

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander C. Kübler

**Untersuchung des EGF-Rezeptor-Signalwegs an Karzinomen der
Kopfspeicheldrüsen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tim Frederik Schneider

aus Helsa-Eschenstruth

Würzburg, April 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter

Korreferent: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Datum der mündlichen Prüfung: 12. September 2011

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Maligne Erkrankungen der Kopfspeicheldrüsen.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Histopathologische Einteilung.....	2
1.1.3.1 Mukoepidermoides Karzinom.....	2
1.1.3.2 Adenoidzystisches Karzinom.....	3
1.1.3.3 Sonstige histologische Typen.....	3
1.1.4 TNM-Klassifikation.....	4
1.1.5 Prognose.....	5
1.1.6 Therapie	6
1.2 Signaltransduktion und Tumorgenese.....	8
1.2.1 EGFR.....	8
1.2.2 RAS und <i>Kras</i>	9
1.2.3 EGFR-Überexpression und <i>Kras</i> -Mutation als mögliche Prognosefaktoren bei Krebserkrankungen.....	10
1.2.4 Anwendung von Monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren in der Krebstherapie.....	11
1.3 Zusammenfassung.....	13
1.4 Aufgabenstellung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15

2.1.1 Systemrecherche.....	15
2.1.2 Patientenkollektiv.....	15
2.1.3 Reagenzien.....	16
2.1.4 Geräte.....	18
2.1.5 Antikörper und Primer.....	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Aufbereitung des Tumormaterials.....	19
2.2.2 Molekularpathologische Untersuchung/Mutationsanalyse.....	20
2.2.2.1 Versuchsanordnung.....	20
2.2.2.2 Sequenzierung mit dem Genetic Analyzer.....	24
2.2.3 Immunhistochemische Analyse der EGFR-Expression.....	24
2.2.3.1 EGFR-Antikörper pY1068.....	24
2.2.3.2 Vorversuche und Versuchsanordnung.....	24
2.2.4 Auswertung.....	26
2.2.4.1 Molekularpathologische Analyse.....	26
2.2.4.2 Immunhistochemische Auswertung.....	28
2.2.4.3 Statistische Analyse.....	31
2.3 Zusammenfassung.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Mutationsanalyse von <i>Kras</i>	33
3.2 Expression der EGFR Antigene.....	33
3.3 Korrelation der Scores mit dem Alter.....	34
3.4 Korrelation der Scores mit dem Geschlecht.....	36
3.5 Korrelation der Scores mit der Tumor-Histologie.....	37
3.6 Korrelation der Scores mit der Lokalisation des Primärtumors.....	39
3.7 Korrelation der Scores mit der Tumor-Größe (pT-Klassifikation).....	41

