

Aus dem  
**Institut für Pathologie**  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Feller

---

**Molekular-biologisches Verhalten des Speicheldrüsenkarzinoms  
des Menschen und seine klinisch-pathologische Korrelation:  
Expression von Matrixmetalloproteinase -2, -9, Inhibitoren -1,-2  
der Matrixmetalloproteinasen, p53 und HER2/neu**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**-Aus der Medizinischen Fakultät-**

vorgelegt von

**Melanie Kühl**

aus Perleberg

Lübeck 2009

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Pierre Moubayed

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Sieg

Tag der mündlichen Prüfung:

07.07.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den

07.07.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Speicheldrüsenneoplasien	1
1.1.1	Epidemiologische Daten	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Therapie und Prognose	2
1.2	Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren	3
1.2.1	Allgemeines	3
1.2.2	Matrixmetalloproteinasen (MMP`s)	4
1.2.3	Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP`s)	7
1.3	Tumorsuppressorgen p53 und HER2/neu Onkogen	8
1.3.1	Tumorsuppressorgen p53	8
1.3.2	HER2/neu Onkogen	9
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Untersuchungsgruppe	13
3.2	Immunhistochemische Methoden	13
3.2.1	Prinzipien der Immunhistochemie	13
3.2.2	Darstellung und Erläuterung der angewendeten immunhistochemischen Techniken	14
3.2.3	Kontrollen	17
3.2.4	Mikroskopische Auswertung	18
3.3	Material	19
3.3.1	Reagenzien	19
3.3.2	Instrumente	21
<b>4.</b>	<b>Eigene Untersuchungen und Ergebnisse</b>	<b>22</b>
4.1	Klinische Daten	22
4.2	Expression von MMP-2, -9, TIMP-1, -2, p53 und HER2/neu in primären Speicheldrüsenneoplasien	24

4.3	Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf das Alter und Geschlecht der Patienten	29
4.4	Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf die Lokalisation	31
4.5	Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf das TNM-Stadium (I-IV)	33
4.6	Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf den histologischen Differenzierungsgrad und die Metastasierungsneigung	35
4.7	Darstellung der prognostisch relevanten Expressions- ergebnisse innerhalb der adenoidzystischen Karzinome, der Adenokarzinome (NOS) und der Mukoepidermoidkarzinome der Speicheldrüsen	38
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
5.1	Expression von MMP-2 und MMP-9 in primären Speichel- drüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-patho- logischen Parametern	40
5.2	Expression von TIMP-1 und TIMP-2 in primären Speichel- drüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-patho- logischen Parametern	41
5.3	Expression von p53 in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern	42
5.4	Expression von HER2/neu in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern	43
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	
A.	Abkürzungsverzeichnis	I
B.	Tabellen und Abbildungen	II

Inhaltsverzeichnis

C.	Danksagung	III
D.	Lebenslauf	IV

# **1. Einleitung**

## **1.1 Speicheldrüsenneoplasien**

### **1.1.1 Epidemiologische Daten**

Über die Epidemiologie der Speicheldrüsenneoplasien (SDN) liegen nur wenige Literaturberichte vor. Ihre Häufigkeit innerhalb aller Neoplasien der Kopf- und Halsregion wird mit 2 bis 6,5% beziffert (Spiro, 1986; Abiose et al., 1990; Madani und Beal, 2006). Sie sind durch eine Vielfalt histomorphologischer Differenzierungsformen charakterisiert und weisen eine unterschiedliche klinische, therapeutische und prognostische Relevanz auf (Calearo et al., 1998; Therkildsen et al., 1998; Ascani et al., 2006; Madani und Beal, 2006; Qing et al., 2006; Seethala et al., 2007).

Die jährliche Inzidenzrate scheint in verschiedenen geographischen Regionen erheblichen epidemiologischen Schwankungen zu unterliegen. Sie variiert zwischen 0,4 bis 13,5 Fällen pro 100.000 Einwohner (Jensen et al., 1985; Gunn und Parrot, 1988; Albeck et al., 1992; Pinkston und Cole, 1999).

Die Parotis stellt mit ca. 80% den häufigsten Prädilektionssitz für das Auftreten von SDN dar. Zudem werden diese Neoplasien häufiger bei älteren Menschen und beim männlichen Geschlecht beobachtet (Seifert et al., 1984; Ito et al., 2005; Madani und Beal, 2006).

### **1.1.2 Ätiologie**

In der Literatur werden zahlreiche Faktoren als Ursache für die Entstehung dieser Neoplasien diskutiert. Unter anderem werden virale Infektionen, Tabakkonsum, radiogene und genetische Faktoren als mögliche Urheber angegeben. Insbesondere Viren sollen dabei eine entscheidende Rolle spielen. Zum Beispiel wird das Epstein-Barr-Virus mit einem erhöhten Auftreten von lymphoepithelialen Karzinomen in Verbindung gebracht (Lanier et al., 1991; Larbcharoensub et al., 2006).

In diesem Kontext wird auch der Einfluß von Polyoma-, Zytomegalie-, humanem Papillomavirus Typ 16 und 18 und HIV auf die Entstehung von SDN diskutiert (Scully, 1988; Epstein und Scully, 1993; Shin et al., 2002; Rosso et al., 2006).

Während einzelne Autoren keinen Zusammenhang zwischen dem Tabakkonsum und einem erhöhtem Entstehungsrisiko von SDN gefunden haben (Keller, 1969; Williams und Horn, 1977), weisen andere Studien diesbezüglich auf Risiken des Nikotinabusus hin (Kotwall, 1992; Pinkston und Cole, 1996). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Strahlenexposition mit einem 3,5 - 11mal höheren Risiko für die Entwicklung einer SDN als bei der Normalbevölkerung verbunden ist (Beal et al., 2003; Zheng et al., 2004).

Eine familiäre Häufung bzw. Prädisposition wurde äußerst selten beschrieben (Noyek et al., 1980; Klausner und Handler, 1994).

### **1.1.3 Therapie und Prognose**

Die SDN weisen eine ganz erhebliche histologische Variationsbreite auf, wobei die Klassifikation heute überwiegend nach den Empfehlungen der WHO erfolgt (Barnes et al., 2005).

Die Angaben über die Häufigkeit der malignen Entitäten innerhalb der SDN variieren zwischen 21 bis 37%. Hierunter sind am häufigsten das Mukoepidermoidkarzinom (MEC), das adenoidzystische Karzinom (ACC), das NOS-Adenokarzinom (AC-NOS), das Azinuszellkarzinom (ACAC) und das undifferenzierte Karzinom (UC) vertreten (Spiro, 1986; Ellis und Auclair, 1991; Ito et al., 2005; Ascani et al., 2006; Madani und Beal, 2006). Seit langem stehen die malignen SDN wegen ihrer morphologischen Vielfalt und des empfindlichen Manifestationsortes im Mittelpunkt der klinischen und therapeutischen Interessen. Hierbei werden verschiedene therapeutische Ansätze und Alternativen diskutiert. Als Methode der Wahl hat sich die Resektion (en bloc), gegebenenfalls kombiniert mit einer Neck Dissection und/oder Strahlentherapie, bewährt (Chilla, 1995; Batsakis, 1999; Bell et al., 2005; Laurie und Licitra, 2006; Triantafillidou et al., 2006).

Es ist hinlänglich bekannt, dass die Kombination von Operation und Strahlentherapie die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant verbessern kann (Byun et al., 1980; Armstrong et al., 1990).

Eine postoperative Bestrahlung wurde unter anderem empfohlen bei Rezidiven, R1- oder R2-Resektion, Infiltration der Umgebungsstrukturen, Halslymphknotenmetastasen, T(3-4)-Karzinomen, Karzinomen mit hohem Malignitätsgrad und adenoidzystischen Karzinomen (Witten et al., 1990; Rice und Becker, 1994; Spiro, 1998; Terhaard et al., 2005; Triantafillidou et al., 2006). Die Chemotherapie wird bei der Behandlung von Speicheldrüsenkarzinomen palliativ als adjuvante Behandlungsform eingesetzt (Kaplan et al., 1986; Rice und Becker, 1994).

Die Prognose hängt in der Regel von der Lokalisation (Eneroth, 1976), dem TNM-Stadium (Pinto et al., 2000) und insbesondere den molekular biologischen Eigenschaften der einzelnen Entitäten (Levine et al., 1991; Giannoni et al., 1995; Hongnan et al., 1997; Xu et al., 2001) ab. Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Hinweise, dass die Prognose der primären Speicheldrüsenkarzinome eine Geschlechts- oder Altersprävalenz aufweist. Vor allem wurde beschrieben, dass ältere Patienten bei Erstdiagnose zu einem höheren Prozentsatz ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufweisen als jüngere Patienten (Spiro et al., 1989). Zudem soll das weibliche Geschlecht gegenüber den Männern einen besseren prognostischen Verlauf aufweisen (Kane et al., 1991).

Aufgrund der bislang ungünstigen Prognose der epithelialen malignen SDN, richtet sich das Augenmerk nunmehr auf neue Parameter in der Bewertung des biologischen Potentials der einzelnen Neoplasieentitäten.

## **1.2 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren**

### **1.2.1 Allgemeines**

Bei der Suche nach neuen Therapiestrategien zur Bekämpfung der Tumordinvasion und Metastasierung wurden allgemeine Erkenntnisse der aktuellen Tumorforschung zugrunde gelegt. Ein besonderes Interesse besteht an der Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix, insbesondere an der Veränderung des Expressionsverhaltens von Matrixmetalloproteinasen (De Clerck et al., 1994; Shapiro, 1998; Nagase und Woessner, 1999).

Die initiale Kanzerogenisierung von Körperzellen und die Entstehung autonomer Krebszellen stellen den Beginn der Entwicklung eines malignen Tumors dar.

Die Mutation und die ungehemmte Proliferation maligner Zellen lösen einen irreversiblen komplexen Prozess aus, der bis hin zu den Komplikationen einer Angioinvasion und einer Metastasierung von Kaskaden molekularbiologischer Vorgänge begleitet wird (Fearon und Vogelstein, 1990). Diese schließen unter anderem die enzymatischen Voraussetzungen für die Ablösung von malignen Tumorzellen aus dem Zellverband und die Durchwanderung der extrazellulären Matrix ein (Liotta und Kohn, 1990). Offensichtlich spielen dabei Gewebemediatoren, Oberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren und verschiedene Proteinase, welche wiederum der Kontrolle von Proenzymen und spezifischen Inhibitoren unterliegen, eine entscheidende Rolle (Flug und Kopf-Maier, 1995; Chambers und Matrisian, 1997; Curran und Murray, 2000).

Proteinase, welche von invasiven Tumorzellen und tumorumgebenden Stromazellen gebildet werden, nehmen aktiv an der Auflösung der extrazellulären Matrix teil und lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen (Mignatti und Pifkin, 1993).

Eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von malignen Tumoren in der Humanpathologie spielen Matrixmetalloproteinase (Charous et al., 1997; Brummer et al., 1999; Kayano et al., 2004; Nagel et al., 2004; Westernoff et al., 2005).

.

### **1.2.2 Matrixmetalloproteinase (MMP`s)**

MMP`s sind endogene Proteinase mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix einschließlich der Basalmembran aufzuspalten (Chambers und Matrisian, 1997; Massova et al., 1998; Curran und Murray, 2000).

Sie gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und zum Um- und Abbau von Gewebe führen. Bei physiologischen Prozessen, wie bei der Gewebsneubildung und dem Wachstum einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung, ist die Funktion dieser Enzyme von wesentlicher Bedeutung für den Organismus. Aber auch bei pathologischen Veränderungen spielen die katalytischen Aktivitäten der MMP`s und deren Regulierung eine wichtige Rolle. Solche Veränderungen wurden bei der rheumatoiden Arthritis, Leberzirrhose, beim

Sjogren Syndrom und bei Wundheilungsstörungen nachgewiesen (Matrisian, 1992; Wu et al., 1997).

MMP`s bilden eine Gruppe von zinkhaltigen Endopeptidasen. Sie umfassen 15 Enzyme, die entsprechend ihrer bevorzugten Substratspezifität und Struktur in Subklassen eingeteilt werden (Stetler-Stevenson et al., 1996; Johansson et al., 2000).

Im Mittelpunkt vielfacher Untersuchungen steht das Verhalten von MMP`s bei den Mechanismen der Tumorprogression (Brummer et al., 1999; Ellenrieder et al., 2000; O-charoenrat et al., 2001; Kayano et al., 2004; Nagel et al., 2004; Tian et al., 2005; Westernoff et al., 2005).

Aus der großen Familie der MMP`s kommt den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 eine besondere Bedeutung zu, da beide Enzyme bei der Ausbreitung und Metastasierung von malignen Tumoren offenbar eine entscheidende Rolle spielen. Diese Proteinase sind in der Lage, Typ IV Kollagen, einen sehr wichtigen Bestandteil der Basalmembran, aber auch Typ V, VII, X, XI Kollagen abzubauen. Die Penetration bzw. die Aufhebung der Integrität dieser Membran durch Tumorzellverbände ist der Beweis für das Vorliegen eines invasiven Karzinoms (Kähäri und Saarialho-Kere, 1997; Ashworth et al., 1999).

Unter physiologischen Bedingungen wird MMP-2 unter anderen von Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Monozyten gebildet (Collier et al., 1988; Overall et al., 1991; Birkedal-Hansen et al., 1993).

Die Bildung von MMP-9 findet vor allem in Alveolarmakrophagen, Osteoklasten und Keratinozyten statt (Birkedal-Hansen et al., 1993).

Eine erhöhte Expression der MMP-2 und/oder MMP-9 konnte in vielen verschiedenen malignen Neoplasien der Humanpathologie nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderen Neoplasien der Speiseröhre (Shima et al., 1992), des Magens (Murray et al., 1998) und des Kolons (Ornstein et al., 1999).

Darüber hinaus scheint die Überexpression der MMP-2 und/oder MMP-9 in verschiedenen malignen Neoplasien der Humanpathologie mit schlechteren Prognoseparametern (hoher Malignitätsgrad, erhöhte Metastasierungs- und Rezidivrate, verkürzte Überlebenszeit) zu korrelieren (Pyke et al., 1992; Stearns und Wang, 1993; Ornstein et al., 1999; Kayano et al., 2004; Nagel et al., 2004; Tian et al., 2005).

Über die Bedeutung der Expression dieser Proteinasen bei der Entstehung, Progression und Prognose von SDN gibt es bisher nur wenige Arbeiten. Vergleichend wurden zudem sehr kontroverse Aussagen gemacht, was sicherlich zum Teil auf die oft zu geringe Fallzahl und die ausgeprägte histologische Vielfalt dieser Neoplasien zurückzuführen ist.

Tian et al. (2005) konnten mit ihrer Untersuchung von 26 malignen und 28 benignen SDN feststellen, dass MMP-2 und MMP-9 signifikant häufiger von den malignen Entitäten exprimiert wurden.

Nagel et al. (2004) und Kayano et al. (2004) stellten fest, dass vor allem MMP-2 signifikant häufiger in malignen als in benignen SDN exprimiert wurde. Bei der Untersuchung der MMP-9-Expression konnten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den malignen und benignen Entitäten feststellen.

Aus deren Sicht ist die MMP-2-Expression ein entscheidender Faktor bei der Invasion und Progression und damit der Prognose der malignen SDN.

Hongnan et al. (1997) wiesen nach, dass MMP-2 und MMP-9 signifikant häufiger in metastasierten als in nicht metastasierten ACC's der Speicheldrüse exprimiert wurde.

Azuma et al. (1993) konnten bei der Untersuchung von metastasierten und nicht metastasierten Zellklonen eines Adenokarzinoms der Speicheldrüse keine signifikanten Unterschiede der MMP-2- und MMP-9-Expression sehen.

Weiterhin beschrieben Nagel et al. (2004), dass die MEC's der Speicheldrüse eine MMP-2- und MMP-9-Expression überwiegend im plattenepithelialen Tumorzellanteil aufweisen. Allerdings wurden hierbei keine weiterreichenden Untersuchungen zur Korrelation mit prognostischen Parametern durchgeführt.

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass MMP-2 in Plattenepithelkarzinomen anderer Primärlokalisierung verstärkt exprimiert wurde und mit schlechten prognostischen Parametern korreliert (Davidson et al., 1999; Talvensaaari-Mattila et al., 1999).

Interessanterweise wurde in verschiedenen Untersuchungen belegt, dass auch in den benignen SDN und sogar im gesunden menschlichen Speicheldrüsengewebe eine Expression von MMP-2 und MMP-9 nachweisbar ist (Davis, 1991; Soini und Autio-Harmainen, 1993; Nagel et al., 2004).

### 1.2.3 Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP`s)

Die Expression und Aktivität von MMP`s werden unter anderem über verschiedene Inhibitoren, Wachstumsfaktoren, Onkogene, Hormone und Zytokine reguliert (Liotta, 1986).

TIMP 1 - 4 sind Glykoproteine und stellen die wichtigsten natürlichen Inhibitoren oder Gegenregulatoren der MMP`s dar (Hayakawa et al., 1992; Dennardt et al., 1993; Emmert-Buck et al., 1995; Corcoran et al., 1996; Greene et al., 1996).

TIMP-1 und TIMP-2 werden in Fibroblasten, Entzündungszellen und in vielen verschiedenen Tumorzellen der Humanpathologie gebildet und spielen bei verschiedenen Prozessen bzw. Erkrankungen, wie z. B. der Wundheilung, der Embryogenese und der Arthritis, eine wesentliche Rolle (Liotta et al., 1991; Brinkerhoff, 1992; Herbst et al., 1997).

In verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen wurde belegt, dass die Expression von TIMP-1 und/oder TIMP-2 einen hemmenden Einfluss auf die Invasion und Metastasierung von malignen Neoplasien der Humanpathologie hat und als prognostischer Indikator für die Beurteilung der Tumoraggressivität herangezogen werden könnte (Azuma et al., 1993; Zeng et al., 1995; Charous et al., 1997; Hongnan et al., 1997; Brummer et al., 1999; Shi et al., 1999).

Azuma et al. (1993) stellten fest, dass innerhalb der Adenokarzinome der Speicheldrüsen eine Metastasierung entscheidend von der TIMP-1-Expression abhängig ist. In den untersuchten metastasierten Zellklonen dieses Karzinomtyps war eine im Vergleich zu den nicht metastasierten Zellklonen deutlich verminderte TIMP-1-Expression zu sehen.

Hongnan et al. (1997) konnten bei der Untersuchung von malignen SDN nachweisen, dass eine verstärkte TIMP-2-Expression vor allem in ACC`s einen hemmenden Einfluss auf die Metastasierungsneigung hat. Sie schlussfolgerten, dass das metastatische Potential und damit die Prognose von ACC`s entscheidend von der TIMP-2-Expression abhängig ist.

Eine andere Arbeitsgruppe konnten innerhalb der malignen SDN eine TIMP-2-Expression signifikant stärker in ACC`s, als in MEC`s nachweisen. Weiterhin stellten sie fest, dass die Aktivität von pro-MMP-2 in den MEC`s signifikant höher war als in den ACC`s und mit dem Tumorstadium (histologischer Grad und Lymphknotenmetastasen) korrelierte. Sie schlussfolgerte, dass die pro-MMP-2-

Aktivität und damit die Progression von MEC`s (Invasion, Metastasen) über die TIMP-2-Aktivität reguliert wird (Kayano et al., 2004).

Nagel et al. (2004) dokumentierten kein relevantes TIMP-1 und TIMP-2-Expressionsergebnis in den malignen SDN. Sie schlussfolgerten, dass TIMP`s keine wichtige Tumorsuppressorfunktion in den malignen SDN erfüllen.

### **1.3 Tumorsuppressorgen p53 und HER2/neu Onkogen**

#### **1.3.1 Tumorsuppressorgen p53**

Das normale (wild-type) p53-Gen des Menschen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert und steuert die Produktion eines aus 393 Aminosäuren aufgebauten nukleären Phosphoproteins (Lane und Benchimol, 1990). Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltodes) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Baker et al., 1990; Lin et al., 1992; Shimamura und Fisher, 1996).

Seit langem ist bekannt, dass die mutagene Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens in der Regel zu einer Deregulierung der Zellproliferation und der Apoptose bis hin zur Entstehung von malignen Neoplasien führen kann (Donehower und Bradley, 1993; ).

Mittlerweile konnte eine Mutation des p53-Gens unter anderem in malignen Neoplasien des Kolons (Baker et al., 1990), der Brust (Cattoretti et al., 1988), der Harnblase (Shiina et al., 1999) und der Lunge (Iggo et al., 1990) nachgewiesen werden.

Es existieren jedoch sehr gegensätzliche Aussagen über die Bedeutung von p53 in SDN des Menschen.

Nordkvist et al. (2000) belegten in 20% der malignen SDN eine p53-Überexpression. Die hierbei untersuchten benignen SDN waren p53-negativ. Sie schlugen p53 als wertvollen diagnostischen Marker zur Dignitätsbestimmung der SDN vor. Ähnliche Aussagen konnten auch Alves et al. (2004) machen.

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte die Überexpression von p53 in malignen SDN des Menschen mit einem aggressiven biologischen Verhalten dieser

Tumoren und einer Prognoseverschlechterung korreliert werden (Soini et al., 1992; Deguchi et al., 1993; Ishii und Nakajima, 1994; Gallo et al., 1995; Kiyoshima et al., 2001; Xu et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sahen andere Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen der p53-Expression und der Prognose in malignen SDN (Felix et al., 1996; Nagler et al., 2003).

Kiyoshima et al. (2001), untersuchten die p53-Expression in einer Gruppe von 17 ACC`s und 27 MEC`s der Speicheldrüse. Es zeigte sich eine p53-Alteration in 18% der ACC`s und 15% der MEC`s. Interessanterweise waren nur Karzinome, die in den kleinen Speicheldrüsen lokalisiert waren, betroffen. Weiterhin korrelierte die p53-Mutation in den ACC`s und MEC`s mit schlechten prognostischen Parametern.

Alves et al. (2004) stellten in 53% der MEC`s und 20% der ACC`s der Speicheldrüse eine p53-Überexpression fest. Weiterführende Untersuchungen zur Korrelation mit prognostischen Parametern wurden nicht durchgeführt.

Rosa et al. (1996) ermittelten bei der Untersuchung von 17 Adenokarzinomen in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüse, dass vor allem die geringgradig differenzierten Areale des Adenokarzinoms p53-positiv waren. In den benignen Tumorarealen konnte vereinzelt eine schwache Reaktivität von p53 in den Zellkernen festgestellt werden.

Ebenfalls wurde von Weber et al. (2002) nachgewiesen, dass auch in den benignen SDN (pleomorphe Adenome, Basalzelladenome und Myoepitheliome) p53 exprimiert wurde, was aus deren Sicht auf ein potentiell malignes Potential dieser Tumoren hindeuten könnte.

### **1.3.2 HER2/neu Onkogen**

Das HER2/neu Gen, welches sowohl in Form eines Proto-Onkogens als auch Onkogens auftritt, ist beim Menschen auf Chromosom 17 (17q11.2-12) lokalisiert. Es kodiert die Bildung eines 185 kDa-schweren transmembranösen Glycoproteinrezeptors mit Tyrosinkinaseaktivität, welcher eine sehr starke Ähnlichkeit zu dem Epidermal-growth-factor-Rezeptor aufweist (Yamamoto et al., 1986; Popescu et al., 1989).

HER2/neu spielt als Wachstumsfaktor-Rezeptor eine essentielle Rolle in der Regulation von epithelalem Zellwachstum und Differenzierung, wie bei verschiedenen Prozessen der Wundheilung und bei der Embryogenese (Yamamoto et al., 1986).

Es ist mittlerweile hinreichend bekannt, dass eine Überexpression des HER2/neu-Gens, durch Deregulierung der Zellproliferation, zur Entstehung von malignen Tumoren führen kann. Zudem ist eine HER2/neu-Überexpression oftmals mit schlechten prognostischen Parametern in verschiedenen Karzinomen der Humanpathologie korreliert. Hierzu zählen unter anderen maligne Neoplasien der Mamma (Hanna et al., 1999;), der Harnblase (Sauter et al., 1993), des Kolons (Caruso und Valentini, 1996), der Lunge (Tateishi et al., 1991) und des Kopf-Hals-Bereiches (Werkmeister et al., 2000).

Die prognostische Wertigkeit der HER2/neu-Expression in SDN wird laut aktueller Datenlage sehr kontrovers diskutiert (Giannoni et al., 1995; Felix et al., 1996; Cho et al., 1999; Dori et al., 2002; Nagler et al., 2003).

Während einige Arbeitsgruppen (Rosa et al., 1997; Cho et al., 1999; Dori et al., 2002) in der HER2/neu Expression innerhalb der malignen SDN keine prognostische Bedeutung erkennen, stellten unter anderen Stenman et al. (1991), Press et al. (1994) und Gianoni et al. (1995) fest, dass eine HER2/neu Überexpression gehäuft in fortgeschrittenen malignen SDN mit ungünstigen prognostischen Verlauf nachweisbar war.

Ein hoher HER2/neu Rezeptorstatus, welcher sich bekanntlich vor allem an der Zellmembran von Adenokarzinomen der Mamma präsentiert, stellt eine attraktive Möglichkeit zur Rezeptor modulierenden Immuntherapie mit Herceptin (Trastuzumab; humaner monoklonaler Mausantikörper) dar. Betroffene Patientinnen, die nur mit Herceptin oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika behandelt wurden, zeigten einen deutlich besseren prognostischen Verlauf, als Patientinnen, die nicht mit Herceptin behandelt wurden (Hanna et al., 1999; Slamon et al., 2001; Emens, 2005; Willems et al., 2005).

Die Entdeckung des HER2/neu-Rezeptors in Adenokarzinomen der Speicheldrüse versprach daher eine neue Therapieoption (Semba et al., 1985; Sugano et al., 1992; Hellquist et al., 1994; Giannoni et al., 1995; Felix et al., 1996; Haddad et al., 2003).

Ein relevanter Therapieerfolg mit Herceptin ist jedoch nur bei Karzinomen mit einer erhöhten HER2/neu-Gen-Amplifikation, welche mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen wird, zu erwarten. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass der immunhistochemisch ermittelte HER2/neu-Rezeptorstatus oftmals nicht mit der in der FISH-Technik nachgewiesenen HER2/neu-Gen-Amplifikation korreliert (Skálová et al., 2003; Locati et al., 2005). In der Literatur steht bislang eine systematische Untersuchung der HER2/neu-Rezeptorverteilung mittels FISH-Technik in einem größeren Untersuchungskollektiv von malignen SDN aus. Aufgrund dieser Erkenntnis haben wir unser untersuchtes Kollektiv einer zusätzlichen Untersuchung zugeführt und die HER2/neu-Gen-Amplifikation mittels FISH-Technik ermittelt (Moubayed et al., 2008).

## 2. Fragestellung

Obwohl zahlreiche Untersuchungen zur Wertigkeit molekularer Prognosefaktoren bei humanen Tumoren vorliegen, ist die Datenlage verwirrend und nur wenige einzelne Prognosefaktoren haben sich als verwertbar erwiesen.

Trotz der eingangs geschilderten Untersuchungen scheinen die Erkenntnisse über moderne molekulare Therapieoptionen und Prognoseparameter lückenhaft zu sein.

Insbesondere scheint bei den verschiedenen malignen Tumorentitäten der Speicheldrüsen Uneinigkeit über die Aussagekraft der jeweiligen molekularen Prognosefaktoren zu herrschen. Dies gilt auch für die Prognosefaktoren p53, HER/2neu, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2.

Aufgrund der Rarität und der histomorphologischen Vielfalt der malignen SDN war es bislang schwierig, größere Kollektive von Tumorentitäten zu untersuchen und statistisch verwertbare Ergebnisse bezüglich ihres biologischen Verhaltens zu sichern.

Vor diesem Hintergrund führten wir eine retrospektive Untersuchung eines großen Kollektivs von 72 malignen und 9 benignen SDN durch.

Ziel dieser Arbeit ist:

1. Immunhistochemische Darstellung des Expressionsverhaltens von MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, HER/2neu und p53 in Speicheldrüsenkarzinomen des Menschen.
2. Vergleich dieser Expressionsergebnisse mit denen der gutartigen SDN.
3. Eingehende Erörterung der Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten der verschiedenen Proteine und deren klinische und prognostische Wertigkeit.
4. Darstellung von Parametern für eventuelle Therapieoptionen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsgruppe**

72 Fälle von Patienten mit behandelten primären malignen SDN konnten in dem Zeitraum zwischen 1990 und 2004 an der Universitätsklinik Lübeck im Archiv der HNO-Klinik und der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie ermittelt werden. Zudem wurden 9 benigne SDN, als Vergleichsgruppe für die Beurteilung der immunhistochemischen Ergebnisse, in unsere Untersuchungen mit einbezogen.

Die morphologische Untersuchung dieses Kollektivs erfolgte am zugehörigen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Lübeck. Von diesen Fällen lagen jeweils histologische Schnitte und ausreichend in Paraffin eingebettetes Restgewebe für weiterreichende histomorphologische und molekularbiologische Untersuchungen vor.

Alle 81 untersuchten SDN wurden histologisch entsprechend den neuen Richtlinien der WHO (Barnes et al., 2005) klassifiziert.

Die klinische Auswertung der Daten wurde für die Gruppe der malignen SDN ermittelt.

Als klinische und pathohistologische Parameter wurden Alter und Geschlecht der Patienten sowie die primäre Tumorlokalisierung, das TNM-Stadium (I - IV), der histologische Grad und das Auftreten von Metastasen ermittelt.

Aufgrund der geringen Fallzahl der einzelnen histologischen Entitäten erfolgte eine semiquantitative Auswertung der ermittelten Zahlenwerte.

#### **3.2 Immunhistochemische Methoden**

##### **3.2.1 Prinzipien der Immunhistochemie**

Mit der Entdeckung der Immunhistochemie wurde der Grundstein für eine neue Ära in der Forschung und Diagnostik von Neoplasien gelegt. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Anwendung von zielgerichteten und zellspezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene oder Gensequenzen der zu untersuchenden Zellen. Der Einsatz von Antikörpern wurde verfeinert und maximiert. Seither konnten viele Wissenslücken über den molekularbiologischen,

zellulären Aufbau geschlossen und eine auf die spezifische zelluläre Herkunft bzw. Differenzierung der einzelnen Zellarten bezogene Definition von biologischen Zusammenhängen erreicht werden. Darüber hinaus wurden mit der gezielten Aufklärung von biologischen Zusammenhängen in normal funktionierenden Körperzellen und bei der Interpretation der Fehlfunktion in mutierten Zellarten neue Grundsteine für die Erforschung von Neoplasien sowie die Entwicklung von modernen Strategien zur Therapie dieser Krankheitsbilder erschlossen (Taylor und Cote, 1986; Shi et al., 1991; Adams, 1992; Merz et al., 1995).

### **3.2.2 Darstellung und Erläuterung der angewendeten immunhistochemischen Techniken**

Die immunhistochemische Untersuchung eines in Paraffin eingebetteten Gewebes erfordert eine adäquate Präparation zur Demaskierung der Antigenproteine, die durch eine vorherige Fixierung in Formalin und Paraffin eine Alteration ihrer Proteinstrukturen erfahren haben. Zu diesem Zweck werden mittlerweile verschiedene Methoden (Mikrowelle, Dampftopf und enzymatische Eiweißspaltung) genutzt (Shi et al., 1991; Cattoretti et al., 1993; Leong und Milos, 1993; Bancroft und Alan, 1996).

In unserer Studie wurde für die Gewinnung der immunhistochemischen Ergebnisse ausschließlich die Streptavidin-Biotin-Technik angewendet. Grundlage dieser Technik ist die starke physikalische Affinität des Glykoproteins Streptavidin zu dem Vitamin Biotin, die der Methode zu einer sehr hohen Sensitivität verhilft. In unserem Fall handelt es sich um eine spezielle Untergruppe der Avidin-Biotin-Methode, nämlich um die enzymmarkierte, in unserem Fall alkalische Phosphatase markierte-Streptavidin-Biotin-Technik (LAB- oder labelled avidin-biotin-technique). Diese Technik führt zu einer erheblich gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber der PAP-Methode (Peroxidase-anti-Peroxidase-Antikörper-Methode). Für diese Untersuchungstechnik werden im Wesentlichen drei Reagenzien benötigt. Zu Beginn wird das zu untersuchende Gewebe mit dem für die interessierenden Antigenstrukturen spezifischen primären Antikörper (AK) inkubiert. Dies ist der selektive Schritt der immunhistochemischen Technik, indem sich die primären AK nur an ein Epitop (monoclonaler AK) oder an verschiedene Epitope eines Antigens (polyclonaler AK) aus der Vielzahl

vorhandener Proteinstrukturen binden. Im nächsten Arbeitsschritt folgt die Gewebeinkubation mit einem sekundären AK, welcher kovalent mit dem Vitamin Biotin konjugiert ist. Dieser biotinylierte Brückenantikörper erkennt und bindet mit seiner spezifischen Bindungsstelle an die F(ab')<sub>2</sub> Region des primären AK. Nun wird enzymmarkiertes (alkalische Phosphatase) Streptavidin auf den Gewebeschnitt gegeben. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Brückenantikörpers. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin, von denen aufgrund der molekularen Konfiguration aber nicht alle besetzt werden. Damit ist das Enzym alkalische Phosphatase im histologischen Schnitt spezifisch lokalisiert und kann unter Zugabe einer Substratlösung an diesen Stellen mit einer Färbung visualisiert werden. Die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase kann nach Angaben aus der Literatur durch den Zusatz von 0,2-1mM Levamisol zur Substratlösung unterdrückt werden. Zusätzliche Blockierungsschritte sind nicht erforderlich (Hsu et al., 1981; Ponder und Wilkinson, 1981; Giorno, 1984; Gower et al., 1985; Frank et al., 1994).

#### Protokoll der immunhistochemischen Technik

Aus den operativ gewonnenen Neoplasien des Untersuchungskollektivs lagen bereits HE- (Hämatoxylin-Eosin) gefärbte Schnitte vor.

Die Gewebefixierungs- und die immunhistochemischen Arbeiten erfolgten bei Raumtemperatur.

