oder aktiv stimulieren und somit zelluläre Reaktionen von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen und Antikörper-Reaktionen auslösen [101]. Durch die systemische Wirkung ist die Unabhängigkeit von der primären Tumorlokalisation und der Therapieeffekt auch – oder insbesondere – im metastasierten Tumorstadium gegeben.

Neue Studien über Checkpoint-Inhibitoren (CTLA-4- und PD-L1-Blockade) führten beim malignen Melanom durch eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeiten im palliativen Stadium zu einem Paradigmenwechsel [16]. CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) und PD-1 (programmed cell death protein 1) sind Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen und anderen Immunzellen, die bei Bindung durch ihre Liganden inhibitorische Signalwege triggern und die T-Zellaktivität dämpfen. Dies kann einerseits Autoimmunität verhindern, andererseits können Tumorzellen, welche mithilfe des Liganden PD-L1 an PD-1 binden, die Immunantwort unterdrücken und so dem Immunsystem entkommen – ein sogenannter „Immune Escape“ [140]. Antikörper, die CTLA-4 (Ipilimumab) und PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) blockieren, aktivieren – bzw. disinhibieren – somit das Immunsystem, welches in Folge aktiv gegen Tumorzellen vorgehen kann [140]. In klinischen Studien konnten unter anderem beim malignen Melanom, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und Nierenzellkarzinom sehr erfolgversprechende Ergebnisse bezüglich Tumorregression und Krankheitsstabilisierung erzielt werden [16,83]. An Patienten mit ACC wurden diese Immuncheckpoint-Inhibitoren bisher nicht eingesetzt. Die Expression von PD-1 und PD-L1 im ACC wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe untersucht.

Ein anderer Ansatz in der Forschung um neue Immuntherapien stellt die Vakzinierung mit Antigenen dar. In klinischen Studien an Patienten mit Ösophagus-, Magen- und Lungenkarzinomen konnten spezifische humorale Immunantworten mit Anti-

körperbildung nach Vakzinierungen mit MAGE-A4 nachgewiesen werden [105]. Dabei wiesen Probanden mit einer erhöhten MAGE-A4-Expression und einer spezifischen Antikörperbildung ein längeres Gesamtüberleben auf als solche ohne Immunantwort. Der Versuch einer Vakzinierung mit MAGE-A3 im Rahmen einer adjuvanten Therapie nach Resektion von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zeigte eine gute Verträglichkeit [1]. Darüber hinaus wird NY-ESO-1 unter anderem im multiplem Myelom, malignen Melanom, Lungen-, Blasen-, Ösophagus- und Mammakarzinom überexprimiert [59,110,128,130]. Eine Therapie mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine, ein demethylierendes Agens, induziert die NY-ESO-1-Expression und erleichtert die Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten und damit folglich die Zerstörung der Tumorzellen [62,136]. Patienten, welche aufgrund eines Melanoms mit Ipilimumab therapiert wurden und gleichzeitig NY-ESO-1-seropositiv waren, und vor allem NY-ESO-1-spezifische Antikörper und CD8⁺-T-Zellen im Serum aufwiesen, sprachen besser auf die Therapie mit Ipilimumab an als NY-ESO-1-seronegative Patienten [142]. In einer klinischen Studie an Patienten mit metastasiertem malignen Melanom, die eine Vakzine aus multiplen Proteinen, unter anderem aus NY-ESO-1, kombiniert mit Nivolumab erhielten, konnte eine erhöhte antigenspezifische CD8⁺-Zellzahl nach Therapie erzielt werden [47].

Häufig wird der Einfluss tumorinfiltrierender Immunzellen auf das Immunsystem, die Tumorprogression und den prognostischen Vorhersagewert diskutiert [44]. Tumorinfiltrierende Immunzellen sind unter anderem verschiedene T-Zell-Typen, B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und regulatorische Immunzellen, die sich im Zentrum des Tumors, am Rand oder in tertiärem lymphatischem Gewebe ansammeln. Tertiäres lymphatisches Gewebe ist physiologisch nur mit wenigen Immunzellen besiedelt. Im Falle von chronischer Immunstimulation wandern dort jedoch vermehrt Immunzellen ein, welche ektipe Lymphozytenaggregate bilden und Merkmale sekundär lymphatischen Gewebes (Lymphfollikel, Lymphknoten, Milz) zeigen. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende Immunzellen wichtige Prognosefaktoren bei Tumoren, wie etwa dem kolorektalen Karzinom und dem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, darstellen [6,45,52]. Dabei sind die Zusammensetzung der unterschiedlichen Immunzellen, die Dichte (Zellanzahl pro mm²) und ihre Lokali-

sation (Tumorzentrum, -rand, -stroma) wichtige Faktoren [6,45]. Beim kolorektalen Karzinom sinkt die Immunzellichte von CD4⁺-und CD8⁺-Zellen bei Tumorinvasion und in fortgeschrittenen T-Stadien [44]. Noch sind keine vergleichbaren Daten für tumorinfiltrierende Zellen beim ACC bekannt. Dies ist ein interessanter Ansatzpunkt für die weitere Forschung.