3.8 Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenbefall.....	43
3.8.1 Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenstatus (pN).....	45
3.9 Korrelation der Scores mit dem Tumor-Grading.....	46
3.10 Korrelation der Scores mit dem Tumor-Stadium.....	48
3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49
4 Diskussion.....	52
4.1 Molekularbiologische Analyse.....	52
4.2 Immunhistochemie.....	52
4.3 Expression von EGFR.....	54
4.4 Korrelationen der klinischen und pathologischen Parameter mit den Scores.....	54
5 Ausblick.....	58
6 Literatur.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung von Tumoren der Speicheldrüsen.....	2
Abbildung 2: Signaltransduktion unter EGFR-Kontrolle.....	9
Abbildung 3: Mechanismus von Anti-EGFR Therapeutika.....	12
Abbildung 4: Bild einer Gel-Elektrophorese nach DNA-Amplifikation.....	22
Abbildung 5: Bildschirm-Ausschnitt aus der Analyse der Gensequenz	27
Abbildung 6: Präparat mit intensiver Färbung der Plasmamembran.....	28
Abbildung 7: Präparat mit Färbung von Zytoplasma und Plasmamembran....	29
Abbildung 8: Positivity Scores 1-3: Anzahl gefärbter Zellen.....	30
Abbildung 9: Anteil von EGFR-positiven Proben in den Altersgruppen.....	35
Abbildung 10: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit dem Alter	36
Abbildung 11: Anteil der EGFR-positiven Proben bei den Geschlechtern.....	37
Abbildung 12: Verteilung der Scores zwischen den Geschlechtern.....	37
Abbildung 13: Anteil von EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen histologischen Tumor-Typen.....	38
Abbildung 14: Verteilung der mittleren Scores bei unterschiedlichen Tumortypen.....	39
Abbildung 15: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen.....	40
Abbildung 16: Vergleich durchschnittliche Scores und Lokalisation.....	41
Abbildung 17: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichem pT- Status.....	42
Abbildung 18: Durchschnittliche Scores und pT-Status.....	43
Abbildung 19: Anteil der EGFR-positiven Proben bei positivem/negativem Lymphknotenbefall.....	44
Abbildung 20: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit pN (positiv/negativ).....	44
Abbildung 21: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Lymphknotenstatus (pN).....	45
Abbildung 22: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit pN.....	46
Abbildung 23: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden.....	47
Abbildung 24: Durchschnittliche Scores im Vergleich zum Grading.....	47
Abbildung 25: Anteil EGFR-positive Proben nach Tumor-Stadium.....	48
Abbildung 26: Vergleich der Scores mit den Tumor-Stadien.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation.....	5
Tabelle 2:	Einteilung der Tumor-Stadien.....	5
Tabelle 3:	gebrauchsfertige Reagenzien und Arbeitsmaterialien.....	16
Tabelle 4:	hergestellte Reagenzien und deren Zusammensetzung.....	18
Tabelle 5:	verwendete Geräte.....	18
Tabelle 6:	Primer und Primär-Antikörper.....	19
Tabelle 7:	Verwendete Scores.....	31
Tabelle 8:	Intensität der Färbung (Intensity).....	31
Tabelle 9:	Ergebnisse der Auswertung der Scores.....	33
Tabelle 10:	errechnete Scores und Anzahl der jeweiligen Proben.....	34
Tabelle 11:	Korrelation der Scores mit dem Alter.....	36
Tabelle 12:	Korrelation der Scores mit dem Geschlecht.....	38
Tabelle 13:	Korrelation der Scores mit dem histologischen Tumortyp.....	39
Tabelle 14:	Korrelation der Scores mit der Tumorlokalisation.....	41
Tabelle 15:	Korrelation der Scores mit pT.....	43
Tabelle 16:	Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenbefall.....	45
Tabelle 17:	Korrelation der Scores mit dem pN-Status.....	46
Tabelle 18:	Korrelation der Scores mit dem Differenzierungsgrad.....	48
Tabelle 19:	Korrelation der Scores mit dem Tumorstadium.....	49
Tabelle 20:	Korrelation der ordinalen Variablen mit den Scores.....	50
Tabelle 21:	Korrelation der nicht-ordinalen Variablen.....	51

Abkürzungsverzeichnis

ACC:	adenoid cystic carcinoma
ATP:	Adenosintriphosphat
DAB:	Diacylbenzen
DNA:	desoxyribonucleotide acid, DNS
EGF:	epidermal growth factor
EGFR:	epidermal growth factor receptor
GTPase:	Guanosintriphosphatase
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HRAS:	Harvay-RAS
IHC:	Immunhistochemie
KRAS:	Kirsten-RAS (Protein)
Kras:	Kirsten-ras (Gen)
MAPK:	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEC:	mucoepidermoid carcinoma
MoAb:	molecular antibody
NGF:	nerve growth factor
NOS:	not otherwise specified
NRAS:	Neuroblastom-RAS
PCR:	polymerase chain reaction
PDGF:	platelet derived growth factor
RAS:	rat sarkoma (Protein)
<i>ras</i> :	rat sarkoma (Gen)
smTKI:	small molecule tyrosin kinase inhibitor
TGF α :	transforming growth factor
TNM:	tumor-nodus-metastase
UV:	ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Maligne Erkrankungen der Kopfspeicheldrüsen

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 0,4 bis 2,5 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohner sind Karzinome der Kopfspeicheldrüsen selten und haben lediglich einen Anteil von weniger als 5% aller Malignome im Kopf-Hals-Bereich [7, 38, 68].

Bei Erwachsenen sind mehr als 95% aller Speicheldrüsentumore epithelialen Ursprungs und weniger als 5% nichtepithelialen Ursprungs oder andere Tumoren (Metastasen) [61].

Das Verhältnis von benignen zu malignen Neoplasien liegt im Bereich von 2:1 [28], ist jedoch stark abhängig von der Lokalisation und beträgt laut BÖCKER et al. in der Glandula parotidea 4:1, in der Glandula submandibularis sowie in den kleinen Speicheldrüsen 1:1 und in der Glandula sublingualis 1:9 [7].

Dagegen nimmt nach HORCH et al. die Malignität auffällig von der Ohrspeicheldrüse über die Glandula submandibularis zur Glandula sublingualis bzw. zu den kleinen Speicheldrüsen zu und laut STRUTZ et al. liegen die prozentualen Anteile bösartiger Tumoren in der Glandula parotidea bei 30%, in der Glandula submandibularis bei 40% und in den kleinen Speicheldrüsen bei 70% [28, 76].