Von den formalinfixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebeproben wurden 3 – 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und folgenden Arbeitsschritten unterzogen:

1. Inkubation der Paraffinschnitte für 24 Stunden bei 37 °C
2. Schnitte entparaffinieren und rehydrieren:
  - 3 x 10 Minuten (min) in Xylol stellen
  - absteigende Alkoholreihe für je 1 min ( 2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 70%)
  - 5 min mit Aqua destilata spülen
  - 5 min in Tris-Puffer stellen
- 3a. Vorbehandlung mit der Mikrowelle (TIMP-1, p53, HER2/neu):
  - Schnitte in Zitronensäure pH 6,0 stellen
  - 3 min mit 850 Watt erhitzen

- verdampfte Flüssigkeit mit destilliertem Wasser auffüllen
- 7 min mit 150 Watt erhitzen
- 15 min abkühlen lassen
- 2 x 5 min in Tris-Puffer spülen

3b. Vorbehandlung mit dem Dampftopf (MMP-2,-9, TIMP-2):

- Schnitte in Zitronensäure pH 6,0 stellen
- nach Erreichen des Druckmaximums 10 min erhitzen
- 15 min abkühlen lassen
- 2 x 5 min in Tris-Puffer spülen

4. Ansatz und Inkubation des Primär-AK

- Verdünnung (Tabelle 1) des Primär-AK mit Antibodydilution und mit dem Rüttler gut vermischen
- Gewebeschnitte mit Dakopen umkreisen
- Gewebeschnitte komplett mit Primärantikörperverdünnung benetzen (etwa 150 µl je Gewebeschnitt) und im geschlossenen Behälter für 30 min inkubieren
- Schnitte dürfen nicht austrocknen
- 5 min in Tris-Puffer spülen

5. Ansatz und Inkubation des Sekundär-AK

- Gewebeschnitte komplett mit Sekundär-AK (DAKO-Kit, Code K5005, Flasche A) benetzen (etwa 150 µl je Gewebeschnitt)
- restl. Ablauf wie unter Punkt 4

6. Ansatz und Inkubation der enzymmarkierten Streptavidin-Substratlösung

- Gewebeschnitte komplett (DAKO-Kit, Code K5005, Flasche B) benetzen
- restl. Ablauf wie unter Punkt 4

7. Ansatz und Inkubation von Chromogen Red (Beispiel für 10 Schnitte)

- jeder Schnitt benötigt zur kompletten Benetzung etwa 150 bis 200 µl Flüssigkeit: 200 µl x 10 Schnitte = 2000 µl = 2ml
- je 1ml AP-Substratpuffer (AP = Alkalische Phosphatase; Dako-Kit, Code K5005, Flasche F ) werden 4µl Levamisole zur Blockierung der endogenen alkalischen-Phosphatase-Aktivität im Gewebe benötigt, also 2ml AP-Substratpuffer + 8µl Levamisole

- zu dieser Lösung Zusetzen von:  
80 µl (Chromogen Red 1 o. Flasche C DAKO-Kit, Code K5005)  
+80 µl (Chromogen Red 2 o. Flasche D DAKO-Kit, Code K5005)  
+80 µl (Chromogen Red 3 o. Flasche E DAKO-Kit, Code K5005)  
für 1 ml AP-Substrat-Levamisole-Gemisch werden jeweils 40 µl des Chromogens Red 1,2 und 3 benötigt.
- das fertige Chromogen sollte innerhalb von 20 min verwendet werden
- Gewebeschnitte komplett mit Chromogen Red benetzen und im geschlossenen Behälter für etwa 10 min inkubieren
- 5 min in Aqua dest. spülen

#### 8. Gegenfärben

- Schnitte 5 min in HE stellen
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

#### 9. Nachbehandlung

- aufsteigende Alkoholreihe für je 1 min (1 x 70%, 2 x 96%, 2 x 100%)
- Schnitte für etwa 1 min in Xylol stellen
- Schnitte direkt nach Entnahme aus Xylol mit Dauermaterial (Glycerin-Gelatine) eindecken.

Gleichzeitig wurden in jedem Arbeitsgang für den jeweils verwendeten Primär-AK entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

### **3.2.3 Kontrollen**

Als Positivkontrolle für die Antikörper gegen MMP-2, -9 und TIMP-1 diente die positive Reaktion der histiozytären Zellen des Tonsillengewebes. Für die Antikörper gegen TIMP-2 und p53 bzw. HER2/neu wurden positive Fälle eines Kolonkarzinoms respektive eines Mammakarzinoms herangezogen.

Für die Negativkontrolle verwendeten wir als sekundären AK nicht biotinylierte anti-mouse anti-rabbit Immunglobulin G Pufferlösung, sondern inkubierten die monoklonalen Primärantikörper mit Normal-rabbit-serum und die polyklonalen Primärantikörper mit Normal-mouse-serum.

### 3.2.4 Mikroskopische Auswertung

Die immunhistochemisch behandelten Gewebeschnitte wurden zunächst getrennt, dann gemeinsam mit einem qualifizierten Pathologen begutachtet und nach folgendem Schema ausgewertet.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte innerhalb von mindestens 10 repräsentativen HPF`s (High power fields).

#### Bewertungsschema für MMP-2, -9, TIMP-1, -2:

Die immunhistochemische Reaktion wurde in den Tumorzellen (Tz) und den Stromazellen (Sz) ausgewertet.

<i>Immunoscore</i>	<i>Bewertungskriterium</i>
-	Negativ: Keine positiven Tz oder Sz nachweisbar.
+/-	Kaum nachweisbar: Nur sehr schwache Positivität in Tz oder Sz nachweisbar, wurde als negativ bewertet.
+	1 bis 25% der Tz oder Sz sind stark positiv.
++	26 bis 50% der Tz oder Sz sind stark positiv.
+++	51 bis 100% der Tz oder Sz sind stark positiv.

#### Bewertungsschema für p53:

Die immunhistochemische Reaktion wurde in den Zellkernen (Zk) der Tumorzellen (Tz) ausgewertet.

<i>Immunoscore</i>	<i>Bewertungskriterium</i>
-	Negativ: Keine positiven Zk nachweisbar
+/-	Kaum nachweisbar: Nur sehr schwache Positivität in Zk nachweisbar, wurde als negativ bewertet.
+	1 bis 25% der Zk sind stark positiv.
++	26 bis 50% der Zk sind stark positiv.
+++	51 bis 100% der Zk sind stark positiv.

Bewertungsschema für HER2/neu:

Die immunhistochemische Reaktion wurde in den Tz ausgewertet.

<i>Immunoscore</i>	<i>Bewertungskriterium</i>
-	Negativ: Keine Färbung zu sehen oder weniger als 10%
+	Negativ: unvollständige Membranfärbung > 10%
++	Schwach positiv: schwache komplette Membranfärbung > 10%
+++	Stark positiv: Starke komplette Membranfärbung > 10%

**3.3 Material**

**3.3.1 Reagenzien**

A: Primäre Antikörper

<b>Primäre-Antikörper Firma</b>	<b>Clone</b>	<b>Ig-Klasse</b>	<b>mono/poly</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Vorbehandlung</b>
MMP-2 BIOCARTA Europe GmbH	A-Gel VC2	IgG1	Monoclonal mouse	1:50	Dampfkochtopf in Zitronensäure pH 6,0 für 10 min
MMP-9 BIOCARTA Europe GmbH	IIA5	IgG1	Monoclonal mouse	1:50	wie MMP-2
TIMP-2 BIOCARTA Europe GmbH	Ab-7	Epitope N-terminal	Polyclonal rabbit	1:100	wie MMP-2
TIMP-1 R&D Systems	63515	IgG2B	Monoclonal mouse	1:100	Mikrowelle in Zitronensäure pH 6,0 für 3min 850 Watt und 7min 150 Watt
p53 LOXO GmbH	1801	IgG1	Monoclonal mouse	1:50	wie TIMP-1
HER2/neu DAKO GmbH		IgG1	Polyclonal rabbit	1:200	wie TIMP-1

**Tabelle 1:** Auflistung der in dieser Studie verwendeten primären Antikörper

B: Sekundäre Antikörper

Biotinylierte anti-mouse und anti-rabbit

Immunglobulin G Pufferlösung:

DAKO ChemMate

Code K 5005

Flasche A

Normal mouseserum,

Normal rabbitserum

Pathologisches Inst.

Med. Univ. zu Lübeck

C: Restliche Reagenzien

Antibodydilution:

DAKO ChemMate

Code S 2022

Enzymmarkierte (alkalische Phosphatase)

Streptavidin Substratlösung (LAB):

DAKO ChemMate

Code K 5005

Flasche B

Chromogen Red 1, 2, 3:

Dako ChemMate

Code K 5005

Flasche C, D, E

alkalische Phosphatase Substratpuffer:

DAKO ChemMate

Code K 5005

Flasche F

Levamisole:

DAKO ChemMate

Code K 5005

Flasche G

Xylol

Ethanol (100%, 96%, 70%)

Hämatoxylin-Eosin:

Pathologisches Inst.

Med. Univ. zu Lübeck

Zitronensäure pH 6,0, Tris-Base und  
Tris-Hydrochloride (HCL):

Sigma-Aldrich Chemie  
GmbH, Deisenhofen,  
Deutschland

Aqua destilata, Natriumchlorid (NaCl):

Pathologisches Inst.  
Med. Univ. zu Lübeck

#### D: Zubereitung der Pufferlösung

Tris-Puffer: Natriumchlorid (NaCl) 87,8 g + Tris-Base 9,0g + Tris-HCL 68,5 g  
+ Aqua destilata 10,0 Liter, pH 7,4-7,6.

#### **3.3.2 Instrumente**

Objektträger:

Menzel, Braunschweig  
Deutschland

Pen:

DAKO

Mikrowelle:

Miele  
Deutschland

Wasserkocher:

Bosch  
Deutschland

Rüttler:

Hänigsen  
Deutschland

Mikroskop:

Zeiss  
Deutschland

## 4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

### 4.1 Klinische Daten

In einem Kollektiv von 72 Patienten (Pat.) mit malignen SDN waren 38 (53%) Frauen und 34 (47%) Männer vertreten. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 65 Jahre. Der jüngste Pat. war 16 und der älteste 90 Jahre alt (**Abb. 1**).

54 (75%) der Karzinome traten in den großen (gr.) und 18 (25%) in den kleinen (kl.) Speicheldrüsen auf. Innerhalb der gr. Speicheldrüsen war die Gl. Parotis mit 45 (83%) Karzinomen bevorzugt betroffen. 9 (17%) Karzinome waren in der Gl. Submandibularis lokalisiert (**Abb. 2**).

In den kl. Speicheldrüsen traten 6 (33%) Karzinome im Gaumen, 4 (22%) im Zungengrund, 3 (17%) im Mundboden, 2 (11%) im Wangenbereich, 2 (11%) in der Gl. Sublingualis und 1 (6%) Karzinom im Bereich der Lippe auf.

Die histologische Klassifizierung erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der WHO (Barnes et al., 2005). In **Tabelle 2** ist die Verteilung der von uns untersuchten 72 malignen SDN auf die einzelnen histologischen Entitäten dargestellt.

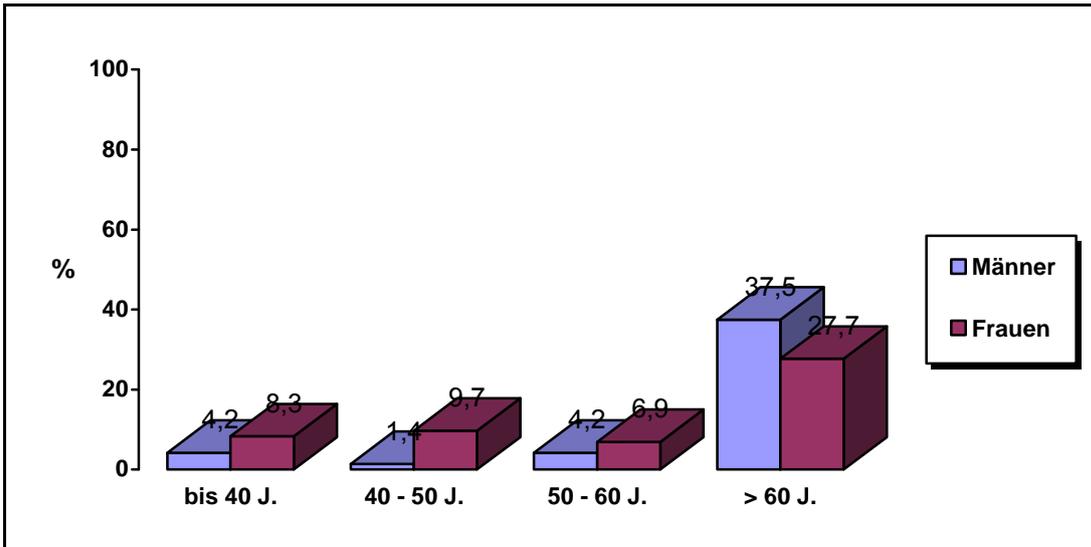
Für das TNM-Stadium ergab sich folgende Verteilung: 28 (39%) Pat. im Stadium I; 9 (12,5%) Pat. im Stadium II; 13 (18%) Pat. im Stadium III; 22 (30,5%) Pat. im Stadium IV. In 25 von 72 Fällen (35%) wurden Fernmetastasen nachgewiesen.

14 Fälle (19%) waren hochgradig differenzierte Karzinome (G1), 30 Fälle (42%) mäßiggradig differenzierte Karzinome (G2) und 28 Fälle (39%) geringgradig differenzierte Karzinome (G3).

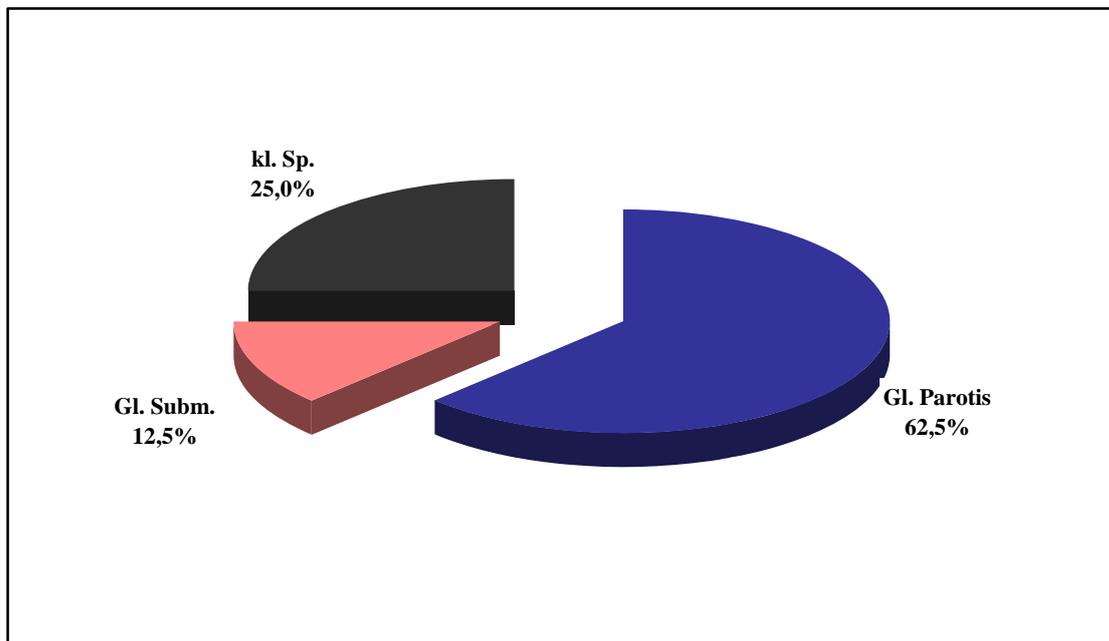
Während eines durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraumes von 1,9 Jahren (23 Monate) ist in 16 von 72 Fällen (22%) ein Tumorrezidiv aufgetreten.

21 von 72 Patienten (29%) verstarben infolge des Tumorleidens.

Unter den 9 benignen SDN fanden sich 4 pleomorphe Adenome (PI-Ad), 4 Zystadenolymphome (ZAL) und 1 sebozytäres Lymphadenom (sLA).