5 Zusammenfassung

In einem multizentrisch erfassten Kollektiv wurden 84 Fälle mit einem adenoidzystischen Karzinom (ACC) im Kopf-Hals-Bereich immunhistochemisch auf Expressionen der tumorspezifischen Cancer-Testis-Antigene pan-MAGE (melanoma associated antigen) und NY-ESO-1 untersucht und die Expression mit den klinischen Daten korreliert. Ziel der Arbeit war die Identifikation möglicher Prognoseparameter und potentieller therapeutisch nutzbarer Zielmoleküle.

Die Gewebeschnitte wurden mit der indirekten Methode immunhistochemisch behandelt. Es wurden folgende Antikörper und Verdünnungen verwendet: NY-ESO-1 (E978) 1:200 und pan-MAGE (M3H67) 1:1000. Die immunhistochemischen Auswertungen erfolgten unter dem Lichtmikroskop und die statistischen Berechnungen mit IBM® SPSS® Version 21 bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Ein positiver Lymphknotenstatus ($p = 0,008$), ein fortgeschrittenes T-Stadium (Größe und Ausdehnung des Tumors, $p = 0,044$), das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose ($p = 0,002$), Tumore in anderen Drüsen als den großen Speicheldrüsen im Kopf-Hals-Bereich ($p = 0,047$), ein positiver Resektionsstatus ($p = 0,028$), das Auftreten von Fernmetastasen im Krankheitsverlauf ($p = 0,003$), eine perineurale Invasion ($p = 0,025$) und ein solides histologisches Wachstumsmuster ($p = 0,012$) waren für die Gesamtüberlebenszeit signifikant ungünstige Prognosefaktoren. Hohe T-Stadien ($p = 0,006$) und das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose ($p < 0,0001$) sowie eine perineurale Invasion ($p = 0,039$) verkürzten die progressionsfreie Überlebenszeit signifikant.

NY-ESO-1-Antigene exprimierten sich in 57,1% (48/84) und pan-MAGE-Antigene in 33,3% (28/84) der Fälle. Eine Koexpression beider Antigene fand sich in 23,8% (20/84) der Fälle. Eine NY-ESO-1-Expression zeigte sich häufiger (31/48 = 64,6%) in Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, die nicht die großen Speicheldrüsen befielen, als in Tumoren der großen Speicheldrüsen (17/48 = 35,4%, $p = 0,037$). Pan-MAGE-negative Patienten wiesen signifikant häufiger keine Lymphknotenmetastasen (20/24 = 83,3%) als einen positiven Lymphknotenstatus (4/24 = 16,7%) auf ($p = 0,045$). Die

medianen Überlebenszeiten lassen mit 130,8 Monaten bei NY-ESO-1-positiven und mit 105,3 Monaten bei pan-MAGE-positiven Patienten versus 282,0 Monaten bei NY-ESO-1-negativen und 190,5 Monaten bei pan-MAGE-negativen Patienten einen prognostischen Trend zu kürzeren Überlebenszeiten bei einer Antigenexpression erkennen, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,223$ für NY-ESO-1 und $p = 0,096$ für pan-MAGE). Die simultane Expression beider Antigene ging jedoch mit einer signifikant niedrigeren Gesamtüberlebenszeiten einher (90,5 Monate versus 282,0 Monate, $p = 0,047$). Analog dazu gilt eine Cancer-Testis-Antigen- bzw. Genexpression unter anderem beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs, beim kleinzelligen Lungenkarzinom, beim Mammakarzinom und beim Urothelkarzinom als ein prognostischer Marker für eine geringere Überlebenszeit.

Eine Neigung zur Fernmetastierung ($24/46 = 52,2\%$) konnte in der vorliegenden Studie gemäß der Natur des ACCs bestätigt werden. Diese Tatsache bedingt die geringen mittel- und langfristigen Überlebensraten von 31,8% nach 10 Jahren und 20,7% nach 15 Jahren. Der Großteil der Patienten dieser Arbeit erhielt eine standardgemäße operative Tumorentfernung mit adjuvanter Strahlentherapie (81,5%).

Da eine Chemotherapie bei Patienten mit inoperablem ACC oder einem ACC in fortgeschrittenem Stadium schlechte Ansprechraten aufweist, wird nach alternativen Behandlungskonzepten zur Verbesserung der Therapie und des Überlebens insbesondere im rezidierten und fernmetastasierten Zustand geforscht. Es wurden unter anderem Studien zu Vakzinierungen mit MAGE-Antigenen an Ösophagus-, Magen- und Lungenkarzinomen und an malignen Melanomen durchgeführt, die nach erfolgter Immunantwort mit spezifischer Antikörperbildung in einer längeren Überlebenszeit für die betroffenen Patienten resultierten. Vergleichbare Studien erscheinen nach den Expressionsmustern der Cancer-Testis-Antigene der vorliegenden Arbeit erfolgversprechend, die an multizentrischen Kollektiven erprobt werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