1.1.2 Ätiologie

Als allgemeine exogene Faktoren sind vor allem chemische Noxen, wie sie bei der Gummi- und Kautschukverarbeitung entstehen, Asbest, Blei, Alkoholabusus, Haarspray, nicht aber Nikotinkonsum bekannt. Als spezieller ätiologischer genetischer Faktor bei Karzinomen gelten zusätzlich chromosomale Aberrationen [28].

1.1.3 Histopathologische Einteilung

Maligne Neoplasien der Kopfspeicheldrüsen können aus verschiedenen Speicheldrüsengeweben wie Azinuszellen, Speicheldrüsengangepithelien und weiteren Zelltypen entstehen [61].

Die Einteilung erfolgt anhand pathohistologischer Kriterien wie der zellulären Pleomorphie und Atypie der Tumorzellen sowie der Anzahl atypischer Mitosen. Der Nachweis eines infiltrativen Wachstums mit Ausbreitung in die Perineuralscheiden und/oder Gefäße umliegender Gewebe sowie regionale Lymphknotenmetastasen stellen weitere Kriterien zur Unterscheidung dar [61].

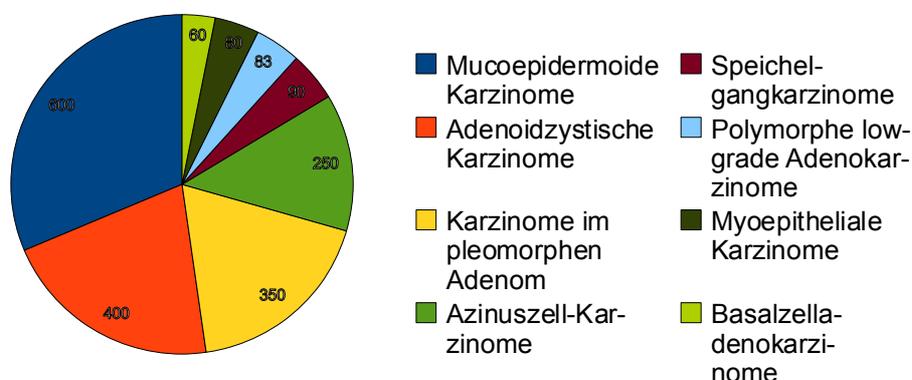


Abbildung 1: Verteilung von Tumoren der Speicheldrüsen [44]

1.1.3.1 Mukoepidermoides Karzinom

Als häufigster bösartiger Speicheldrüsentumor tritt das mucoepidermoide Karzinom (mucoepidermoid carcinoma: MEC) mit einem Anteil von ca. 20-35% an den malignen Neoplasien hauptsächlich in der Glandula parotidea und den kleinen Speicheldrüsen des Gaumens auf [7, 44, 61].

Prognostisch maßgeblich ist der Differenzierungsgrad: ohne Mitosen und Zellatypien aber mit bis zu 50% zystischen, schleimbildenden Anteilen gelten MEC als hochdifferenzierte „Low-grade“-Tumore, die eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% aufweisen [61].

Sogenannte „High-grade“-Tumore sind mit nur 10% schleimbildenden Arealen, einer hohen Mitoserate und reichlichen Zellatypien nur mäßig bis geringdifferenziert. Hier beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur ca. 25%, wobei in bis zu 50% der Fälle Halslymphknotenmetastasen nachgewiesen werden können [7, 61].

1.1.3.2 Adenoidzystisches Karzinom

Das früher auch irreführend als Zylindrom bezeichnete adenoidzystische Karzinom (adenoid cystic carcinoma: ACC) erscheint histologisch differenziert, wächst jedoch ausgeprägt infiltrativ und wird aufgrund dieser Tatsache auch als „Wolf im Schafspelz“ bezeichnet [7].

Mit einem Anteil von 8-40% ist das ACC nach dem MEC das häufigste Speicheldrüsenmalignom und ist gekennzeichnet durch einen scheinbar benignen, langsamen klinischen Verlauf sowie einem oft schmerzhaften Wachstum entlang der Perineuralscheiden (N. facialis, N. auricularis magnus) [7, 28, 45, 61].

Histologisch werden zwei Typen unterschieden: der hochdifferenzierte glanduläre Typ mit teils tubulären, teils kubischen Tumorzellen und der solide Typ, der vereinzelt kribriiforme Areale einschließt, insgesamt geringer differenziert ist und damit auch die ungünstigste Prognose hat [48, 61].

Nach LÖNING et al. kann von den tubulären und soliden Formen noch der „glandulär-cribriforme“ Subtyp histologisch abgegrenzt werden, der für diesen Tumor das typische sogenannte „Schweizer-Käse-Muster“ aufweist. Dieser Typ wird auch als mäßig differenziert bzw. „intermediate-grade“ bezeichnet [45].