**Abb. 1:** Alters und Geschlechtsverteilung der 72 Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen . (J. = Jahre)



**Abb. 2:** Lokalisation und Verteilungsmuster der Speicheldrüsenkarzinome.  
(kl. Sp. = kleine Speicheldrüsen; Gl. Subm. = Glandula Submandibularis)

<b>Histologie</b>	<b>Anzahl</b>
Adenoidzystisches Karzinom (ACC)	21
Adenokarzinom NOS (AC-NOS)	14
Adenokarzinom Plg (AC-Plg)	2
Adenokarzinom im pleomorphen Adenom (CA-ex-PA)	2
Speichelgangskarzinom (SDC)	1
Mukoepidermoidkarzinom (MEC)	14
Plattenepithelkarzinom (SCC)	7
Azinuszellkarzinom (ACAC)	6
Basalzelladenokarzinom (BCAC)	2
Undifferenziertes Karzinom (UC)	1
Myoepitheliales Karzinom (MC)	1
Epithelial-myoeitheliales Karzinom (EMC)	1
<b>Gesamt</b>	<b>72</b>

**Tabelle 2:** Histologische Klassifikation der Speicheldrüsenkarzinome

#### **4.2 Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, p53 und HER2/neu in primären Speicheldrüsenneoplasien**

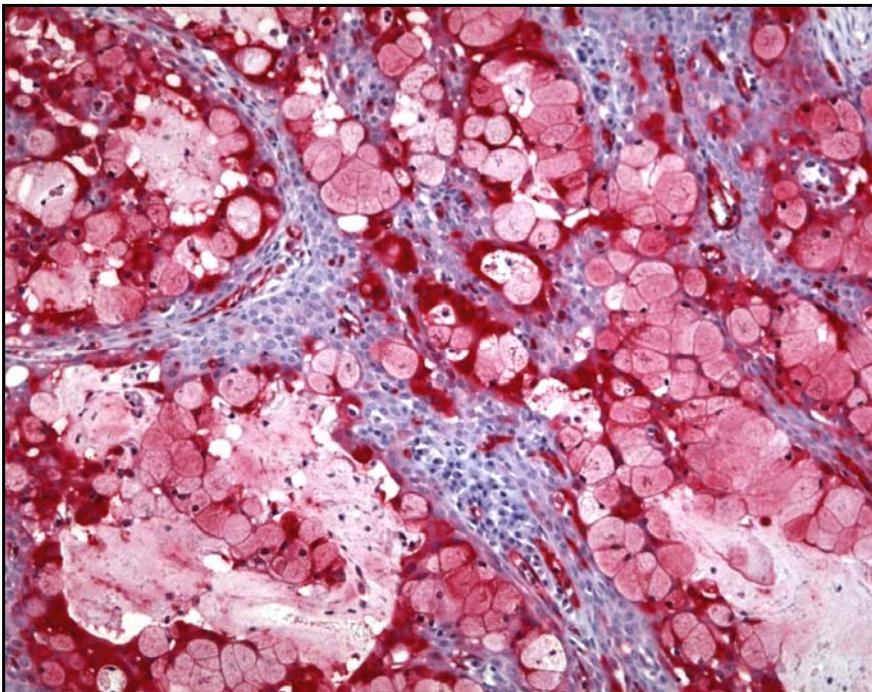
Eine Übersicht der immunhistochemischen Ergebnisse ist im Anhang in **Tabelle 3** dargestellt.

Eine erhöhte MMP-2 Expression konnte in 52 von 72 (72%) malignen SDN nachgewiesen werden. Hierbei war in 23 Fällen (32%) eine starke MMP-2 Expression (51 - 100% der Tumorzellen (Tz) oder Stromazellen (Sz)) zu beobachten. Die Reaktivität war wesentlich stärker in den Sz als in den Tz ausgeprägt. Innerhalb der einzelnen Tumorentitäten konnte in 20 von 21 (95%) der adenoidzystischen Karzinome (ACC), 12 von 14 (86%) der Mukoepidermoidkarzinome (MEC), 5 von 6 (83%) der Azinuszellkarzinome (ACAC), 7 von 14 (50%) der Adenokarzinome NOS (AC-NOS), 2 von 2 (100%) der Adenokarzinome

Plg (AC-Plg), 1 von 1 (100%) der Speicheldrüsenkarzinome (SDC) und 1 von 7 (17%) der Plattenepithelkarzinome (SCC) eine erhöhte MMP-2 Expression festgestellt werden.

In den MEC zeigte sich eine MMP-2 Reaktivität überwiegend im mukoiden Tumorzellanteil. Der plattenepitheliale Anteil war nur in vereinzelt Arealen MMP-2 positiv (**Abb. 3**).

In der Gruppe der benignen SDN waren 7 von 9 der Fälle (78%) MMP-2 positiv, wobei in 2 Fällen (22%) eine starke MMP-2 Expression (51 - 100% der Tz oder Sz) zu sehen war. Die MMP-2 Reaktivität war wesentlich stärker im tumor- als im stromazellulären Anteil ausgeprägt.



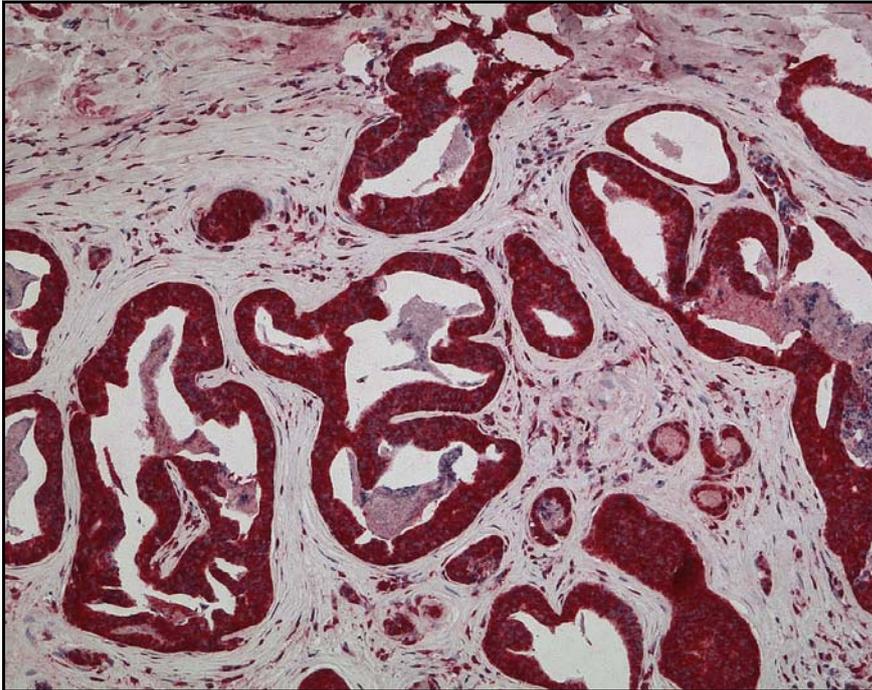
**Abb. 3:** Hochdifferenziertes Mukoepithelkarzinom der Glandula parotis mit stark positiver MMP-2 Expression in 51-100% des mukoiden Tumorzellanteils. Der plattenepitheliale Anteil zeigt nur in vereinzelt Arealen eine Positivität (Vergrößerung 100x)

Analog zu der Expression von MMP-2 konnte eine erhöhte MMP-9 Expression in 52 von 72 (72%) malignen SDN belegt werden. Hierbei war in 28 Fällen (39%) eine starke MMP-9 Expression (51 - 100% der Tz oder Sz) zu sehen.

Innerhalb der einzelnen histologischen Entitäten waren insbesondere 7 von 7 (100%) der SCC, 13 von 14 (93%) der MEC, 10 von 14 (71%) der AC-NOS

**(Abb. 4)**, 2 von 2 (100%) Adenokarzinomen in pleomorphen Adenomen (CA-ex-PA), 5 von 6 (83%) der ACAC und 10 von 21 (48%) der ACC MMP-9 positiv.

In den benignen SDN war eine MMP-9 Positivität in 100% der Fälle (9 von 9) gefunden worden. In 7 Fällen (78%) konnte eine starke MMP-9 Expression (51-100% der Tz oder Sz) festgestellt werden. Die Reaktivität war etwas stärker im tumor- als stromazellulären Anteil nachweisbar.



**Abb. 4:** Mittelgradig differenziertes Adenokarzinom (NOS) der Glandula parotis mit stark positiver MMP-9 Expression in 51-100% der Tumorzellen als auch der Stromazellen (Vergrößerung 100x)

Eine TIMP-1 Positivität konnte lediglich in 9 von 72 (12,5%) der malignen SDN gesehen werden. Die Intensität der Reaktion war insgesamt sehr schwach entwickelt. Insbesondere waren 6 von 14 (43%) der MEC und 2 von 14 (14%) der AC-NOS vertreten. In den benignen SDN fand sich keine Expression von TIMP-1.

In 49 von 72 Fällen (68%) der malignen SDN konnte eine erhöhte TIMP-2 Expression nachgewiesen werden. Hierbei war in 3 Fällen (4%) eine starke TIMP-2 Expression (51 - 100% der Tz oder Sz) zu sehen. Darunter vertreten waren insbesondere 6 von 7 (86%) der SCC, 5 von 6 (83%) der ACAC, 10 von 14 (71%) der MEC, 13 von 21 (62%) der ACC und 8 von 14 (57%) der AC-NOS.

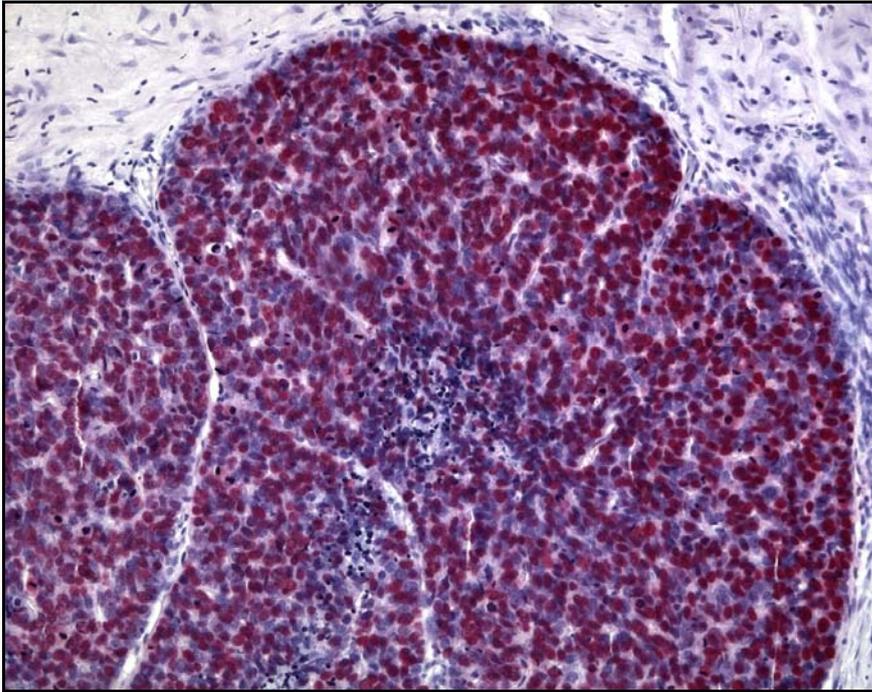
In den benignen SDN konnte eine TIMP-2 Positivität in 100% der Fälle (9 von 9) gefunden werden. Hierbei war in 3 Fällen (33%) eine starke TIMP-2 Expression (51 - 100% der Tz oder Sz) zu sehen, wobei die Intensität der Reaktivität etwas stärker im tumor- als im Stromazellulären Anteil ausgeprägt war.

Eine erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53 wurde in 18 von 72 Fällen (25%) der malignen SDN gesehen. In 3 Fällen (4%) zeigte sich eine starke p53 Expression (51-100% der Tz). Insbesondere waren 4 von 14 (29%) der MEC, 4 von 14 (29%) der AC-NOS, 1 von 2 (50%) der AC-Plg, 4 von 21 (19%) der ACC (**Abb. 5**) und 1 von 6 (17%) der ACAC p53 positiv. Ebenfalls konnte eine erhöhte p53 Expression in den beiden untersuchten CA-ex-PA festgestellt werden.

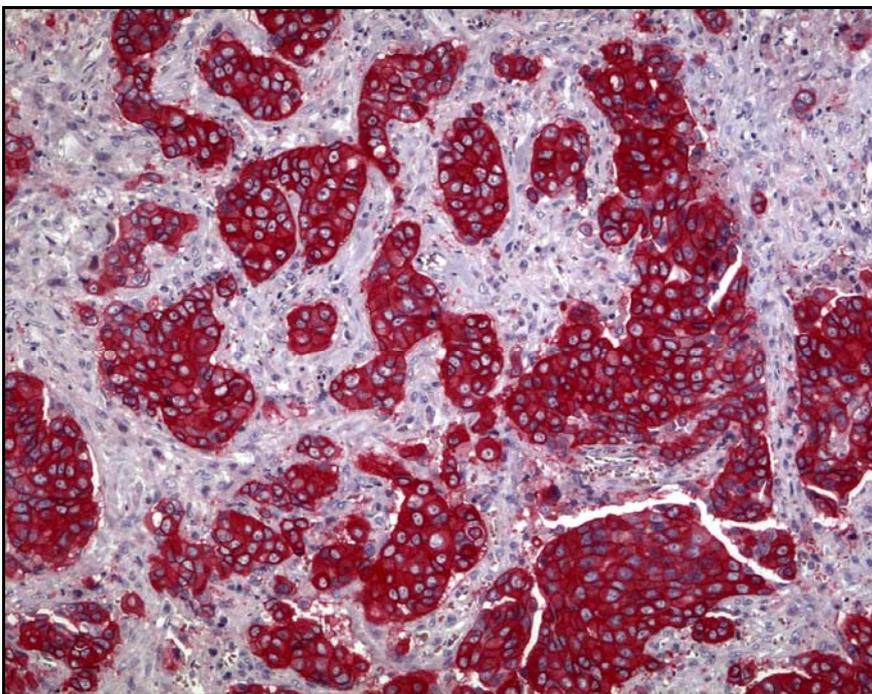
In den benignen SDN fand sich keine Expression von p53.

In 14 von 72 Fällen (19%) der malignen SDN wurde eine Expression des HER2/neu Onkogens nachgewiesen. In 11 Fällen (15%) fand sich eine starke HER2/neu Expression (starke komplette Membranfärbung >10% der Tz).

Von den einzelnen histologischen malignen Entitäten waren 2 von 2 (100%) der CA-ex-PA, 7 von 14 (50%) der AC-NOS (**Abb. 6**), 1 von 2 (50%) der AC-Plg, 1 von 1 (100%) der SDC, 1 von 6 (18%) der ACAC und 2 von 14 (14%) der MEC vertreten. In der Gruppe der benignen SDN fand sich keine HER2/neu Expression.



**Abb. 5:** Geringgradig differenziertes adenoidzystisches Karzinom der Glandula lingualis mit stark positiver P53 Expression in 51-100% der Tumorzellen (Vergrößerung 100x)



**Abb. 6:** Geringgradig differenziertes Adenokarzinom (NOS) der Glandula Parotis mit starker HER2/neu Expression (komplette Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen) (Vergrößerung 100x)

### **4.3 Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf das Alter und Geschlecht der Patienten**

Insbesondere ist bei den Untersuchungsergebnissen der 72 malignen SDN auffällig, dass in den Karzinomen der  $\geq 60$ jährigen Patienten signifikant häufiger (13 von 47 Fälle; 28%) eine relevante HER2/neu Expression nachgewiesen wurde als in den Karzinomen der  $< 60$ jährigen Patienten (1 von 25 Fälle; 4%).

Bei der Untersuchung der ACC ist insbesondere hervorzuheben, dass eine MMP-9 Expression wesentlich häufiger bei Frauen (8 von 13; 61,5%) und  $< 60$ jährigen Patienten (6 von 10; 60%) als bei Männern (2 von 8; 20%) und  $\geq 60$ jährigen Patienten (4 von 11; 36%) gesehen wurde. Weiterhin zeigte sich bei den Frauen (9 von 13; 69%) eine gegenüber den Männern (4 von 8; 50%) etwas vermehrte TIMP-2 Expression.

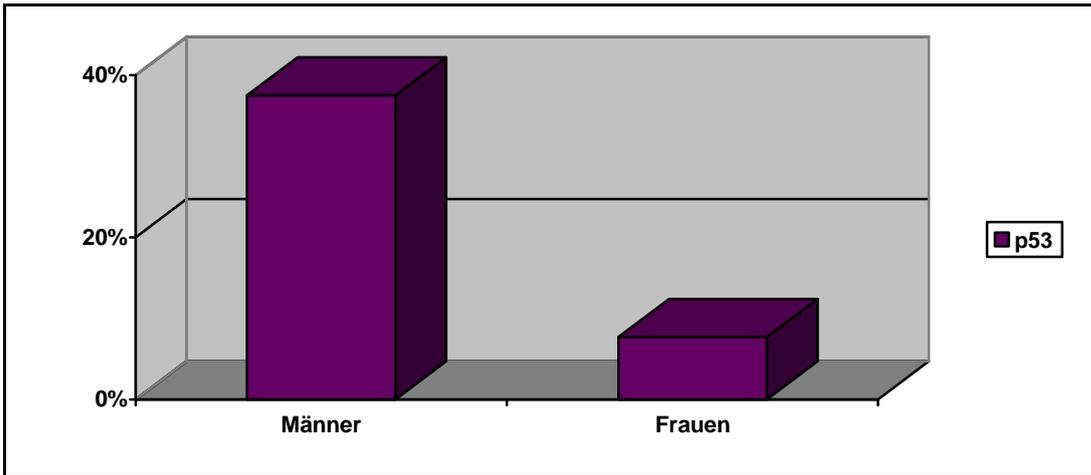
Eine erhöhte p53 Expression konnte wesentlich häufiger bei Männern (3 von 8; 37,5%) als bei Frauen (1 von 13; 8%) festgestellt werden (**Abb. 7**).

In der Gruppe der AC-NOS war eine MMP-2- und p53 Expression häufiger bei Frauen (5 von 8; 62,5%/3 von 8; 37,5%) als bei Männern (2 von 6; 33%/1 von 6; 17%) gefunden worden. Im Gegenzug konnte eine MMP-9- und HER2/neu Expression wesentlich häufiger bei Männern (5 von 6; 83%/5 von 6; 83%) als bei Frauen (3 von 8; 37,5%/2 von 8; 20%) gesehen werden (**Abb. 8**).