1. Adam V, Wauters I, Vansteenkiste J: Melanoma-associated antigen-A3 vaccination in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 14: 365-376 (2014)
2. Adenoid Cystic Carcinoma Organization International. Quick Facts and Statistics for ACC: <http://www.accoi.org/faq/acc-statistics/> (01.12.2016)
3. Agulnik M, Cohen E W, Cohen R B, Chen E X, Vokes E E, Hotte S J, Winkquist E, Laurie S, Hayes D N, Dancey J E, Brown S, Pond G R, Lorimer I, Daneshmand M, Ho J, Tsao M S, Siu L L: Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands. *J Clin Oncol*, 25: 3978-3984 (2007)
4. American Joint Committee on Cancer (AJCC): Major Salivary Glands (Parotid, submandibular, and sublingual). In: Edge S, Byrd D R, Compton C C, Fritz A G, Greene F L and Trotti A (Hrsg) *AJCC Cancer Staging Manual*, 7. Aufl., Springer, New York, S. 79-86 (2010)
5. Amit M, Binenbaum Y, Sharma K, Ramer N, Ramer I, Agbetoba A, Miles B, Yang X, Lei D, Bjoerndal K, Godballe C, Mucke T, Wolff K D, Fliss D, Eckardt A M, Copelli C, Sesenna E, Palmer F, Patel S, Gil Z: Adenoid cystic carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: a meta-analysis. *J Neurol Surg B Skull Base*, 74: 118-125 (2013)
6. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Lacourreye O, Bruneval P, Fridman W H, Brasnu D F, Tartour E: Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 12: 465-472 (2006)
7. Batsakis J G: Carcinomas of the submandibular and sublingual glands. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 95: 211-212 (1986)
8. Bell D, Roberts D, Kies M, Rao P, Weber R S, El-Naggar A K: Cell type-dependent biomarker expression in adenoid cystic carcinoma: biologic and therapeutic implications. *Cancer*, 116: 5749-5756 (2010)

9. Bhattasali O, Holliday E, Kies M S, Hanna E Y, Garden A S, Rosenthal D I, Morrison W H, Gunn G B, Fuller C D, Zhu X R, Frank S J: Definitive proton radiation therapy and concurrent cisplatin for unresectable head and neck adenoid cystic carcinoma: A series of 9 cases and a critical review of the literature. *Head Neck*, 38 Suppl 1: E1472-80 (2016)
10. Bhayani M K, Yener M, El-Naggar A, Garden A, Hanna E Y, Weber R S, Kupferman M E: Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer*, 118: 2872-2878 (2012)
11. Bien S: The history of radical dissection of cervical lymph nodes--in centenary of George Crile publication. *Otolaryngol Pol*, 60: 5-8 (2006)
12. Binesh F, Akhavan A, Masumi O, Mirvakili A, Behniafard N: Clinicopathological review and survival characteristics of adenoid cystic carcinoma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 67: 62-66 (2015)
13. Bishop J A, Ogawa T, Stelow E B, Moskaluk C A, Koch W M, Pai S I, Westra W H: Human papillomavirus-related carcinoma with adenoid cystic-like features: a peculiar variant of head and neck cancer restricted to the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*, 37: 836-844 (2013)
14. Boon T, van der Bruggen P: Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*, 183: 725-729 (1996)
15. Bradley P J: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 12: 127-132 (2004)
16. Brahmer J R, Tykodi S S, Chow L Q, Hwu W J, Topalian S L, Hwu P, Drake C G, Camacho L H, Kauh J, Odunsi K, Pitot H C, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay T M, Alaparthi S, Grosso J F, Korman A J, Parker S M, Agrawal S, Goldberg S M, Pardoll D M, Gupta A, Wigginton J M: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 366: 2455-2465 (2012)
17. Brill L B, 2nd, Kanner W A, Fehr A, Andren Y, Moskaluk C A, Loning T, Stenman G, Frierson H F, Jr: Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Mod Pathol*, 24: 1169-1176 (2011)

18. Büchsenschütz K, Veit J A, Schuler P J, Thierauf J, Laban S, Fahimi F, Bankfalvi A, Lang S, Sauerwein W, Hoffmann T K: Molecular approaches to systemic therapy of adenoid cystic carcinoma of the head and neck area. *Laryngorhinootologie*, 93: 657-664 (2014)
19. Buda-Nowak A, Swiader M, Puskulluoglu M, Dyduch G, Krupinski M, Krzemienecki K: Adenoid cystic carcinoma of the external auditory canal with metastases to lymph nodes and lungs--problematic diagnosis and treatment based on a case report. *Przegl Lek*, 72: 383-386 (2015)
20. Caballero O L, Chen Y T: Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*, 100: 2014-2021 (2009)
21. Cerda T, Sun X S, Vignot S, Marcy P Y, Baujat B, Baglin A C, Ali A M, Testelin S, Rey E, Janot F, Thariat J: A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Crit Rev Oncol Hematol*, 91: 142-158 (2014)
22. Chau N G, Hotte S J, Chen E X, Chin S F, Turner S, Wang L, Siu L L: A phase II study of sunitinib in recurrent and/or metastatic adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary glands: current progress and challenges in evaluating molecularly targeted agents in ACC. *Ann Oncol*, 23: 1562-1570 (2012)
23. Chen Y T: Detection of cancer/testis antigens as a diagnostic tool in routine pathology practice. *Oncoimmunology*, 3: e28132 (2014)
24. Chen Y T, Scanlan M J, Sahin U, Tureci O, Gure A O, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old L J: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 1914-1918 (1997)
25. Choi Y, Kim S B, Yoon D H, Kim J Y, Lee S W, Cho K J: Clinical characteristics and prognostic factors of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*, 123: 1430-1438 (2013)
26. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S: An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res*, 61: 5544-5551 (2001)