Die Ätiologie und Pathogenese bei allen Formen des ACC sind noch unklar [45].

1.1.3.3 Sonstige histologische Typen

Neben den häufigsten malignen Tumoren der Speicheldrüsen machen Azinuszellkarzinome (ca. 10%) sowie Adenokarzinome (ca. 3%), Plattenepithelkarzinome, Tumormetastasen, Speicheldrüsenkarzinome, maligne Lymphome und Karzi-

nome in pleomorphen Adenomen einem Anteil von insgesamt bis zu ca. 40% aus [61].

1.1.4 TNM-Klassifikation

Neben der histologischen Einordnung werden Malignome der großen Speicheldrüsen ebenfalls durch die TNM (Tumor, Nodus, Metastasen)-Klassifikation eingeteilt, die wie bei anderen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs als Prognosefaktor therapeutisch entscheidend ist [70, 87].

Tabelle 1 und 2 zeigen die Einteilung von Speicheldrüsenkarzinomen nach der aktuell gültigen TNM-Klassifikation von 2010 sowie die Zusammenfassung der Subgruppen in Tumor-Stadien I-IVC.

Maligne Neoplasien der kleinen Speicheldrüsen werden dem jeweiligen TNM-Schema zugeordnet, das auch für die entsprechende Region bei Plattenepithelkarzinome gilt [74, 80].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation [87]

Kriterium	klinische (pathologische) Klassifikation	Beschreibung
Primärtumorgröße	TX (pTX)	Primärtumor nicht beurteilbar
	T0 (pT0)	kein Nachweis eines Primärtumors
	T1 (pT1)	Tumor in größtem Durchmesser ≤ 2cm
	T2 (pT2)	Tumor in größtem Durchmesser > 2cm und ≤ 4cm
	T3 (pT3)	Tumor in größtem Durchmesser > 4cm
	T4a (pT4a)	Tumor infiltriert Haut, Unterkiefer, Gehörgang und/oder N.facialis
	T4b (pT4b)	Tumor infiltriert Schädelbasis und/oder Proc.pterygoideus und/oder hat A.carotis eingekapselt
Lymphknotenstatus	NX (pNX)	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
	N0 (pN0)	kein Nachweis einer Lymphknotenmetastase
	N1 (pN1)	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3cm in größter Ausdehnung
	N2 (pN2)	Lymphmetastase wie unten beschrieben
	N2a (pN2a)	Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, > 3cm und ≤ 6cm in größter Ausdehnung
	N2b (pN2b)	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, jeweils ≤ 6cm in größter Ausdehnung
	N2c (pN2c)	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, jeweils ≤ 6cm in größter Ausdehnung
N3 (pN3)	Metastasen in einem Lymphknoten > 6cm in größter Ausdehnung	
Fernmetastasen	M0	kein Nachweis für Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Einteilung der Tumor-Stadien [87]

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

1.1.5 Prognose

Entscheidend für Prognose und Überlebensrate sind die histopathologische Klassifikation, das Tumorstadium (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.4) und der Malignitätsgrad [4, 73]. Bei Malignomen der kleinen Speicheldrüsen scheint das Tumorstadium prognostisch wichtiger zu sein als der Malignitätsgrad [3, 55].

Als wichtiger prognostischer Faktor für einen ungünstigen Verlauf zählt beim ACC zusätzlich die Perineuralscheideninfiltration, das solide histologische Bild sowie positive Tumorbefunde der Resektatränder [59].

Den Status der Resektatränder beschreiben LYER et al. 2010 zumindest bei Karzinomen der großen Speicheldrüsen als schlechten prognostischen Faktor für den weiteren Verlauf. In Karzinomen der kleinen Speicheldrüsen wiesen die Autoren wie auch LE et al. 1999 jedoch signifikante Korrelationen zwischen tumorpositiven Resektaträndern und einer schlechteren Prognose nach [32, 39].

Die 5-Jahres-Überlebensrate beim ACC rangiert in der Literatur zwischen 75% und 88% [5, 15, 69]. Das MEC hat eine 5-Jahres-Überlebensrate von 92%-100% in der hochdifferenzierten Form, von 62%-92% in der mäßig differenzierten Variante und von 0-43% bei den schlecht differenzierten Tumoren [56, 72].

Signifikante Prognosefaktoren für MEC sind neben Tumorstadium und Grading auch das Alter [58].

Die Tumervielfalt steht in Zusammenhang mit Histiogenese aus Zellen, die epithelialen aber auch myoepithelialen Phänotyps sein können [7].