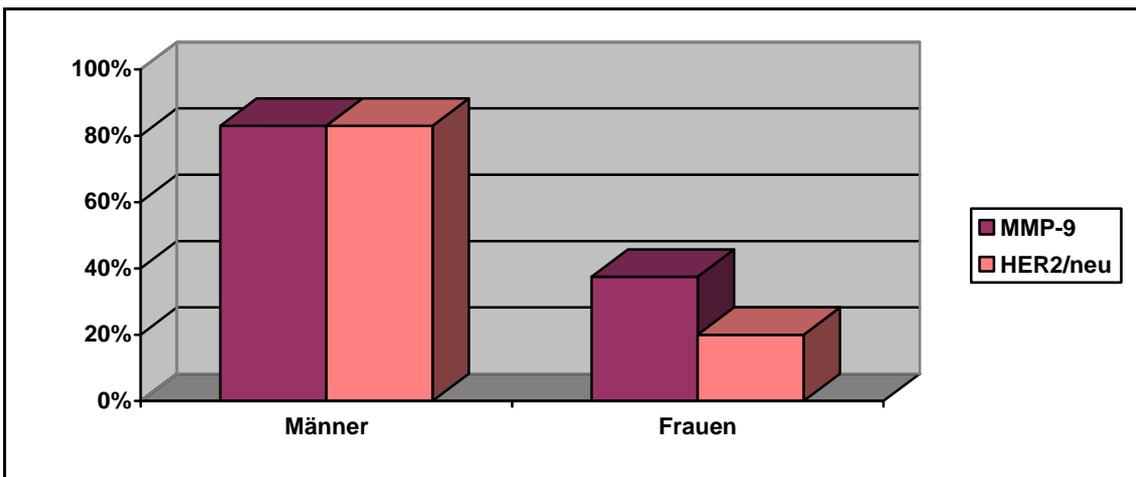
Innerhalb der untersuchten MEC wurde HER2/neu ausschließlich in Karzinomen von  $\geq 60$ jährigen Patienten (2 von 5; 40%) nachgewiesen. Weiterhin konnte eine TIMP-1 Expression häufiger bei  $< 60$ jährigen Patienten (5 von 9; 56%) als  $\geq 60$ jährigen Patienten (1 von 5; 20%) ermittelt werden.

Interessanterweise wurde P53 ausschließlich von Karzinomen der  $< 60$ jährigen Patienten (4 von 9; 44%) exprimiert (**Abb. 9**).

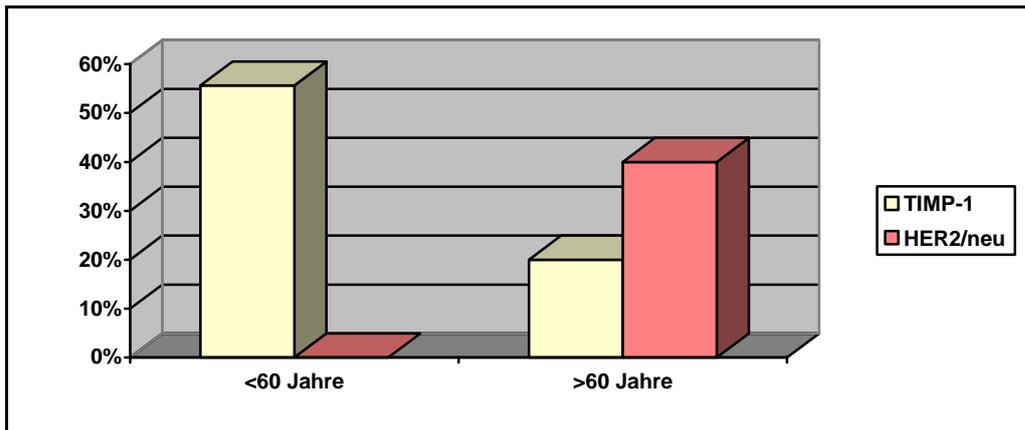
Weitere relevante Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang nicht gesehen werden.



**Abb. 7:** Expressionsmuster von p53 innerhalb der ACC (N=21) in Bezug auf das Geschlecht der Patienten



**Abb. 8:** Expressionsmuster von MMP-9 und HER2/neu innerhalb der AC-NOS (N=14) in Bezug auf das Geschlecht



**Abb. 9:** Expressionsmuster von TIMP-1 und HER2/neu innerhalb der MEC (N=14) in Bezug auf das Alter der Patienten

#### 4.4 Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf die Lokalisation

Hier wurde die Unterteilung in große und kleine Speicheldrüsen vorgenommen, wobei in die Gruppe der großen Speicheldrüsen-Karzinome der Gl. Parotis und Gl. submandibularis und in die Gruppe der kleinen Speicheldrüsen alle weiteren Karzinomlokalisationen mit einbezogen wurden.

Insbesondere wurde in den untersuchten 72 malignen SDN MMP-2- und p53 signifikant häufiger in den kleinen als in den großen Speicheldrüsen exprimiert. Im Gegensatz dazu war eine MMP-9 und TIMP-2 Expression überwiegend in den großen Speicheldrüsen nachweisbar (**Tabelle 4**).

In der Gruppe der ACC ist insbesondere hervorzuheben, dass TIMP-2 häufiger in den großen (10 von 13; 77%) als in den kleinen Speicheldrüsen (3 von 8; 37,5%) exprimiert wurde. Weiterhin konnte eine bedeutend stärkere p53-Expression in den kleinen (3 von 8; 37,5%) als in den großen Speicheldrüsen (1 von 13; 8%) gesehen werden (**Abb. 10**).

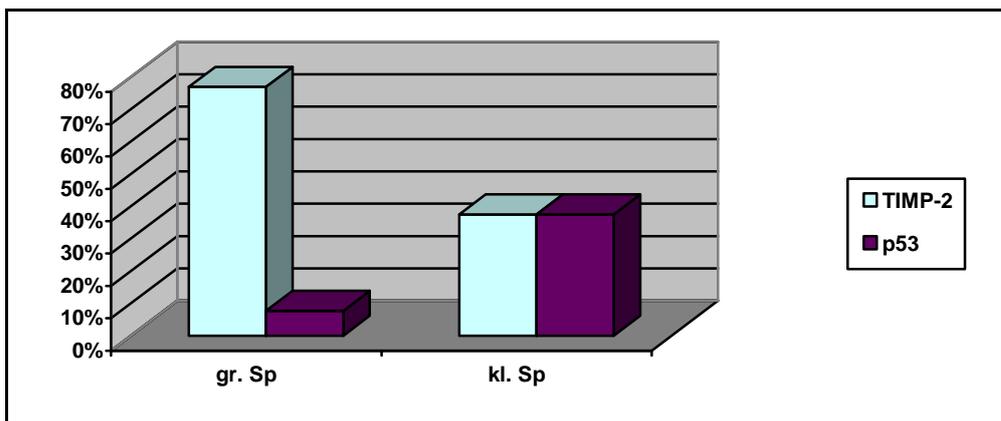
Nennenswert bei der Auswertung der MEC ist, dass eine MMP-2- und p53 Expression häufiger in den kleinen (6 von 6; 100%/3 von 6; 50%) als in den großen Speicheldrüsen (6 von 8; 80%/1 von 8; 12,5%) festgestellt wurde. Eine

MMP-9 Expression konnte etwas häufiger in den großen (8 von 8; 100%) als in den kleinen Speicheldrüsen (5 von 6; 83%) gefunden werden (**Abb. 11**).

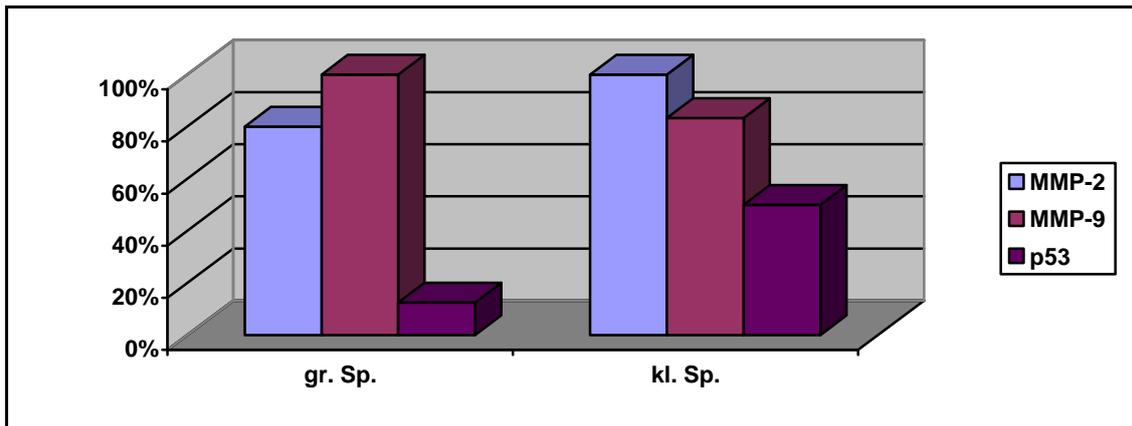
Weitere relevante Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang nicht gesehen werden.

	N	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	P53	HER2/neu
		+	+	+	+	+	+
<b>gr. Sp.</b>	54	35 (65%)	43 (80%)	6 (11%)	42 (78%)	10 (18,5%)	12 (22%)
<b>kl. Sp.</b>	18	17 (94%)	9 (50%)	3 (17%)	7 (39%)	8 (44%)	2 (11%)

**Tabelle 4:** Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, P53 und HER2/neu in 72 primären Speicheldrüsenkarzinomen in Bezug auf die Lokalisation  
gr. Sp. = große Speicheldrüsen; kl. Sp. = kleine Speicheldrüsen



**Abb. 10:** Expressionsmuster von TIMP-2 und p53 innerhalb der ACC (N=21) in Bezug auf die Lokalisation  
gr. Sp. = große Speicheldrüsen; kl. Sp. = kleine Speicheldrüsen



**Abb. 11:** Expression von MMP-2, MMP-9 und p53 innerhalb der MEC (N=14) in Bezug auf die Lokalisation  
gr. Sp. = große Speicheldrüsen; kl. Sp. = kleine Speicheldrüsen

#### 4.5 Expressionsverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf das TNM-Stadium (I - IV)

Insbesondere ist bei den Untersuchungsergebnissen der 72 malignen SDN hervorzuheben, dass MMP-9 häufiger in Karzinomen des TNM-Stadiums IV (19 von 22 Fälle; 86%) als des TNM-Stadiums I (18 von 28 Fälle; 64%) exprimiert wurde. Es fand sich keine eindeutige Korrelation zwischen der MMP-2-, TIMP-1-, TIMP-2; p53- und HER2/neu Expression und dem TNM-Stadium.

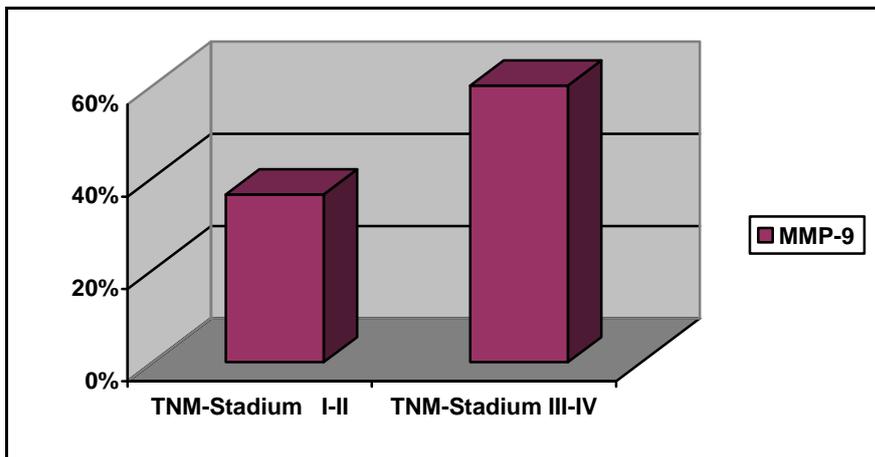
Auffällig war vor allem, dass innerhalb der ACC und der AC-NOS die MMP-9 Expression in den Karzinomen des TNM-Stadiums III - IV gegenüber den Karzinomen des TNM-Stadiums I - II überwog (**Abb. 12 u. 13**).

Zudem wurde in der Gruppe der AC-NOS eine HER2/neu Expression wesentlich häufiger in den Karzinomen des TNM-Stadiums III - IV als in Tumoren des TNM-Stadiums I - II nachgewiesen (**Abb. 13**).

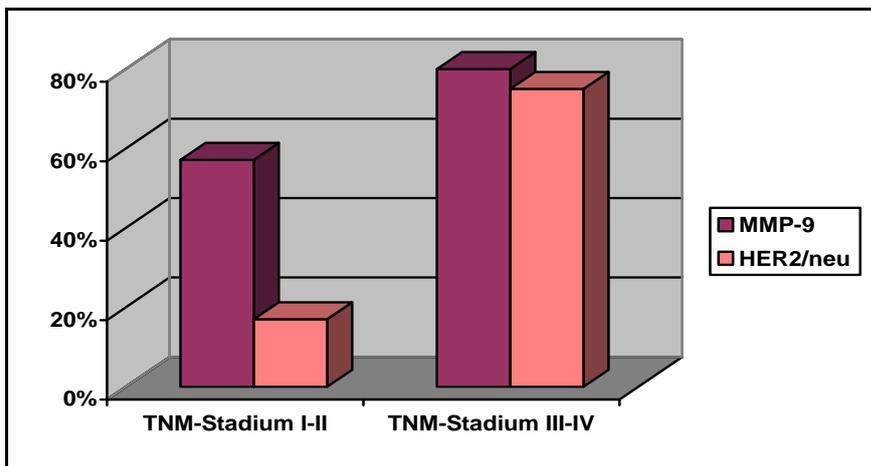
Weiterhin war bei der Auswertung der MEC eine TIMP-2- und p53 Expression häufiger in Karzinomen des TNM-Stadiums III - IV (6 von 7; 86%/3 von 7; 43%) als in Karzinomen des TNM-Stadiums I - II (4 von 7; 57%/1 von 7; 14%) zu sehen (**Abb. 14**). Dagegen zeigte sich eine MMP-2 Expression häufiger in Karzinomen

des TNM-Stadiums I - II (7 von 7; 100%) als in Karzinomen des TNM-Stadiums III - IV (71%).

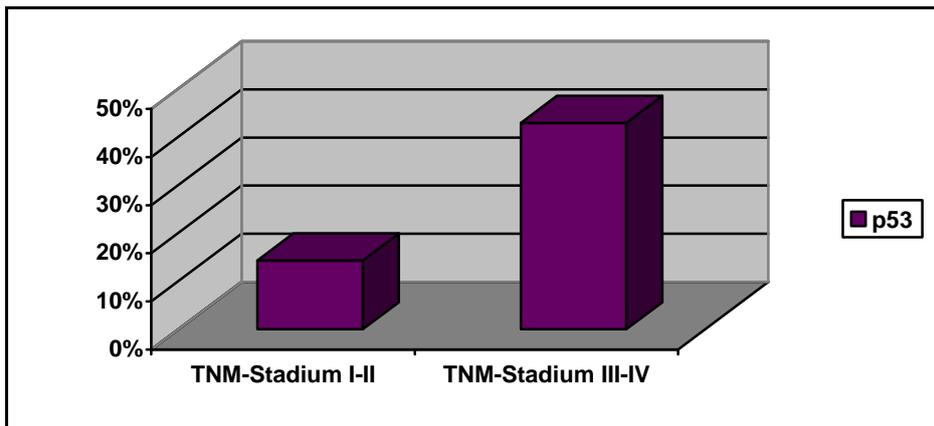
Weitere relevante Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang nicht gesehen werden.



**Abb.12:** Verteilungsmuster der MMP-9 Expression innerhalb der ACC (N = 21) in Bezug auf das TNM-Stadium



**Abb. 13:** Verteilungsmuster der MMP-9 und HER2/neu Expression innerhalb der AC-NOS (N = 14) in Bezug auf das TNM-Stadium



**Abb. 14:** Verteilungsmuster der p53 Expression innerhalb der MEC (N = 14) in Bezug auf das TNM-Stadium

#### 4.6 Expressionverhalten der primären Speicheldrüsenkarzinome in Bezug auf den histologischen Differenzierungsgrad und die Metastasierungseigenschaft

Bei der Auswertung der Metastasierungseigenschaft wurden aufgrund der geringen Fallzahl Lymphknoten- und Fernmetastasen in eine Gruppe zusammengefasst.

Innerhalb der 72 malignen SDN war eine MMP-2- und TIMP-1 Expression überwiegend in hochdifferenzierten (G1) als in geringdifferenzierten (G3) Karzinomen nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde MMP-9, p53 und HER2/neu häufiger in G3-Karzinomen exprimiert. Es zeigte sich in den metastasierten Karzinomen häufiger eine MMP-9- und HER2/neu Expression als in den nicht metastasierten Karzinomen. Eine MMP-2 Expression wurde etwas häufiger in den nicht metastasierten Karzinomen gefunden (**Tabelle 5**).

Bei der Untersuchung der AC-NOS wurde MMP-9 und HER2/neu vermehrt in metastasierten Karzinomen (6 von 7; 86% / 5 von 7; 72%) als in nicht metastasierten Karzinomen (4 von 7; 57% / 2 von 7; 28,5%) exprimiert (**Abb. 15**).

Innerhalb der MEC war eine MMP-2 Expression etwas häufiger in G1-Karzinomen (4 von 4; 100%) als in G3-Karzinomen (4 von 5; 80%) festgestellt worden.