27. Chundru N S, Amudala R, Thankappan P, Nagaraju C D: Adenoid cystic carcinoma of palate: A case report and review of literature. *Dent Res J (Isfahan)*, 10: 274-278 (2013)
28. Ciccolallo L, Licitra L, Cantu G, Gatta G, EURO CARE Working Group: Survival from salivary glands adenoid cystic carcinoma in European populations. *Oral Oncol*, 45: 669-674 (2009)
29. Clauditz T S, Reiff M, Gravert L, Gnoss A, Tsourlakis M C, Munscher A, Sauter G, Bokemeyer C, Knecht R, Wilczak W: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in salivary gland carcinomas. *Pathology*, 43: 459-464 (2011)
30. Coca-Pelaz A, Rodrigo J P, Bradley P J, Vander Poorten V, Triantafyllou A, Hunt J L, Stojan P, Rinaldo A, Haigentz M, Jr, Takes R P, Mondin V, Teymoortash A, Thompson L D, Ferlito A: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck - An update. *Oral Oncol*, 51: 652-661 (2015)
31. Combs S E, Han G, Mani N, Beruti S, Nerenberg M, Rimm D L: Loss of antigenicity with tissue age in breast cancer. *Lab Invest*, 96: 264-269 (2016)
32. Dagan R, Bryant C, Li Z, Yeung D, Justice J, Dzieglewski P, Werning J, Fernandes R, Pirgousis P, Lanza D C, Morris C G, Mendenhall W M: Outcomes of Sinonasal Cancer Treated With Proton Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 95: 377-385 (2016)
33. Daponte A, Grayson W, Moisuc D, Ebrahim S, Guidozzi F: Adenoid cystic carcinoma stage Ib1 treated with radical surgery displaying human papilloma virus 33 (HPV 33): immunoelectron microscopy and review. *Gynecol Oncol*, 90: 673-676 (2003)
34. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio J J, Szikora J P, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40: 360-369 (1994)
35. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T: DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, 19: 7327-7335 (1999)

36. Demiroz Abakay C, Sahinturk K, Turk A, Ozkan L, Ozmen A: Our results of postoperative radiation therapy in patients with salivary gland cancer. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 24: 316-323 (2014)
37. Ding L, Zhu S, Xie S, Wu X: Effect of exogenous bFGF on the proliferation of human adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 28: 227-229 (2008)
38. Dori S, Vered M, David R, Buchner A: HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*, 31: 463-467 (2002)
39. Douglas J G, Koh W J, Austin-Seymour M, Laramore G E: Treatment of salivary gland neoplasms with fast neutron radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 944-948 (2003)
40. Elkin A D, Jacobs C D: Tamoxifen for salivary gland adenoid cystic carcinoma: report of two cases. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134: 1151-1153 (2008)
41. Ellington C L, Goodman M, Kono S A, Grist W, Wadsworth T, Chen A Y, Owonikoko T, Ramalingam S, Shin D M, Khuri F R, Beitler J J, Saba N F: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 Surveillance, Epidemiology, and End Results data. *Cancer*, 118: 4444-4451 (2012)
42. Ferlito A, Shaha A R, Rinaldo A, Mondin V: Management of clinically negative cervical lymph nodes in patients with malignant neoplasms of the parotid gland. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 63: 123-126 (2001)
43. Figueiredo D L, Mamede R C, Spagnoli G C, Silva W A, Jr, Zago M, Neder L, Jungbluth A A, Saggioro F P: High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and gage in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Head Neck*, 33: 702-707 (2011)
44. Fridman W H, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12: 298-306 (2012)
45. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc P H, Trajanoski Z, Fridman W H, Pages F: Type, density, and location of immune cells

- within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313: 1960-1964 (2006)
46. Gensheimer M F, Rainey D, Douglas J G, Liao J J, Laramore G E, Jian-Amadi A, Chow L Q, Koh W J, Parvathaneni U: Neutron radiotherapy for adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland. *Ophthal Plast Reconstr Surg*, 29: 256-260 (2013)
 47. Gibney G T, Kudchadkar R R, DeConti R C, Thebeau M S, Czupryn M P, Tetteh L, Eysmans C, Richards A, Schell M J, Fisher K J, Horak C E, Inzunza H D, Yu B, Martinez A J, Younos I, Weber J S: Safety, correlative markers, and clinical results of adjuvant nivolumab in combination with vaccine in resected high-risk metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 21: 712-720 (2015)
 48. Goitein M: Trials and tribulations in charged particle radiotherapy. *Radiother Oncol*, 95: 23-31 (2010)
 49. Gomes C C, Diniz M G, Orsine L A, Duarte A P, Fonseca-Silva T, Conn B I, De Marco L, Pereira C M, Gomez R S: Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. *PloS One*, 7: e41261 (2012)
 50. Guo L, Sang M, Liu Q, Fan X, Zhang X, Shan B: The expression and clinical significance of melanoma-associated antigen-A1, -A3 and -A11 in glioma. *Oncol Lett*, 6: 55-62 (2013)
 51. Gure A O, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera C A, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson A J, Chen Y T, Old L J, Altorki N K: Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 8055-8062 (2005)
 52. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, Pommerencke T, von Knebel D M, Folprecht G, Lubert B, Feyen N, Martens U M, Beckhove P, Gnjjatic S, Schirmacher P, Herpel E, Weitz J, Grabe N, Jaeger D: Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res*, 71: 5670-5677 (2011)
 53. Hanna E, Vural E, Prokopakis E, Carrau R, Snyderman C, Weissman J: The sensitivity and specificity of high-resolution imaging in evaluating perineural spread of adenoid cystic carcinoma to the skull base. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133: 541-545 (2007)