1.1.6 Therapie

Die Therapie der Wahl bei allen malignen Neoplasien der Kopfspeicheldrüsen ist die komplette Exzision des Tumors nach Möglichkeit mit Erhalt der Funktion des Nervus facialis für den Fall, dass die Glandula parotidea betroffen ist. Je nach Malignitätsgrad kommen radikale Parotidektomien, Unterkieferresektionen, Rekonstruktionen der Haut und Dissektionen der Halslymphknoten in Frage [61].

Postoperative Bestrahlungen sind vor allem bei geringen Differenzierungsgraden, tumorpositiven Resektionsrändern, perineuralen Tumorausbreitungen, Infiltrationen des N. facialis, des Knochens und umgebenden Geweben sowie bei Lymphknotenmetastasen und Rezidiven angezeigt [61, 76, 79].

Sind Tumoren rezidivierend, nicht resektabel und/oder Patienten aus anderen Gründen nicht oder nicht mehr operabel empfiehlt sich die kombinierte Radio-Chemo-Therapie [61]. Das Ziel einer solchen Therapie ist jedoch oft nur eine Verlangsamung des Fortschreitens im Sinne einer palliativen Maßnahme [2].

Bei adenoidzystischen Karzinomen ist aufgrund der häufigen Perineuralscheideninfiltration eine R0-Resektion oft nicht möglich, weswegen neben der Exstirpation der entsprechenden Drüse die funktionelle Dissektion der Halslymphknoten Therapie der Wahl ist [61, 76].

Patienten, bei denen eine Perineuralscheideninvasion histopathologisch nachgewiesen wurde, erlitten bei postoperativ durchgeführter Radiatio signifikant seltener ein Rezidiv an der Schädelbasis als Patienten, die nicht bestrahlt wurden [11].

Gerade bei Karzinomen der großen Speicheldrüsen, deren Prognose bei einem Rezidiv aufgrund von Lymphknotenbefall, geringer Differenzierung und tumorösen Resektaträndern schlecht ist, sollte deswegen eine postoperative Bestrahlung durchgeführt werden [12].

In jedem Fall profitieren Patienten von einer chirurgischen Nachbehandlung für den Fall, dass ein Rezidiv auftritt [22].

Die Chemotherapie bei Karzinomen der Speicheldrüsen ist vor allem als palliative Maßnahme in fortgeschrittenen Krankheitsverläufen zu sehen und für Fälle vorbehalten, bei denen lokale chirurgische und strahlentherapeutische Maßnahmen nicht mehr möglich sind [37, 38].

Cisplatin- und anthrazyklinbasierte Kombinationspräparate mit Cyclophosphamid führen speziell beim ACC in bis zu einem Drittel der Fälle zum Erfolg, jedoch ist die Datenlage hierbei nur unvollständig [37].

Bei symptomfreien Patienten ist auch ein Abwarten mit engmaschiger Kontrolle der Symptome und der Option einer Chemotherapie sinnvoll [37].

Die Anwendung von neueren Chemotherapeutika wie dem gegen EGFR gerichteten monoklonalen Antikörper Cetuximab könnte neben dem Einsatz bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen auch bei Malignomen der Speicheldrüsen (speziell ACC) zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führen. Dies muss jedoch noch weiter untersucht werden [20, 42].

1.2 Signaltransduktion und Tumorgenese

1.2.1 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor EGFR) gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die das γ -Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) auf den Tyrosinrest eines Substratproteins übertragen [29, 49].

Als erstes Rezeptorsystem wurde bei EGFR diese Tyrosin-Kinase-Aktivität nachgewiesen. Fundamentale Prozesse, wie die rezeptorvermittelte Endozytose, aber auch Onkogenese und durch Mitogene aktivierte Protein-Kinase-Signalwege (MAPK) wurden an EGFR untersucht und nachgewiesen [54, 85].

Liganden wie z.B. Platelet-derived-growth-factor (PDGF) führen bei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren i.d.R. zu einer Dimerisierung, also zum Zerfall des Rezeptors in zwei Ketten [49]. EGFR wird dagegen durch die Bindung eines einzelnen EGF-Moleküls abseits der dimeren Ligandenbindungsstelle in seiner Konformation stabilisiert, sodass sich beide Rezeptorarme einander annähern [9, 14, 49, 67].

Als membranständiger Tyrosinkinaserzeptor, der durch die Bindung von EGF sowie Transforming Growth Factor (TGF α) autophosphoryliert wird, kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, die letztlich eine Wachstumsförderung der Zelle, Metastasierung sowie die Vermeidung der Apoptose zur Folge haben kann (siehe Abbildung 2) [14].