Eine MMP-9 Expression wurde etwas häufiger in G3-Karzinomen (5 von 5; 100%) als in G1-Karzinomen (3 von 4; 75%) gesehen.

Eine TIMP-1- und p53 Expression wurde vermehrt in den metastasierten (3 von 5; 60%/2 von 5; 40%) als in den nicht metastasierten MEC`s (3 von 9; 33%/2 von 9; 22%) nachgewiesen (**Abb. 16**).

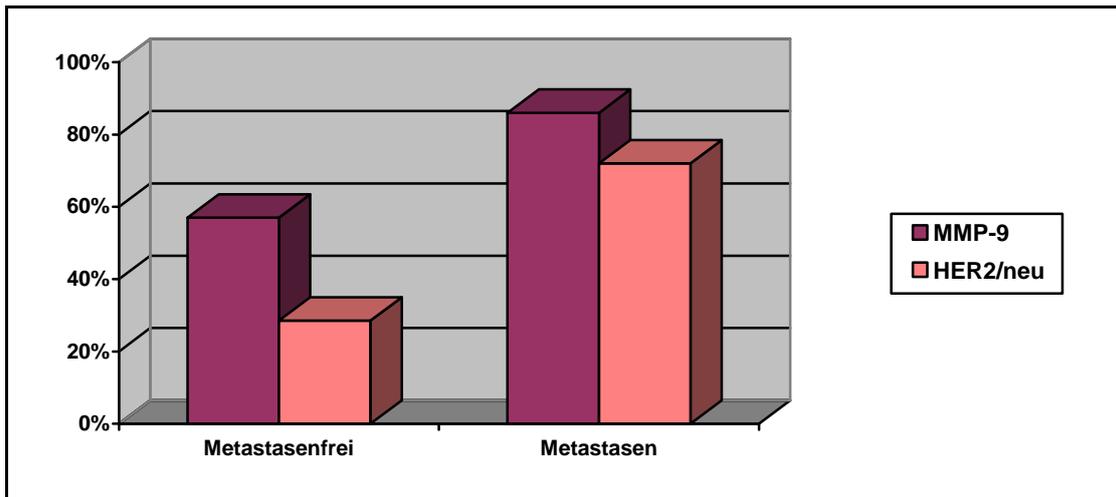
Weitere relevante Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang nicht gesehen werden.

		MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	P53	HER2/neu
	N	+	+	+	+	+	+
<b>Grad</b>							
<b>G1</b>	14	12 (86%)	7 (50%)	3 (21%)	8 (57%)	3 (21%)	1 (7%)
<b>G2</b>	30	25 (83%)	19 (63%)	4 (13%)	22 (73%)	3 (10%)	4 (13%)
<b>G3</b>	28	15 (54%)	16 (93%)	2 (7%)	19 (68%)	12 (43%)	9 (31%)
<b>Metast</b>							
<b>Neg.</b>	47	37 (79%)	31 (66%)	5 (11%)	30 (64%)	13 (28%)	7 (15%)
<b>Pos.</b>	25	15 (60%)	21 (84%)	4 (16%)	19 (76%)	5 (20%)	7 (28%)

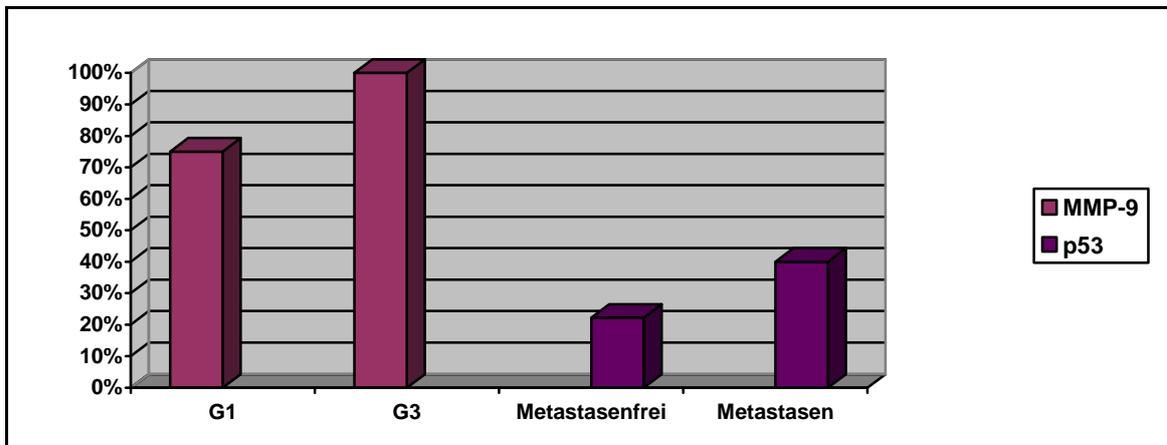
**Tabelle 5:** Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, P53 und HER2/neu in 72 Speicheldrüsenkarzinomen in Bezug auf den histologischen Grad und die Metastasierungsneigung

Grad = Histologischer Grad

Metast = Lymphknoten- und Fernmetastasen



**Abb. 15:** Verteilungsmuster der MMP-9 und HER2/neu Expression innerhalb der AC-NOS (N=14) in Bezug auf die Metastasierungsneigung



**Abb. 16:** Verteilungsmuster der MMP-9 Expression innerhalb der MEC (N=14) in Bezug auf den histologischen Grad und der p53 Expression innerhalb der MEC (N=14) in Bezug auf die Metastasierungsneigung

#### **4.7 Darstellung der prognostisch relevanten Expressionsergebnisse innerhalb der adenoidzystischen Karzinome, der Adenokarzinome (NOS) und der Mukoepidermoidkarzinome der Speicheldrüsen**

In der Gruppe der ACC`s wurde MMP-9 überwiegend von Frauen exprimiert.

Von den erkrankten Frauen, die eine erhöhte MMP-9 Expression aufwiesen (N = 8) waren 6 Fälle (75%) mit einem schlechten prognostischen Verlauf (TNM-Stadium III - IV, Metastasen, G3-Karzinome) behaftet.

Weiterhin konnte eine erhöhte p53 Expression überwiegend in der Gruppe der Männer und innerhalb der ACC`s der kleinen Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Es wurde jedoch keine eindeutige Korrelation mit prognostischen Parametern festgestellt.

Bei der Untersuchung der MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 und HER2/2neu Expression in der Gruppe der ACC`s konnten keine Zusammenhänge mit prognostischen Parametern gesehen werden.

In der Gruppe der AC-NOS konnte eine erhöhte MMP-9 Expression überwiegend bei Männern nachgewiesen werden. Von den erkrankten Männern, die eine erhöhte MMP-9 Expression aufwiesen (N = 5) waren 5 Fälle (100%) mit schlechten prognostischen Parametern (TNM-Stadium III - IV, Metastasen, G3-Karzinome) behaftet.

HER2/neu wurde überwiegend in der AC-NOS-Gruppe der Männer exprimiert .

Von den erkrankten Männern, die eine erhöhte HER2/neu Expression aufwiesen (N = 5), war in 5 Fällen (100%) ein schlechter prognostischer Verlauf nachweisbar.

Bei der Untersuchung der TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 und p53 Expression in der Gruppe der AC-NOS wurden keine Zusammenhänge der klinischen Parameter mit prognostischen Parametern gesehen.

In der Gruppe der MEC`s konnte eine p53 überwiegend bei < 60jährigen Patienten und in den kleinen Speicheldrüsen dokumentiert werden.

Hierbei zeigten 3 Fälle (75%) der betroffenen < 60jährigen Patienten (N = 4) einen schlechten prognostischen Verlauf. Weiterhin wurde in 2 von 3 (67%) Fällen der MEC`s, welche in den kleinen Speicheldrüsen lokalisiert waren, ebenfalls ein schlechter prognostischer Verlauf gesehen.

Eine erhöhte HER-2/neu Expression konnte ausschließlich in MEC`s der > 60jährigen Patienten nachgewiesen werden. Es wurde jedoch keine eindeutige Korrelation mit prognostischen Parametern beobachtet.

Bei der Untersuchung der MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 Expression in der Gruppe der MEC`s konnten keine Zusammenhänge der klinischen Parameter mit prognostischen Parametern festgestellt werden.

## **5. Diskussion**

Die Definition des Malignitätspotentials, der Prognose und der individuell ausgerichteten Therapie für die bekannten Entitäten des Speicheldrüsenkarzinoms mittels moderner Untersuchungsmethoden steht im Mittelpunkt des allgemeinen wissenschaftlichen Interesses und stellt das Ziel der ermittelten Erkenntnisse unserer Studie dar.

Die Manifestation des Speicheldrüsenkarzinoms in den verschiedenen Lokalisationen der bekannten Speicheldrüsen entspricht in unserem Kollektiv den Angaben in der Literatur. Die meisten Fälle treten in der Gl. Parotis auf, gefolgt von der Gl. Submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen (Seifert et al., 1984; Azuma et al., 1993; Soini und Autio-Harminen, 1993; Press et al., 1994; Nagler et al., 2003; Nagel et al., 2004; Tian et al., 2005).

Die methodische Auswahl der molekularbiologischen Kriterien für diese Untersuchung ist eine logische Konsequenz der gewonnenen Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung der allgemeinen Cancerogenese und des Speicheldrüsenkarzinoms in der letzten Dekade.

### **5.1 Expression von MMP-2 und MMP-9 in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Im Vergleich mit den umstrittenen Befunden verschiedener Autoren zeigen die Ergebnisse der MMP-2 Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen benignen Neoplasien bzw. Adenomen und Karzinomen der Speicheldrüse (Davis, 1991; Soini und Autio-Harminen, 1993; Davidson et al., 1999; Talvensaaari-Mattila et al., 1999; Kayano et al., 2004; Nagler et al., 2004; Tian et al., 2005).

Eine gesonderte Bewertung der einzelnen Karzinomentitäten, in denen die Fälle zahlenmäßig eine Aussage zulassen, führt zu der Annahme, dass eine relativ hohe Expression von MMP-2 in den Subgruppen ACC, MEC und ACAC vorliegt. Allerdings lässt sich bei der Auswertung der Expressionsergebnisse in diesen Fällen gemessen an den prognostischen Parametern (Tumorstadium, Metastasierung) im Gegensatz zur Annahme mancher Autoren keine Korrelation

feststellen (Azuma et al., 1993; Hongnan et al., 1997; Davidson et al., 1999; Talvensaaari-Matilla et al., 1999; Kayano et al., 2004).

In analoger Weise präsentiert sich das Expressionsverhalten von MMP-9. Einerseits findet sich eine relativ hohe Expression dieses Enzyms in den meisten Karzinomentitäten (Azuma et al., 1993; Nagel et al., 2004). Andererseits verhalten sich die ACC unseres Kollektivs, die sich durch ein hohes Invasionspotential auszeichnen, unerwartet konträr und lassen eine Expression von MMP-9 fast vollständig vermissen. Darüber hinaus weist unser Kollektiv in Übereinstimmung mit anderen Berichten auch eine Überexpression von MMP-9 in den benignen Entitäten der SDN auf. Damit erscheint die Rolle von MMP-9 in ihrer zellspezifischen Funktion bei der Erklärung eines möglichen Einflusses auf die Cancerogenese von malignen SDN fraglich (Davis et al., 1991; Soini und Autio-Harmainen, 1993; Nagel et al., 2004).

Parallel dazu erscheint eine plausible Erklärung für die vermehrte Expression von MMP-9 in Fällen mit prognostisch ungünstigen Parametern (TNM-Stadium III-IV, Metastasen, G3-Karzinome), wie in ACC's bei Frauen sowie in AC-NOS bei Männern, nicht verlässlich verwertbar. Eine spekulative Erklärung dieser Befunde als Zufallsprodukt ist ebenso leichtfertig wie unsachlich. Gleichwohl lässt sich eine glaubwürdige hypothetische Interpretation auch nicht ohne weiteres herbeiführen. Offensichtlich ruft die kleine Fallzahl der einzelnen Subgruppen eine deutliche Einschränkung der Entwicklung eines klar umrissenen spezifischen Verhaltensmusters hervor.

## **5.2 Expression von TIMP-1 und TIMP-2 in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen 1 und 2 sind entsprechend ihrer Namensgebung dafür prädestiniert, die Aktion von Matrixmetalloproteinasen im Rahmen einer ungehemmten Zellproliferation aufzuheben bzw. zu begrenzen (Hayakawa et al., 1992). Ein gutes Beispiel für die Demonstration einer derartigen Interaktion bieten maligne Tumoren, wie es von Fällen mit Karzinomen des Kolons (Zeng et al., 1995), der Schilddrüse (Shi et al., 1999) und der Mama (Brummer et al., 1999) postuliert wird. Unsere Untersuchung hat jedoch gezeigt, dass nur ein

Teil der MEC (43%) mit einer TIMP-1 Expression einhergeht. In Übereinstimmung mit anderen Autoren ist die Expressionsintensität eher als schwach zu bezeichnen (Nagel et al., 2004). Da eine ähnliche TIMP-1 Expression in anderen Karzinomentitäten nicht zu erheben ist, bleibt die Diskussion um die Expression von TIMP-1 weiterhin hypothetisch und spekulativ.

Analog zu den Ergebnissen von TIMP-1 lassen die Befunde von TIMP-2 ebenfalls keine besonderen Richtlinien hinsichtlich einer biologischen Einflussnahme auf die Cancerogenese von malignen SDN erkennen. Die untersuchten Parameter im Hinblick auf Alter, Geschlecht und Tumorstadium zeigen keinen Trend bei der Expression von TIMP-2 (Kayano et al., 2004). Die Tatsache, dass eine Expression von TIMP-2 in den benignen Tumoren der Kontrollgruppe unseres Kollektives häufiger als in den Karzinomentitäten zu beobachten ist, macht die Interpretation dieses Phänomens noch schwieriger, zumal die meisten Karzinome mit einer Expression von TIMP-2 in höheren Stadien liegen. Eine Ausnahme bildet wiederum eine Subgruppe von ACC's der großen Speicheldrüse, die mit einer signifikant höheren Expression von TIMP-2 assoziiert ist (Hongnan et al., 1997).

### **5.3 Expression von p53 in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Unseren Ergebnissen zufolge besteht keine nennenswerte Expression des Suppressorgens p53 in den benignen SDN (Rosa et al., 1997; Nordkvist et al., 2000; Alves et al., 2004). Grundsätzlich ist der Nachweis des mutierten Suppressorgens mit dem Antikörper p53 eine wertvolle Ergänzung der histomorphologischen Diagnostik in Fällen mit fraglicher Dignität. Entscheidend ist in dieser Hinsicht der Nachweis einer Überexpression und eine intensive Anfärbbarkeit der Kerne zu demonstrieren. Letzteres wird durch die Ergebnisse der p53-Expression in zwei Fällen eines CA-ex-PA unseres Kollektivs überzeugend illustriert. Während die Karzinomanteile dieser beiden Neoplasien eine intensive Überexpression aufweisen, lässt sich in den benignen Adenombereichen eine geringfügige schwache intranukleäre Reaktivität feststellen. Die positive, jedoch schwache Reaktion von p53 ist darauf zurück zu führen, dass dieser Antikörper den Wild-Typ des Suppressorgens ebenfalls miterfasst (Rosa et

al., 1996). In diesem Zusammenhang dient das Verhaltensmuster der Expression als Vergleich der jeweiligen benignen und malignen Komponenten der einen und derselben Neoplasie. Offenbar basiert die irrtümliche Annahme einer p53-Expression in benignen Entitäten durch einzelne Autoren mit Wahrscheinlichkeit auf der Beobachtung einer Expression des normalen Suppressorgens und nicht des malignitätsspezifischen mutierten Typs (Weber et al., 2002).

Eine weitere Besonderheit der Ergebnisse von p53 zeigt sich bei dem Nachweis einer Überexpression dieses Antikörpers in MEC mit prognostisch ungünstigen Parametern, wie in einigen Berichten über die Assoziation einer p53 Überexpression in höheren Stadien der Erkrankung III, IV und/oder metastasierenden Karzinomen postuliert wird (Soini et al., 1992; Deguchi et al., 1993; Ishii und Nakajima, 1994; Gallo et al., 1995; Kiyoshima et al., 2001; Xu et al., 2001). Ein ähnlicher Zusammenhang mit prognostisch ungünstigen Parametern hat sich in den anderen Entitäten nicht ergeben, wenngleich auch in den anderen Subgruppen eine erhöhte p53 Expression im vergleichbaren Prozentsatz zu beobachten ist (Kiyoshima et al., 2001; Alves et al., 2004). Möglicherweise spielt die kleine Fallzahl einzelner Subgruppen wiederum auch hier eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich besteht jedoch Grund zur Annahme, dass die Anwendung dieses Antikörpers in der Routinediagnostik hilfreich ist und zur Feststellung der Dignität in ca. 25% der Fälle einen guten Beitrag leisten kann (Nordkvist et al., 2000; Kiyoshima et al., 2001, Alves et al., 2004).