54. Harish K, Mangala Gouri S R: Adenoid cystic carcinoma of the parotid metastasizing to liver: case report. *BMC Cancer*, 4: 41 (2004)
55. Hayashi Y, Iwato M, Kita D, Miyashita K, Yoshizaki T, Hamada J: Adenoid cystic carcinoma in the cavernous sinus diagnosed with the endoscopic endonasal approach. *Turk Neurosurg* 24: 814-818 (2014)
56. Ho K, Lin H, Ann D K, Chu P G, Yen Y: An overview of the rare parotid gland cancer. *Head Neck Oncol*, 14;3: 40 (2011)
57. Huber P E, Debus J, Latz D, Zierhut D, Bischof M, Wannenmacher M, Engenhart-Cabillic R: Radiotherapy for advanced adenoid cystic carcinoma: neutrons, photons or mixed beam? *Radiother Oncol*, 59: 161-167 (2001)
58. Inaoka R J, Jungbluth A A, Baiocchi O C, Assis M C, Hanson N C, Frosina D, Tassello J, Bortoluzzo A B, Alves A C, Colleoni G W: An overview of cancer/testis antigens expression in classical Hodgkin's lymphoma (cHL) identifies MAGE-A family and MAGE-C1 as the most frequently expressed antigens in a set of Brazilian cHL patients. *BMC Cancer*, 11: 416 (2011)
59. Jungbluth A A, Chen Y T, Stockert E, Busam K J, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Old L J: Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer*, 92: 856-860 (2001)
60. Khan S, Agwani K, Bhargava P, Kumar S P: Adenoid cystic carcinoma presenting as an ulcer on the floor of the mouth: a rare case report. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 40: 253-257 (2014)
61. Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, Matsuo K, Okamura K, Komatsu S, Rasul A M, Sakai H: Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol*, 37: 315-322 (2001)
62. Klar A S, Gopinadh J, Kleber S, Wadle A, Renner C: Treatment with 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Expression of NY-ESO-1 and Facilitates Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Tumor Cell Killing. *PloS One*, 10: e0139221 (2015)
63. Kondo S, Mukudai Y, Soga D, Nishida T, Takigawa M, Shiota T: Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell

- lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Anticancer Res*, 34: 671-677 (2014)
64. Kowalski P J, Paulino A F: Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: Its causation/promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol*, 33: 933-936 (2002)
 65. Kumar V, Abbas A, Aster J: Diseases of Salivary Glands. In: Kumar V, Abbas A and Aster J (Hrsg) *Robbins Basic Pathology*, 9. Aufl, Elsevier Saunders, Kanada, S. 555-557 (2013)
 66. Laban S, Atanackovic D, Luetkens T, Knecht R, Busch C J, Freytag M, Spagnoli G, Ritter G, Hoffmann T K, Knuth A, Sauter G, Wilczak W, Blessmann M, Borgmann K, Muenscher A, Clauditz T S: Simultaneous cytoplasmic and nuclear protein expression of melanoma antigen-A family and NY-ESO-1 cancer-testis antigens represents an independent marker for poor survival in head and neck cancer. *International journal of cancer*. In *J Cancer*, 135:1142-1152 (2014)
 67. Laurie S A, Ho A L, Fury M G, Sherman E, Pfister D G: Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review. *Lancet Oncol*, 12: 815-824 (2011)
 68. Lee S K, Kwon M S, Lee Y S, Choi S H, Kim S Y, Cho K J, Nam S Y: Prognostic value of expression of molecular markers in adenoid cystic cancer of the salivary glands compared with lymph node metastasis: a retrospective study. *World J Surg Oncol*, 10: 266 (2012)
 69. Lee S Y, Kim B H, Choi E C: Nineteen-year oncologic outcomes and the benefit of elective neck dissection in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Head Neck*, 36: 1796-1801 (2014)
 70. Lennerz V: Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell MZ7. *Med Dissertation*, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (2002)
 71. Linton O R, Moore M G, Brigance J S, Summerlin D J, McDonald M W: Proton therapy for head and neck adenoid cystic carcinoma: initial clinical outcomes. *Head Neck*, 37: 117-124 (2015)
 72. Liu J, Shao C, Tan M L, Mu D, Ferris R L, Ha P K: Molecular biology of adenoid cystic carcinoma. *Head Neck*, 34: 1665-1677 (2012)