Des Weiteren spielt EGFR eine Rolle in der Zelldifferenzierung und bei der Angiogenese [14, 83]. Eine Deregulierung des EGFR-Signalweges scheint für eine Tumorprogression förderlich zu sein [14, 26, 52].

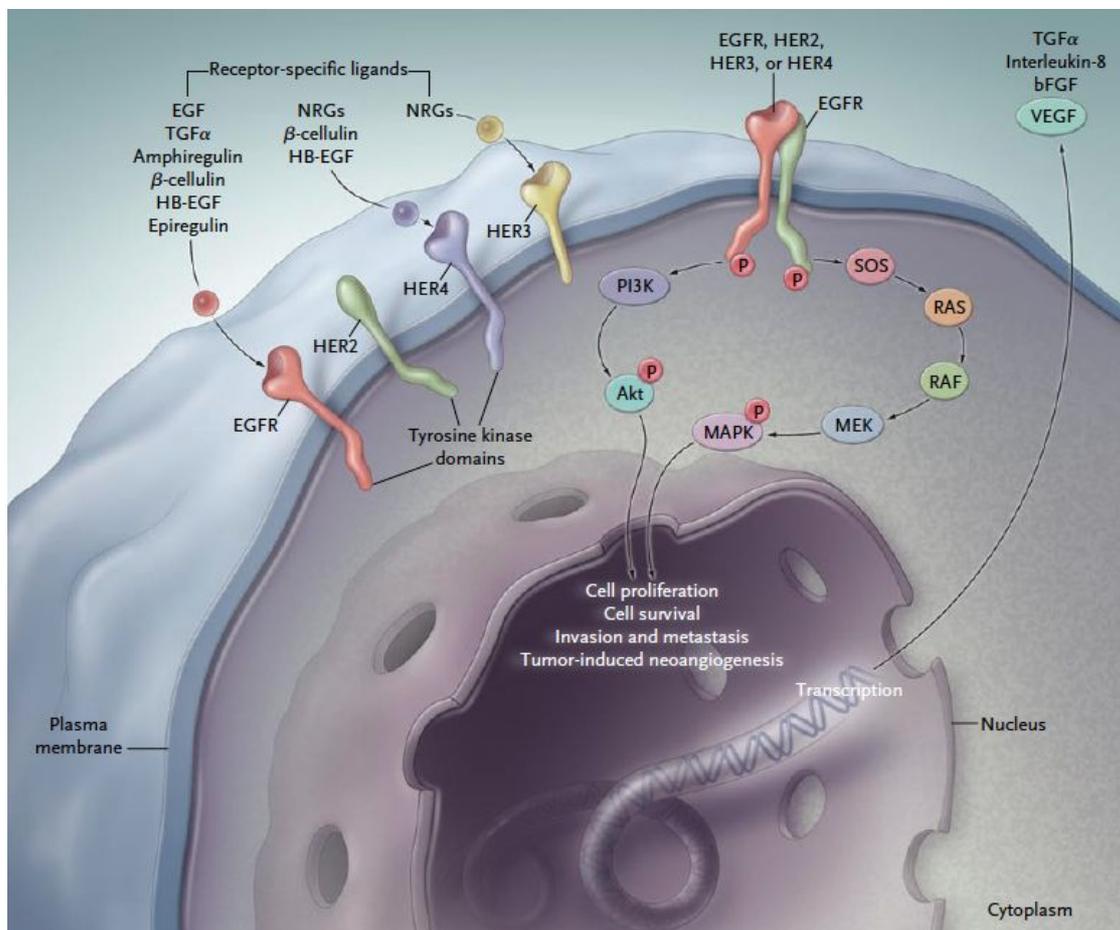


Abbildung 2: Signaltransduktion unter EGFR-Kontrolle [14]

Entscheidend für eine zelluläre Reaktion wie z.B. der Mitose als Reaktion auf einen aktivierten Wachstumsfaktorrezeptor ist die Signaltransduktion. Alle Elemente, die als hintereinandergeschaltete „Ein-/Ausschalter“ wirken und jeweils nachgeschaltete Elemente innerhalb der Signalkaskade aktivieren, sind in aktivierter Form als potenzielle Onkogenproteine zu betrachten [7].

1.2.2 RAS und Kras

Signale, die extrinsisch durch verschiedene proto-onkogenetische Wachstumsfaktoren transduziert werden, werden im RAS-MAP-Kinase-Signalweg fortgesetzt. Das Protein RAS (rat sarkoma) arbeitet als ein intrazellulärer membran-

ständiger biologischer Schalter, der das Signal von einem liganden-gesteuerten Rezeptor zu einer zytoplasmatischen MAP-Kinase-Kaskade weitergibt. Darunter fallen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und Cytokin-Rezeptoren, die die Stimulation von assoziierten "non-rezeptor" Tyrosin-Kinasen stimulieren [82].