#### **5.4 Expression von HER2/neu in primären Speicheldrüsenneoplasien und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Analog zu den Befunden von p53 in den benignen SDN stellt sich für HER2/neu ein ähnliches Verhaltensmuster dar. In 9 Fällen der Adenomgruppe unseres Kollektives ergibt sich in Übereinstimmung mit einigen Autoren keine Expression von HER2/neu (Kernohan et al., 1991; Rosa et al., 1997). Es ist jedoch in den Karzinomentitäten ein deutlicher Trend einer HER2/neu Expression bzw. Überexpression festzustellen. In den Adenokarzinomen der verschiedenen Subgruppen (NOS, CA-ex-PA, Plg und SDC) liegt der Prozentsatz der HER2/neu exprimierenden Fälle teilweise bei 50 und 100%. Hingegen verhalten sich die

restlichen Tumorentitäten (ACAC, ACC, SCC, UC, BACA, MC, MEC und EMC) völlig inert (Cho et al., 1999; Dori et al., 2002).

Möglicherweise erscheint die prozentuale Angabe bei den Subgruppen des Adenokarzinoms aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht authentisch und würde möglicherweise bei größeren Fallzahlen niedriger ausfallen. Tatsache bleibt jedoch, dass zwischen den oben erwähnten Subgruppen des Adenokarzinoms und den anderen Entitäten eine scharfe Trennung zu erkennen ist. Die Annahme einer Überexpression von HER2/neu in einem Teil eines ACC Kollektives in einer Studie von Giannoni et al., (1995) scheint in anderen Berichten keine Bestätigung zu finden und ist in unserer Untersuchung ebenfalls nicht reproduzierbar.

Die Adenokarzinome, insbesondere der Subgruppe NOS weisen eine spezielle Beziehung zu dem Onkoprotein HER2/neu auf und nehmen einen zentralen Stellenwert unter den malignen SDN im Hinblick auf Diagnostik, Prognose und Therapie in unserer Studie ein. Trotz kontroverser Diskussion über die Expression dieses Onkogens in den Karzinomen der Speicheldrüse besteht unseres Erachtens ein analoger therapeutischer Ansatz für diese Tumorgruppe wie bereits von den Mammakarzinomen bekannt ist (Slamon et al., 2001; Haddad et al., 2003; Emens 2005; Locati et al., 2005; Willems et al., 2005).

Entsprechend unseren Ergebnissen zeigen 11 von 19 (58%) der Adenokarzinome (NOS, Plg, Ca-ex-PA, SDC) eine hohe Expression von HER2/neu. Hiervon lassen 2 eine moderate (2+) und 9 eine hohe (3+) Überexpression erkennen. Damit sind die Grundlagen für eine rezeptormodulierende Immuntherapie mit Herceptin (Trastuzumab) gegeben (Slamon et al., 2001; Haddad et al., 2003; Locati et al., 2005). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass ein Ansprechen auf die Herceptin-Therapie nur dann zu erwarten ist, wenn in den Tumorfällen mit Überexpression von HER2/neu gleichzeitig eine entsprechende Amplifikation nachgewiesen werden kann (Haddad et al., 2003; Skálová et al., 2003; Locati et al., 2005).

Diese Feststellung, die übrigens für die Behandlung von Mammakarzinomen mit einer moderaten Expression von HER2/neu Gültigkeit findet, war Anlaß für eine erweiterte Untersuchung sämtlicher Karzinomfälle dieser Studie auf eine mögliche Amplifikation, die mit einer Überexpression von HER2/neu assoziiert sind (Moubayed et al., 2008). In dieser Arbeit hat sich in 5 Fällen (36%) eine eindeutige Amplifikation nachweisen lassen. 4 Fälle davon gehören zu der Subgruppe des Adenokarzinoms NOS. Da diese Subgruppe einen relativ hohen Prozentsatz der

Speicheldrüsenkarzinome ausmacht. Bietet sich eine gute Gelegenheit, jene Patienten mit Tumoren, die diese Anforderungen erfüllen, einer Herceptin-Therapie zu unterziehen.

In den übrigen Subgruppen (ACAC, BCAC, MEC, ACC, SCC, MC, EMC und UC) funktioniert dieser Ansatz wegen der fehlenden Voraussetzungen nicht.

## 6. Zusammenfassung

Die Suche nach potentiellen Möglichkeiten für eine effiziente Therapie des Speicheldrüsenkarzinoms stellt eine klinische und wissenschaftliche Herausforderung dar. Zu diesem Zweck wurden 72 Fälle von Patienten mit einem behandelten primären Karzinom der Speicheldrüsen ermittelt. Weitere 9 Fälle mit benignen Speicheldrüsenneoplasien wurden als Kontrolle herangezogen.

Das gesamte Kollektiv wurde nach neuen Richtlinien der WHO klassifiziert. Klinische und morphologische Parameter einschließlich Alter, Geschlecht, Lokalisation, Tumorstadium und des histologischen Malignitätsgrades wurden ermittelt und miteinander korreliert. Aufgrund der kleinen Fallzahl in einigen Subgruppen erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Zahlenwerte. Von einer Errechnung der Signifikanz wurde abgesehen.

Die Quintessenz dieser Studie ergibt:

1. Für die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und ihre Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 lässt sich im molekularbiologischen Verhalten der Speicheldrüsenneoplasien bzw. des Speicheldrüsenkarzinoms kein spezifisches Muster nachweisen.
2. Das Suppressorgen p53 stellt eine wertvolle Ergänzung der morphologischen Diagnostik bei der Einschätzung der Dignität der jeweiligen Speicheldrüsenneoplasie dar.
3. Die Überexpression von p53 scheint bei dem Speicheldrüsenkarzinom ein Indikator für eine schlechte Prognose zu sein.
4. HER2/neu erweist sich als wichtiges Onkoprotein, dessen Expressionshäufigkeit in den Subgruppen des Adenokarzinoms der Speicheldrüsen, speziell in der Gruppe NOS richtungsbegleitend für eine Herceptinbehandlung sein kann.
5. Eine wichtige Voraussetzung für eine Rezeptor-modulierende Immuntherapie mit Herceptin ergibt die FISH-Untersuchung und der Nachweis einer Amplifikation des HER2/neu Onkoproteins.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Abiose BO, Oyejide O, Ogunniyi J: Salivary gland tumours in Ibadan, Nigeria: a study of 295 cases. *Afr J Med Sci* 19, 195-199 (1990)
2. Adams JC: Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40, 1457-1463 (1992)
3. Albeck H, Nielsen NH, Hansen HE, Bentzen J, Ockelmann HH, Bretlau P, Hansen HS: Epidemiology of nasopharyngeal and salivary gland carcinomas in Greenland. *Arctic Med Res* 51, 189-195 (1992)
4. Alves FA, Pires FR, De Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP: PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6), 593-597 (2004)
5. Armstrong JG, Harrison LB, Spiro RH, Fass DE, Strong EW, Fuks ZY: Malignant tumors of major salivary gland origin. A matched-pair analysis of the role of combined surgery and postoperative radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116, 290-293 (1990)
6. Ascani G, Pieramici T, Messi M, Lupi E, Rubini C, Balercia P: Salivary gland tumours: a retrospective study of 454 patients. *Minerva Stomatol* 55(4), 209-14 (2006)
7. Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM: Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implication for connective tissue remodelling. *Biochem J* 340, 171-181 (1999)
8. Azuma M, Tamatani T, Fukui K, Yoshida H, Kamogashira T, Ogino K, Suzuki T, Santo M: Role of plasminogen activator, metalloproteinases and the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the metastatic process of human salivary adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 54, 669-676 (1993)

9. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915 (1990)
10. Bancroft JD, Alan S: *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone Inc., 4. Auflage, 435-446, New York USA (1996)
11. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D: Tumours of the salivary glands. In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, 3. Auflage, 210-281 (2005)
12. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Siedman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson JC, Norton L: Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpression metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744 (1996)
13. Batsakis JG: Surgical excision margins; a pathologist's perspective. *Adv Pathobiol* 6, 140-148 (1999)
14. Beal KP, Singh B, Kraus D, Yahalom J, Portlock C, Wolden SL: Radiation-induced salivary gland tumors: a report of 18 cases and a review of the literature. *Cancer* 9, 467-471 (2003)
15. Bell RB, Dierks EJ, Homer L, Potter BE: Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 917-928 (2005)
16. Birkedal-Hansen H, Morre WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA: Matrix metallo-proteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 197-250 (1993)

17. Brinkerhoff CE: Regulation of metalloproteinase gene expression: implication for osteoarthritis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2, 145-164 (1992)
18. Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H: Matrix-metalloproteinase 1,2 and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 435, 566-573 (1999)
19. Byun YS, Fayos JV, Kim YH: Management of malignant salivary gland tumors. *Laryngoscope* 90, 1052-1060 (1980)
20. Calearo C, Pastore A, Storchi OF, Polli G: Parotid gland carcinoma: analysis of prognostic factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107, 969-973 (1998)
21. Caruso ML, Valentini AM: Immunohistochemical p53 overexpression correlated to c-erbB-2 and cathepsin D proteins in colorectal cancer. *Anticancer Res* 16, 3813-3818 (1996)
22. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C: Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin embedded tissue sections. *J Pathol* 171, 83-93 (1993)
23. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D`Amato L, Delia D: P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41, 178-183 (1988)
24. Chambers AF, Matrisian LA: Changing views on the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260-1270 (1997)
25. Charous SJ, Stricklin G, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB: Expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106, 271-278 (1997)

26. Chilla R: Diagnostik und Therapie der Speicheldrüsentumoren: Teil I+II. HNO 43, 627-633 u. 681-694 (1995)
27. Cho KJ, Lee SS, Lee YS: Proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. Head Neck 21, 414-419 (1999)
28. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberg A, He C, Bauer E, Goldberg GI: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J Biol Chem 63, 6579-6587 (1988)
29. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: MMP-2: Expression, activation and inhibition. Enzyme Protein 49, 7-19 (1996)
30. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. Eur J Cancer 36, 1621-1630 (2000)
31. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Reich R: MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinomas: a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. Gynecol Oncol 73, 372-382 (1999)
32. Davis GE: Identification of an abundant latent 94-kDa gelatin-degrading metalloproteinase in human saliva which is activated by acid exposure: implications for a role in digestion of collagenous proteins. Arch Biochem Biophys 286, 551-554 (1991)
33. De Clerck YA, Shimada H, Taylor SM, Langle KE: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression. Ann N Y Acad Sci 732, 222-232 (1994)

34. Deguchi H, Hironori H, Hayashi Y: C-myc, ras p21 und p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Acta Pathol Jpn* 43, 413-422 (1993)
35. Dennardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankor VM: Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP, aka EPA) structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 59, 329-341 (1993)
36. Donehower LA, Bradley A: The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1155, 181-205 (1993)
37. 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)
38. Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Buchler M, Achler G, Geass TM: Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Cancer* 85, 14-20 (2000)
39. Ellis GL, Auclair PL: Classification of salivary gland neoplasms. In Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia WB Saunders, 129-134 (1991)
40. Emens LA: Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Am J Therap* 12, 243-253 (2005)
41. Emmert-Buck MR, Emonard HP, Corcoran ML, Krutzsch HC, Foidart JM, Stetler-Stevenson WG: Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Lett* 364, 28-32 (1995)
42. Eneroth CM: Die Klinik der Kopfspeicheldrüsen. *Arch Otorhinolaryngol* 213, 61-110 (1976)

43. Epstein J, Scully C: Cytomegalovirus : a virus of increasing relevance to oral medicine and Pathology. *J Oral Pathol Med* 22, 348-353 (1993)
44. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767 (1990)
45. Felix A, El-Naggar AK, Press MF, Ordonez NG, Fonseca I, Tucker SL, Luna MA, Batsakis JG: Prognostic significance of biomarkers (c-erbB-2, p53, proliferating cell nuclear antigen, and DNA content) in salivary duct carcinoma. *Hum Pathol* 27, 561-566 (1996)
46. Flug M, Kopf-Maier P: The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat* 152, 69-84 (1995)
47. Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno C, Castellucci M, Lang I, Desoye G, Kaufmann P: Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat* 150, 55-68 (1994)
48. Gallo O, Franchi A, Bianchi S, Boddi V, Giannelli E, Alajmo E: p53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* 75, 2037-2044 (1995)
49. Gianonni C, el-Naggar AK, Ordonez NG, Tu ZN, Austin J, Luna MA, Batsakis JG: C-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 112, 391-398 (1995)
50. Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* 2, 161-166 (1984)

51. Gower WR, McSweeney EM, Dyben TE, Fabri PJ: Identification of Gastrin-producing Cells in Cell Cultures and Smears: An Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) Technique. *J Histochem Cytochem* 33, 1087-1089 (1985)
52. Greene J, Wang M, Lui YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE: Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271, 30375-30380 (1996)
53. Gunn A, Parrot NR: Parotid tumours: A review of parotid tumour surgery in the Northern Regional Health Authority of the United Kingdom 1978-1982. *Br J Surg* 75, 1144-1146 (1988)
54. Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, Weeks L, Costello R, Posner M: Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinoma. A phase II study. *Oral Oncol* 39, 724-727 (2003)
55. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M: Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol* 12, 827-834 (1999)
56. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K: Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. *FEBS* 298, 29-32 (1992)
57. Hellquist HB, Karlsson MG, Nilsson C: Salivary duct carcinoma: a highly aggressive salivary gland tumor with overexpression of c-erbB-2. *J Pathol* 172, 35-44 (1994)
58. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Beckstein WU, Neuhauser P, Gressner AM, Schuppan D: Tissue inhibitor of MMP-1 / -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150, 1647-1659 (1997)

59. Hongnan S, Ronggen H, Xiaojian Z: Molecular biology studies on metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Chin J Stomatol* 32 (6), 323-326 (1997)
60. Hsu SM, Kao MT, Lin YH: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) In immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580 (1981)
61. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335, 675-679 (1990)
62. Ishii K, Nakajima T: Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors: Studies by cytofluorometrie nuclear DNA analysis, histochemistry for nucleolar organizer regions and immunohistochemistry for p53. *Pathol Int* 44, 287-296 (1994)
63. Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA: Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34, 533-536 (2005)
64. Jensen OM, Storm HH, Jensen JS: Cancer registration in Denmark and the study of multiple primary cancers 1943-1980. *NCI Monogr* 68, 245-251 (1985)
65. Johansson N, Ahonen M, Kahari VM: Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 57 (1), 5-15 (2000)
66. Kähäri VM, Saarialho-Kere U: Matrixmetalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6, 199-213 (1997)
67. Kane WJ, Mc Caffrey TV, Olsen KD, Lewis JE: Primary parotid malignancies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117, 307-316 (1991)

68. Kaplan MJ, Johns ME, Cantrell RW: Chemotherapy for salivary gland cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95, 165-170 (1986)
69. Kayano K, Shimada T, Shinomiya T, Nakai S, Hisa Y, Aoki T, Seiki M, Okada Y: Activation of pro-MMP-2 mediated by MTI-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. *J Pathol* 202, 403-411 (2004)
70. Keller AZ: Residence, age, race and related factors in the survival and associations with salivary tumors. *Am J Epidemiol* 90, 269-277 (1969)
71. Kernohan NM, Blessing K, King G, Corbett IP, Miller ID: Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumours: an immunohistochemical study. *J Pathol* 163, 77-80 (1991)
72. Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, Matsuo K, Okamura K, Komatsu S, Rasul AM, Sakai H: Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 37(3), 315-322 (2001)
73. Klausner RD, Handler SD: Familial occurrence of pleomorphic adenoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 30, 205-210 (1994)
74. Kotwall CA: Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland. *Am J Surg* 164, 646-647 (1992)
75. Lane DP, Benchimol S: P53 oncogene or anti-oncogene? *Review Genes Dev* 4, 1-8 (1990)
76. Lanier AP, Clift SR, Bornkamm G, Henle W, Goepfert H, Raab-Traub N: Epstein-Barr virus and malignant lymphoepithelial lesions of the salivary gland. *Arctic Med Res* 50, 55-61 (1991)

77. Larbcharoensub N, Tubtong N, Praneetvatakul V, Pongtippan A, Leopairat J, Siri Kulchayanonta V: Epstein Barr virus associated lymphoepithelial carcinoma of the parotid gland ; a clinicopathological report of three cases. J Med Assoc Thai 89(9), 1536-1541 (2006)
78. Laurie SA, Licitra L: Systemic therapie in the palliative management of advanced salivary gland cancers. J Clin Oncol 24(17), 2673-2678 (2006)
79. Leong AS, Milos J: An assessment of the efficacy of the microwave antigen-retrieval procedure on a range of tissue Ag. Appl Immunohistochem 1, 267-274 (1993)
80. Levine NN, Browman GP, Gent M, Roberts R, Goodyear M: When is a prognostic factor useful? A guide for the perplexes. J Clin Oncol 9, 348-356 (1991)
81. Lin D, Shields MT, Ullrich SJ, Apella E, Mercer WE: Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to and near the restriction point in late G1 phase. Proc Natl Acad Sci USA 89, 9210-9214 (1992)
82. Liotta LA: Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res 46, 1-7 (1986)
83. Liotta LA, Kohn E: Cancer invasion and metastasis. JAMA 263, 1123-1126 (1990)
84. Liotta LA, Stelg PS, Stetler-Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64, 327-336 (1991)
85. Locati LD, Rinaldi G, Bossi P, Dagrada GP, Quattrone P, Cantú G, Licitra L: Herceptin plus chemotherapy in relapsed and / or metastatic salivary gland cancer. Oral Oncol 41, 97-98 (2005)