73. Liu J, Wang G, Okutomi T, Chen Z: Expression of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in human salivary gland carcinomas. *Chin Med J (Engl.)*, 116: 897-900 (2003)
74. Liu Y, Li J, Tan Y R, Xiong P, Zhong L P: Accuracy of diagnosis of salivary gland tumors with the use of ultrasonography, computed tomography, and magnetic resonance imaging: a meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 119: 238-245.e2 (2015)
75. Locati L D, Bossi P, Perrone F, Potepan P, Crippa F, Mariani L, Casieri P, Orsenigo M, Losa M, Bergamini C, Liberatoscioli C, Quattrone P, Calderone R G, Rinaldi G, Pilotti S, Licitra L: Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: A phase II study. *Oral Oncol*, 45: 574-578 (2009)
76. Lüllmann-Rauch R: Methoden: Standardpräparate für die Lichtmikroskopie. In: Georg Thieme Verlag KG (Hrsg) Taschenlehrbuch Histologie, 3.Aufl, Stuttgart, S. 603-604 (2009)
77. Madabhavi I, Patel A, Anand A, Panchal H, Parikh S: Primary Mediastinal Synovial Sarcoma with subsequent development of Primary Adenoid Cystic Carcinoma of Lung presenting as superior vena cava syndrome. *Clin Respir J*, 2016 (Epub ahead of print),
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26992072?dopt=abstract>, 23.08.2017
78. Mairembam P, Jay A, Beale T, Morley S, Vaz F, Kalavrezos N, Kocjan G: Salivary gland FNA cytology: role as a triage tool and an approach to pitfalls in cytomorphology. *Cytopathology*, 27: 91-96 (2016)
79. Marchiano E, Chin O Y, Fang C H, Park R C, Baredes S, Eloy J A: Laryngeal Adenoid Cystic Carcinoma: A Systematic Review. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 154: 433-439 (2016)
80. Marcinow A, Ozer E, Teknos T, Wei L, Hurtuk A, Old M, Agrawal A, Carrau R, Iwenofu O H: Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single institutional experience at a tertiary care center. *Head Neck*, 36: 1705-1711 (2014)
81. Mardi K, Kaushal V, Uppal H: Cytodiagnosis of intracranial metastatic adenoid cystic carcinoma: Spread from a primary tumor in the lacrimal gland. *J Cytol*, 28: 200-202 (2011)

82. Matkovic B, Juretic A, Spagnoli G C, Separovic V, Gamulin M, Separovic R, Saric N, Basic-Koretic M, Novosel I, Kruslin B: Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat Med J*, 52: 171-177 (2011)
83. Medina P J, Adams V R: PD-1 Pathway Inhibitors: Immuno-Oncology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*, 36: 317-334 (2016)
84. Mendenhall W M, Dagan R, Bryant C M, Amdur R J: Definitive Radiotherapy for Skin and Adenoid Cystic Carcinoma with Perineural Invasion. *J Neurol Surg B Skull Base*, 77: 169-172 (2016)
85. Mendenhall W M, Morris C G, Amdur R J, Werning J W, Hinerman R W, Villaret D B: Radiotherapy alone or combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 26: 154-162 (2004)
86. Min R, Siyi L, Wenjun Y, Ow A, Lizheng W, Minjun D, Chenping Z: Salivary gland adenoid cystic carcinoma with cervical lymph node metastasis: a preliminary study of 62 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41: 952-957 (2012)
87. Mitani Y, Li J, Rao P H, Zhao Y J, Bell D, Lippman S M, Weber R S, Caulin C, El-Naggar A K: Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res*, 16: 4722-4731 (2010)
88. Morimoto K, Demizu Y, Hashimoto N, Mima M, Terashima K, Fujii O, Otsuki N, Murakami M, Fuwa N, Nibu K: Particle radiotherapy using protons or carbon ions for unresectable locally advanced head and neck cancers with skull base invasion. *Jpn J Clin Oncol*, 44: 428-434 (2014)
89. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber P A, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz L O, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside T L, Homey B, Hoffmann T K: Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int J Cancer*, 118: 2147-2157 (2006)
90. Nagel H, Laskawi R, Eifert H, Schlott T: Analysis of the tumour suppressor genes, FHIT and WT-1, and the tumour rejection genes, BAGE, GAGE-1/2, HAGE,

- MAGE-1, and MAGE-3, in benign and malignant neoplasms of the salivary glands. *Mol Pathol*, 56: 226-231 (2003)
91. Nascimento A G, Amaral A L, Prado L A, Kligerman J, Silveira T R: Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer*, 57: 312-319 (1986)
 92. Nasser S M, Faquin W C, Dayal Y: Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am J Clin Pathol*, 119: 801-806 (2003)
 93. Ou Yang K X, Liang J, Yang Z N, Zhao J J: A study on the inhibition of VEGF expression in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells via iNOS gene RNAi in vitro. *J Oral Pathol Med*, 44: 153-158 (2015)
 94. Park J H, Do N Y, Han S I, Lim S C: Usefulness of the melanoma antigen gene (MAGE) in making the differential diagnosis between pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 41: 20-29 (2012)
 95. Park J W, Kwon T K, Kim I H, Sohn S S, Kim Y S, Kim C I, Bae O S, Lee K S, Lee K D, Lee C S, Chang H K, Choe B K, Ahn S Y, Jeon C H: A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods*, 266: 79-86 (2002)
 96. Petrovan C, Nekula D M, Mocan S L, Voidazan T S, Cosarca A: Ultrasonography-histopathology correlation in major salivary glands lesions. *Rom J Morphol Embryol*, 56: 491-497 (2015)
 97. Pfeffer M R, Talmi Y, Catane R, Symon Z, Yosepovitch A, Levitt M: A phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncol*, 43: 33-36 (2007)
 98. Phuchareon J, van Zante A, Overdevest J B, McCormick F, Eisele D W, Tetsu O: c-Kit Expression is Rate-Limiting for Stem Cell Factor-Mediated Disease Progression in Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Glands. *Transl Oncol*, 7: 537-545 (2014)
 99. Pires F R, da Cruz Perez D E, de Almeida O P, Kowalski L P: Estrogen receptor expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 10: 166-168 (2004)