Die *ras*-Genfamilie beinhaltet kleine G-Proteine wie die gewebsspezifisch exprimierten *Hras* (Harvey-RAS), *Kras* (Kirsten-RAS) und *Nras* (Neuroblastom-RAS) [71, 75].

EGF und NGF aktivieren das RAS-Signal über das an der inneren Plasmamembran lokalisierte KRAS-Protein, das GTPase-Aktivität besitzt. Letztendlich werden daraufhin im Zellkern Gene transkribiert, die zur malignen Progression der Tumoren führen können [75, 82].

1.2.3 EGFR-Überexpression und *Kras*-Mutation als mögliche Prognosefaktoren bei Krebserkrankungen

Autonomes Wachstum von Krebszellen kann einerseits durch eine unkontrollierte Produktion von Signalmolekülen wie Wachstumsfaktoren und andererseits durch eine erhöhte Sensibilität der Zelle auf diese Moleküle verursacht werden. So kann die verstärkte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche eine Serie von intrazellulären Signalen initiieren und letztendlich zu einer Proliferation, verstärkter Angiogenese und Metastasierung führen. Weil ein Großteil der epithelialen Tumoren beim Menschen mit einer funktionellen Aktivierung von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren einhergeht, war der epitheliale GFR der erste Wachstumsfaktorrezeptor, der als Ziel einer spezifischen Chemotherapie in Betracht kam [14].

Aber auch ohne eine Überexpression von EGFR kann der von Wachstumsfaktoren extrinsisch aktivierte Signalweg in ein unkontrolliertes Wachstum führen, wenn im weiteren Verlauf der Signalkaskade Regulationsmechanismen ausgeschaltet sind. So führen *Kras* Mutationen zu einer intrinsischen Aktivierung der EGFR-Signalkaskade unabhängig von der EGFR-Expression [75].

1.2.4 Anwendung von Monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren in der Krebstherapie

Während bereits in den 1980er Jahren die ersten „MoAbs“ (monoclonal antibodies) gegen EGFR entwickelt wurden [47], zu denen bspw. Cetuximab und Panitumumab zählen, werden heute ebenfalls sogenannte reversible „small-molecule tyrosin-kinase-inhibitors“ (smTKIs) angewandt, u.a. Erlotinib und Gefitinib sind im klinischen Einsatz [14, 31, 53].

Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von EGFR ein Ansprechen auf die Anti-EGFR Therapie vorhersagen kann und dass Patienten anhand der Expressionshäufigkeit von EGFR ausgewählt werden könnten, um von einer solchen Therapie zu profitieren [6].

Während die monoklonalen Antikörper an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des inaktiven EGFR binden und somit die Signaltransduktion direkt blockieren [40], setzen die smTKIs intrazellulär an die katalytische ATP-Bindungsdomäne der EGFR-Tyrosinkinase an und verhindern dadurch die Autophosphorylierung des Rezeptors (siehe Abbildung 3) [14].