86. Madani G, Beal T: Tumors of the salivary glands. *Semin Ultrasound CT MR* 27(6), 452-464 (2006)
87. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashey S: Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 12, 1075-1095 (1998)
88. Matrisian LM: The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14, 455-463 (1992)
89. Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC: ImmunoMax: A Maximized Immunohistochemical Method for the Retrieval and Enhancement of Hidden Antigens. *Lab Invest* 73, 1-8 (1995)
90. Mignatti D, Pifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73, 161-195 (1993)
91. Moubayed P, Kühl M, Stellmacher F, Sommer K: HER-2/neu Overexpression in Adenokarzinomas of Salivary Glands: A Major Prognostic Factor. *Fluorescence In Situ Hybridization, Molecular Study*. (2008); (submitted for publication)
92. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 43, 791-799 (1998)
93. Nagase H, Woessner JF: Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494 (1999)
94. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B: Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 44, 222-231 (2004)

95. Nagler RM, Kerner H, Ben-Eliezer S, Minkov I, Ben-Itzhak O: Prognostic Role of Apoptotic, Bcl-2, c-erbB-2 and p53 Tumor Markers in Salivary Gland Malignancies. *Oncology* 64, 389-398 (2003)
96. Nordkvist A, Røijer E, Bang G, Gustafsson H, Behrendt M, Ryd W, Thoresen S, Donath K, Stenman G: Expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Oncol* 16, 477-483 (2000)
97. Noyek AM, Pitzker KPH, Greyson ND, Blackstein M, Chapnik JS, Shapiro BJ: Familial Warthin's tumor. I. Its synchronous occurrence in mother and son. II. Its association with cystic oncocytic metaplasia of the larynx. *J Otolaryng.* 9, 90-96 (1980)
98. O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA: Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors Correlates With Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127, 813-820 (2001)
99. Ornstein DL, Macnab J, Cohn KH: Evidence for tumor host cooperation in regulating MMP-2 expression human colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 17, 205-212 (1999)
100. Overall CM, Wrana JL, Sodek J: Transcriptional and posttranscriptional regulation of the 72 KDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor  $\beta$ 1 in human fibroblasts. Comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266, 14064-14071 (1991)
101. Pinkston JA, Cole P: Cigarette smoking and Warthin's tumor. *Am J Epidemiol* 144, 183-187 (1996)

102. Pinkston JA, Cole P: Incidence rates of salivary gland tumors: results from a Population based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120 (6), 834-840 (1999)
103. Pinto AE, Fonseca J, Martins C, Soares J: Objective biologic parameters and their clinical relevance in assessing salivary gland neoplasms. *Adv Anat Pathol* 7(5), 294-306 (2000)
104. Ponder BA, Wilkinson MM: Inhibition of Endogenous Tissue Alkaline Phosphatase with the Use of Alkaline Phosphatase Conjugates in Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29, 981-984 (1981)
105. Popescu NC, King CR, Kraus MH: Localization of the erb-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands of q 12-21.32. *Genomics* 4, 362-366 (1989)
106. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, MA Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, El-Naggar AK: Amplifikation and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54, 5675-5682 (1994)
107. Pyke C, Rafliær E, Huhtala P, Hurslainen T, Dano K, Tryggvason K: Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52, 1336-1341 (1992)
108. Qing J, Zhang Q, Wei MW, Guo ZM: Prognostic analysis of adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands of 64 cases. *Ai Zheng* 25(9), 1138-1143 (2006)
109. Rice DH, Becker TS: The salivary glands. Radiology, surgery, pathology. 2: Clinical correlations in the head and neck. Georg Thieme Verlag, New-York, 37-54 (1994)

110. Rosa JC, Fonseca I, Felix A, Soares J: p53 immunoexpression in carcinomas arising in pleomorphic adenomas. *Int J Surg Pathol* 3, 257-262 (1996)
111. Rosa JC, Felix A, Fonseca I, Soares J: Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol* 50, 661-663 (1997)
112. Rosso R, Pretolesi F, del Bono V, Buscaqlia M, Ferrando S, Farinella ST, di Biagio A, Bassetti M, Derchi LE, Visoli C: Benign lymphoepithelial parotid I Lesions in vertically HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS* 20(8), 536-541 (2006)
113. Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F: Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 53, 2199-2203 (1993)
114. Scully C: Viruses and salivary gland disease : are there associations ? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 66, 179-183 (1988)
115. Seethala RR, Barnes EL, Hunt JL: Epithelial-myoepithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 31, 44-57 (2007)
116. Seifert G, Miehke A, Haubich J, Chilla R: Epitheliale Speicheldrüsentumoren. In: Seifert G, Miehke A, Haubich J, Chilla R: *Speicheldrüsenkrankheiten. Pathologie - Klinik - Therapie -Fazialischirurgie.* Kap. 15, 181-301, Georg Thieme, Stuttgart (1984)
117. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T: A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1 / epidermal growth

- factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 82, 6497-6501 (1985)
118. Shapiro SD: Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Biol 10, 602-608 (1998)
119. Shi SR, Key MZ, Karla KL: Antigen retrieval in formalin-fix paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of sections. J Histchem Cytochem 39, 741-748 (1991)
120. Shi Y, Parher RS, Zou M, Hammani MM, Akhtar M, Lum ZP, Farid NR, Al-Sedairy ST, Paterson MC: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mRNA is elevated in advanced stages of thyroid carcinoma, Br J Cancer 79, 1234-1239 (1999)
121. Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Yamasaki Y, Urakami S, Yoneda T, Wada Y, Honda S, Nagasaki M: Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer comparison with cell proliferation and apoptosis. Oncology 56, 239-247 (1999)
122. Shima I, Sasaguri Y, Kusukawa J, Yamaha H, Tujita H, Kakegawa T, Morimatsu M: Production of matrix metalloproteinase -2 and -3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. Cancer 70, 2747-2753 (1992)
123. Shimamura A, Fisher DE: P53 in life and death. Clin Cancer Res 2, 435-440 (1996)
124. Shin KH, Park KH, Hong HJ, Kim JM, Oh JE, Choung PH, Min BM: Prevalence of microsatellite instability, inactivation of mismatch repair genes, p53 mutation, and human papillomavirus infection in Korean oral cancer patients. Int J Oncology 21, 297-302 (2002)

125. Skálová A, Stárek I, Vanecek T, Kucerová V, Plank L, Szepe P, Di Palma S, Leiro I: Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 42, 348-356 (2003)
126. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792 (2001)
127. Soini Y, Kamel D, Nuorva K, Lane DP, Vähäkangas K, Pääkkö P: Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas. *Virchows Archiv A Pathol Pathol Anat* 421, 415-420 (1992)
128. Soini Y, Autio-Harmainen H: Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A Study by in situ hybridization. *J Pathol* 170, 291-296 (1993)
129. Spiro RH: Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 8, 177-184 (1986)
130. Spiro RH, Armstrong J, Harrison L: Carcinoma of major salivary glands. Recent trends. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115, 316-321 (1989)
131. Spiro RH: Management of malignant tumors of the salivary glands. *Oncology* 12, 671-680 (1998)
132. Stearns ME, Wang M: Type IV collagenase (Mr 72000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 53, 878-883 (1993)

133. Stenman G, Sandros J, Nordkvist A, Mark J, Sahlin P: Expression of the ERBB2 protein in benign and malignant salivary gland tumors. *Genes, chromosome & cancers* 3, 128-135 (1991)
134. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M: Matrix metalloproteinases and tumor invasion: From correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 7, 147-154 (1996)
135. Sugano S, Mukai K, Tsuda H, Hirohashi S, Furuya S, Shimosato Y, Ebihara S, Takeyama I: Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma: an indicator of aggressiveness. *Laryngoscope* 102, 923-927 (1992)
136. Talvensaaari-Mattila A, Apaja-Sarkkinen M, Höyhty M, Westerlund A, Puistola U, Turpeeniemi-Hujanen T: Matrix metalloproteinase 2 immunoreactive protein appears early in cervical epithelial dedifferentiation. *Gynecol Oncol* 72, 306-311 (1999)
137. Taylor CR, Cote RJ: Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the surgical Pathologist. W.B. Sanders Company, Californien-USA, 2. Auflage, Vol. 19, 35-66 (1986)
138. Terhaard CH, Lubsen H, Rasch CR, Levendag PC, Kaanders HH, Tjho-Heslinga RE, van Den Ende PL, Burlage F: The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary gland tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61, 103-111 (2005)
139. Therkildsen MH, Christensen M, Andersen LJ, Schiødt T, Hansen HS: Salivary Gland Carcinomas. Prognostic Factors. *Acta Oncol* 37, 701-713 (1998)
140. Tian K, Chen Y, Geng N, Yang MZ, Zhang WP: Relationship of the Disturbed Balance between Matrix Metalloproteinases and their Tissue

- Inhibitors and the Invasion of Malignant Salivary Gland Tumours. Chin J Stomatol 23 (4), 273-276 (2005)
141. Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D: Management of adenoid cystic carcinomas of minor salivary glands. J Oral Maxillofac Surg 64(7), 1114-1120 (2006)
  142. Weber A, Langhanki L, Schütz A, Gerstner A, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A: Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors. Virchows Archiv 441, 428-436 (2002)
  143. Werkmeister R, Brandt B, Joos U: Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. Oral Oncol , 100-105 (2000)
  144. Westernoff TH, Jordan RC, Regezi JA, Ramos DM, Schmidt BL: Beta-6 Integrin, tenascin-C, and MMP-1 expression in salivary gland neoplasms. Oral Oncol 41, 170-174 (2005)
  145. Willems A, Gauger K, Henrichs C, Harbeck N: Antibody therapy for breast cancer. Anticancer Res 25, 1483-1489 (2005)
  146. Williams RR, Horn JW: Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and Socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. JNCI 58, 519-524 (1977)
  147. Witten J, Hybert F, Hansen HS: Treatment of malignant tumors in the parotid glands. Cancer 65, 2515-2520 (1990)
  148. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C, Apinhasmit W, Chen ZJ, Birkedal-Hansen H, Yamada KM, Stetler-Stevenson WG, Baum BJ: Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. J cell physiology 171, 117-124 (1997)

149. Xu S, Wu M, Yang Y, Wang J, Chen Z: Detection of proteins and mRNA of p16, p53 and nm23 in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands and their prognostic significance. *Chin J Pathol* 30(4), 273-275 (2001)
150. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319, 230-234 (1986)
151. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson WG, Guillem JG: Elevated levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1, 899-906 (1995)
152. Zheng R, Wang LE, Bondy ML, Wei Q, Sturgis EM: Gamma radiation sensitivity and risk of malignant and benign salivary gland tumors: a pilot case-control analysis. *Cancer* 100, 561-567 (2004)

## 8. Anhang

### A . Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
HNO	Hals-Nasen-Ohren
J	Jahre
kDa	kilo Dalton
Med. Univ.	Medizinische Universität
NOS	Not Otherwise Specified
Plg	Polymorph low grade
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

## B. Tabellen und Abbildungen

Histologie	N	MMP-2 +	MMP-9 +	TIMP-1 +	TIMP-2 +	p53 +	HER2/neu +
<b><u>Maligne</u></b>							
ACAC	6	5(2++;3+++)	5(1+;1+++;3+++)	0	5(3+;2++)	1(++)	1(+++)
ACC	21	20(3+;15+++;2+++)	10(6+;4+++)	0	13(9+;4++)	4(3+;1+++)	0
SCC	7	1(+++)	7(1++;6+++)	0	6(3+;3++)	1(+)	0
MEC	14	12(3+;9+++)	13(3+;5+++;5+++)	6(4+;2++)	10(4+;3+++; 3+++)	4(3+;1+++)	2(1+++;1+++)
UC	1	0	1(+++)	0	1(+)	1(+)	0
CA-ex-PA.	2	1(+)	2(2+++)	0	2(1+;1++)	2(1+;1++)	2(2+++)
AC-NOS	14	7(1+;2++;4+++)	10(4+++;6+++)	2(2+)	8(7+;1++)	4(3+;1+++)	7(1+++;6+++)
AC-Plg	2	2(2+++)	1(+)	0	1(+)	1(++)	1(++)
SDC	1	1(1+++)	0	0	0	0	1(+++)
BCAC	2	2(+)	2(1+++;1+++)	1(+)	2(1+;1++)	0	0
MC	1	0	1(++)	0	1(+)	0	0
EMC	1	1(+++)	0	0	0	0	0
<b><u>Gesamt</u></b>	<b>72</b>	<b>52(72%)</b>	<b>52(72%)</b>	<b>9(12,5%)</b>	<b>49(68%)</b>	<b>18(25%)</b>	<b>14(19%)</b>
<b><u>Benigne</u></b>							
PI-Ad.	4	2(2++)	4(1+++;3+++)	0	4(1+;1+++;2+++)	0	0
ZAL.	4	4(1+;2++;1+++)	4(4+++)	0	4(1+;2++;1+++)	0	0
sLA	1	1(+++)	1(++)	0	1(++)	0	0
<b><u>Gesamt</u></b>	<b>9</b>	<b>7(78%)</b>	<b>9(100%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>9(100%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>0(0%)</b>

**Tabelle 3:** Expression von MMP-2, -9, TIMP-1, -2, p53 und HER2/neu in primären Speicheldrüsenneoplasien

## **C. Danksagung**

Es gibt Menschen, die mir auf dem Weg zu meiner Dissertation im besonderen Maße zur Seite standen und denen ich zu großem Dank verpflichtet bin.

Ich möchte allen Mitarbeitern der Klinik für HNO, Klinik für KGCh und des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Lübeck meinen herzlichsten Dank für die sehr vielseitige Hilfe und Unterstützung aussprechen.

Insbesondere möchte ich mich recht herzlich bei **Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Weerda** der Klinik für HNO und **Herrn Prof. Dr. med. A. Feller** des Instituts für Pathologie bedanken, mit deren Hilfe die nötigen Mittel zur Umsetzung der Thematik meiner Dissertation zur Verfügung gestellt wurden.

Im besonderen Maße danke ich meinem Doktorvater und Betreuer **Herrn Prof. Dr. med. Pierre Moubayed**. Mit seiner Fachkompetenz war er mir vor allem in Fragen der Histopathologie und Immunhistochemie eine sehr große Hilfe.

Meinem Betreuer **Herrn Dr. med. Konrad Sommer** möchte ich für die mir entgegengebrachte Hilfe in Fragen zu Klinik und Therapie und insbesondere Aufbau und Umsetzung meiner Dissertation ein herzliches Dankeschön sagen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors für Histologie und Immunhistochemie des Instituts für Pathologie für die aufopfernde Geduld und Anleitung in Fragen des experimentellen Teils meiner Dissertation, hier besonders **Frau Katja Felbel**.

## D. Lebenslauf

### 1. Persönliche Daten

Name: Melanie Kühl, geb. Bartel  
Anschritt: Putlitzer Strasse 12, 16928 Pritzwalk  
Tel. / E-Mail: (0172/5982649) [melbom@gmx.de](mailto:melbom@gmx.de)  
Geboren am: 30. Dezember 1975  
Geburtsort: Perleberg  
Familienstand: geschieden, 1 Kind  
Hobbys: Lesen, Tanzen, Fitness, Radfahren

### 2. Ausbildung

#### 2.1. Schul- und Berufsausbildung

09/1982 bis 06/1992 Schule am Rathaus, Wittenberge  
Abschluss: Mittlere Reife  
09/1992 bis 06/1995 Oberstufenzentrum Landkreis Prignitz, Wittenberge  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
10/1995 bis 08/1998 Kreiskrankenhaus Prignitz, Wittenberge  
Abschluss: Examierte Krankenschwester

#### 2.2 Studium und Promotionsarbeit

10/1998 Medizinische Universität zu Lübeck  
Fach: Medizin  
10/2000 Beendigung der Vorklinik  
Prüfung: Physikum  
19.02. bis 20.03.2001 Famulatur im Institut für Pathologie, Lübeck  
10/2001 Beendigung des 1. klinischen Abschnittes  
18.02. bis 19.03.2002 Famulatur im Institut für Pathologie, Lübeck

15.08. bis 15.09.2002	Famulatur in der Inneren Medizin, Lübeck Bereich: Gastroenterologie
03.03. bis 30.03.2003	Famulatur in der Klinik für HNO, Lübeck
10/2003	Beendigung des 2. klinischen Abschnittes
03.11.2004	Beendigung des Studiums mit dem 1. Staatsexamen
02/2002 bis 02/2009	Promotionsarbeit im Institut für Pathologie, Lübeck - 02/2002 bis 01/2005 experimenteller Teil - 02/2005 bis 02/2009 Verfassung der Dissertation - 10/2007 bis 12/2008 Unterbrechung der Arbeit wegen Krankheit und Mutterschaftsurlaub

### 2.3. Praktische Tätigkeiten während des Studiums

10/1999 bis 08/2000	Mitarbeit an einer Studie im Labor für Infarktmarker, Lübeck, Prof. Katus Thema: Erkennung von Myokardmikroinfarkten mittels Teststäbchen zur Troponin I und Myoglobinbe- stimmung.
10/2000 bis 01/2004	Extrawache für Pflegeberufe mit überwiegender Nacht- arbeit

### 2.4. Berufliche Tätigkeit

02/2005 bis 01/2008	Assistenzärztin für Innere Medizin Keiskrankenhaus Prignitz gGmbH Dobberzinerstr. 112 19348 Perleberg
02/2008 bis 01/2009	Mutterschaftsurlaub
seit 02/2009	Assistenzärztin für Innere Medizin Klinik für Geriatrie KMG-Klinik Pritzwalk Giesensdorfer Weg 2A 16928 Pritzwalk