100. Pramoonjago P, Baras A S, Moskaluk C A: Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene*, 25: 5626-5639 (2006)
101. Pusztaszeri M P, Sadow P M, Ushiku A, Bordignon P, McKee T A, Faquin W C: MYB immunostaining is a useful ancillary test for distinguishing adenoid cystic carcinoma from pleomorphic adenoma in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer Cytopathol*, 122: 257-265 (2014)
102. Qian X, Kaufmann A M, Chen C, Tzamalīs G, Hofmann V M, Keilholz U, Hummel M, Albers A E: Prevalence and associated survival of high-risk HPV-related adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oncol*, 49: 803-811 (2016)
103. Rakhshani N, Kalantari E, Bakhti H, Sohrabi M R, Mehrazma M: Evaluation of HER-2/neu Overexpression in Gastric Carcinoma using a Tissue Microarray. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 7597-7602 (2014)
104. Roh J L, Ryu C H, Choi S H, Kim J S, Lee J H, Cho K J, Nam S Y, Kim S Y: Clinical utility of 18F-FDG PET for patients with salivary gland malignancies. *J Nucl Med*, 48: 240-246 (2007)
105. Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y: High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine*, 32: 5901-5907 (2014)
106. Salehinejad J, Mohtasham N, Bagherpour A, Abbaszadeh-Bidokhty H, Ghazi A: Evaluation of c-kit protein (CD117) expression in common salivary gland neoplasms. *J Oral Maxillofac Pathol*, 18: 177-182 (2014)
107. Samant S, van den Brekel M W, Kies M S, Wan J, Robbins K T, Rosenthal D I, Rasch C, Weber R S: Concurrent chemoradiation for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 34: 1263-1268 (2012)
108. Sang M, Wang L, Ding C, Zhou X, Wang B, Wang L, Lian Y, Shan B: Melanoma-associated antigen genes - an update. *Cancer Lett*, 302: 85-90 (2011)
109. Scanlan M J, Gure A O, Jungbluth A A, Old L J, Chen Y T: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 188: 22-32 (2002)

110. Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin D F, Reuter V E, Old L J, Jungbluth A A: Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*, 12: 5442-5447 (2006)
111. Shen C, Xu T, Huang C, Hu C, He S: Treatment outcomes and prognostic features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. *Oral Oncol*, 48: 445-449 (2012)
112. Shum J W, Chatzistefanou I, Qaisi M, Lubek J E, Ord R A: Adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands: a retrospective series of 29 cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 121: 210-214 (2016)
113. Silver C E, Rinaldo A, Ferlito A: Crile's neck dissection. *Laryngoscope*, 117: 1974-1977 (2007)
114. Simon R, Mirlacher M, Sauter G: Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods Mol Biol*, 664: 113-126 (2010)
115. Smith C, Cerundolo V: Immunotherapy of melanoma. *Immunology*, 104: 1-7 (2001)
116. Spiro R H: Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. *Am J Surg*, 174: 495-498 (1997)
117. Szanto P A, Luna M A, Tortoledo M E, White R A: Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer*, 54: 1062-1069 (1984)
118. Takagi M, Demizu Y, Hashimoto N, Mima M, Terashima K, Fujii O, Jin D, Niwa Y, Morimoto K, Akagi T, Daimon T, Sasaki R, Hishikawa Y, Abe M, Murakami M, Fuwa N: Treatment outcomes of particle radiotherapy using protons or carbon ions as a single-modality therapy for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*, 113: 364-370 (2014)
119. Tang Y, Liang X, Zhu G, Zheng M, Yang J, Chen Y: Expression and importance of zinc-finger transcription factor Slug in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *J Oral Pathol Med*, 39: 775-780 (2010)
120. Thierauf J: Diagnostischer Stellenwert der Feinnadelaspirationszytologie und der Grobnadelpunktion im Kopf-Hals-Bereich. *Med Dissertation, Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde* (2014)
121. Thierauf J, Veit J A, Grunow J, Doscher J, Weissinger S, Whiteside T, Beutner D, Plinkert P, Hoffmann T K, Hess J: Expression of Submaxillary Gland Androgen-

- regulated Protein 3A (SMR3A) in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Res*, 36: 611-615 (2016)
122. Trenkic Bozinovic M, Krasic D, Katic V, Krstic M: A retrospective review of 139 major and minor salivary gland tumors. *Med Glas (Zenica)*, 12: 73-78 (2015)
 123. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647 (1991)
 124. Van der Wal J E, Becking A G, Snow G B, van der Waal I: Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck*, 24: 779-783 (2002)
 125. Van Weert S, Bloemena E, van der Waal I, de Bree R, Rietveld D H, Kuik J D, Leemans C R: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. *Oral Oncol*, 49: 824-829 (2013)
 126. Van Weert S, van der Waal I, Witte B I, Leemans C R, Bloemena E: Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. *Oral Oncol*, 51: 71-76 (2015)
 127. Vander Poorten V, Hunt J, Bradley P J, Haigentz M, Jr, Rinaldo A, Mendenhall W M, Suarez C, Silver C, Takes R P, Ferlito A: Recent trends in the management of minor salivary gland carcinoma. *Head Neck*, 36: 444-455 (2014)
 128. Vaughan H A, Svobodova S, Macgregor D, Sturrock S, Jungbluth A A, Browning J, Davis I D, Parente P, Chen Y T, Stockert E, St Clair F, Old L J, Cebon J: Immunohistochemical and molecular analysis of human melanomas for expression of the human cancer-testis antigens NY-ESO-1 and LAGE-1. *Clin Cancer Res*, 10: 8396-8404 (2004)
 129. Veit J A, Heine D, Thierauf J, Lennerz J, Shetty S, Schuler P J, Whiteside T, Beutner D, Meyer M, Grunewald I, Ritter G, Gnjjatic S, Sikora A G, Hoffmann T K, Laban S: Expression and clinical significance of MAGE and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 38: 1008-1016 (2016)

130. Wada H, Sato E, Uenaka A, Isobe M, Kawabata R, Nakamura Y, Iwae S, Yonezawa K, Yamasaki M, Miyata H, Doki Y, Shiku H, Jungbluth A A, Ritter G, Murphy R, Hoffman E W, Old L J, Monden M, Nakayama E: Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer*, 123: 2362-2369 (2008)
131. Wang L, Sun M, Jiang Y, Yang L, Lei D, Lu C, Zhao Y, Zhang P, Yang Y, Li J: Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *J Oral Maxillofac Surg*, 64: 636-641 (2006)
132. Weber J, Salgaller M, Samid D, Johnson B, Herlyn M, Lassam N, Treisman J, Rosenberg S A: Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, 54: 1766-1771 (1994)
133. Weinberg R A: The biology of cancer. *Crowd Control: Tumor Immunology and Immunotherapy*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2. Auflage, S. 726-735 (2014)
134. Weinberg R A: The biology of cancer. *Histone modification and transcription factors control gene expression*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2. Auflage, S. 21-23 (2014)
135. Weinberg R A: The biology of cancer. *Patients' immune system can be mobilized to attack their tumors*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2. Auflage, S. 786-791 (2014)
136. Weiser T S, Guo Z S, Ohnmacht G A, Parkhurst M L, Tong-On P, Marincola F M, Fischette M R, Yu X, Chen G A, Hong J A, Stewart J H, Nguyen D M, Rosenberg S A, Schrupp D S: Sequential 5-Aza-2 deoxycytidine-depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1. *J Immunother*, 24: 151-161 (2001)
137. West R B, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick J S, Cao H, Kwok S, Montgomery K D, Varma S, Le Q T: MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol*, 35: 92-99 (2011)

138. Witt B L, Schmidt R L: Ultrasound-guided core needle biopsy of salivary gland lesions: a systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*, 124: 695-700 (2014)
139. Wittekind C, Meyer H. (Hrsg.): *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*, 7. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, S. 51-54 (2010)
140. Wolchok J D, Chan T A: Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature*, 515: 496-498 (2014)
141. Xiao J, Chen H S: Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol*, 10: 1849-1853 (2004)
142. Yuan J, Adamow M, Ginsberg B A, Rasalan T S, Ritter E, Gallardo H F, Xu Y, Pogoriler E, Terzulli S L, Kuk D, Panageas K S, Ritter G, Sznol M, Halaban R, Jungbluth A A, Allison J P, Old L J, Wolchok J D, Gnjatic S: Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16723-16728 (2011)
143. Zimmermann A K, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R: Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch*, 462: 565-574 (2013)
144. Zvrko E, Golubovic M: Laryngeal adenoid cystic carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 29: 279-282 (2009)

Danksagung

Ich möchte all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Besonders danke ich Professor Dr. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Johannes Veit für die wissenschaftliche Betreuung sowie die enge Zusammenarbeit. Er unterstützte und förderte mich jederzeit mit Rat und Tat.

Ich danke Dr. Julia Thierauf und Dr. Simon Laban, die mir bei experimentellen und statistischen Fragestellungen zur Seite standen.

Für die Bereitstellung der Antikörper und Unterstützung der Studie möchte ich mich bei Dr. Gerd Ritter vom New York Branch of the Ludwig Institute for Cancer Research at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) bedanken. Mein Dank gilt außerdem den kooperierenden Universitätskliniken in Pittsburgh (University Medical Centers of Pittsburgh, USA) und in Köln.

Ich danke den Mitarbeitern des HNO-Labors, die mich im experimentellen Teil der Dissertation unterstützten, und dem Pathologen der Universität Ulm, PD Dr. Jochen Lennerz, der mir mit der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zur Seite stand.

Ebenso möchte ich meiner Familie danken, die während der gesamten Zeit des Studiums und der Dissertation hinter mir stand und mich in allen Belangen unterstützt und ermutigt hat.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.