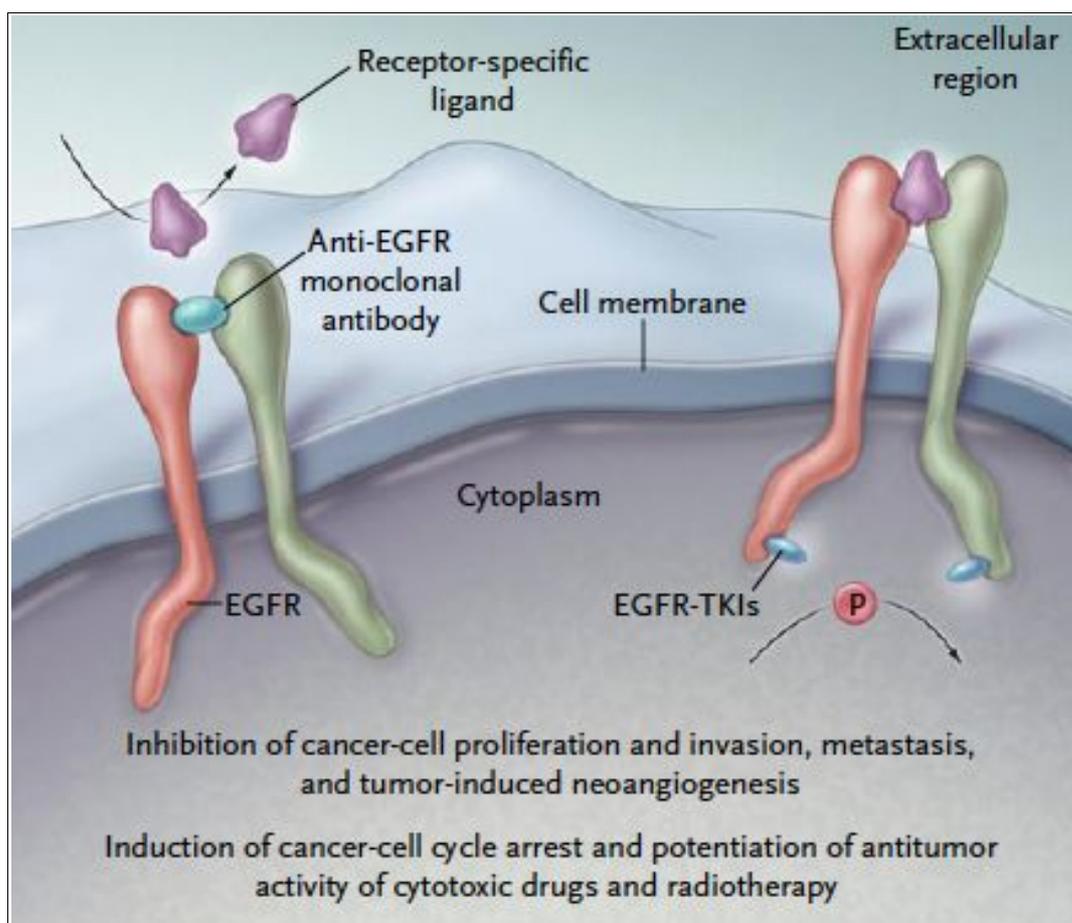


Abbildung 3: Mechanismus von Anti-EGFR Therapeutika [14]

Gerade bei solchen Patienten, die an metastasierenden kolorektalen Karzinomen leiden und auf andere Therapiemaßnahmen nicht ansprechen, verbessert Cetuximab als monoklonaler Antikörper die Überlebensdauer und verhindert das Fortschreiten des Tumorwachstums [34, 51].

Das Ansprechen auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab ist jedoch vom Mutationsstatus des *Kras*-Onkogens abhängig, sodass Patienten, bei denen eine Mutation von *Kras* nachgewiesen werden kann, nicht von Anti-EGFR-Therapeutika profitieren können, da der von extrinsischen Wachstumsfaktoren aktivierte und von den Pharmaka zu blockierende Signalweg ohnehin durch das defekte *KRAS*-Protein intrazellulär dauerhaft eingeschaltet ist [16, 27, 35, 41, 50, 75].

Werden Patienten rein konventionell behandelt, spielt eine *Kras*-Mutation hingegen keine Rolle [35].

HURWITZ et al. zeigten dagegen, dass Patienten mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen selbst dann von einer Therapie mit dem Anti-EGFR-Medikament Bevacizumab profitierten, wenn eine Mutation von *Kras* vorlag [30].

Der Mutationsstatus und die Expressionsrate von EGFR scheinen keinen Einfluss auf den Erfolg einer Anti-EGFR-Therapie bei kolorektalen Karzinomen zu haben [14, 78] und selbst Patienten mit fehlendem EGFR-Nachweis sprechen auf eine Cetuximab-Therapie an [13].

1.3 Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen der Kopfspeicheldrüsen gehören zu den selteneren Krebserkrankungen und ihre Pathogenese ist nicht vollständig geklärt.

Die Einteilung der unterschiedlichen Karzinome erfolgt anhand histologischer Kriterien sowie anhand der aktuellen TNM-Klassifikation für Malignome der großen Kopfspeicheldrüsen.

Die Therapie der Wahl ist die vollständige Tumorexzision. Sobald eine Metastasierung und/oder ein Rezidiv erfolgt, ist eine alleinige chirurgische Therapie oft nicht mehr kurativ, sondern nur palliativ wirksam im Sinne einer Tumormassereduktion.

Der EGF-Rezeptor-Signalweg einschließlich nachgeschalteter intrazellulärer Proteine ist schon heute ein Ziel von Pharmaka in der Krebstherapie einiger häufig vorkommenden epithelialer Tumorerkrankungen wie metastasierenden Kolorektal- und Bronchialkarzinomen. Die Wirksamkeit einer solchen Anti-EGFR-Therapie ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine Überexpression von EGFR sowie der Mutationsstatus des *Kras*-Gens scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen.

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Speicheldrüsentumoren vom Typ Adenoidzystisches Karzinom, Mukoepidermoidkarzinom sowie Adenokarzinom Typ NOS von 43 Patienten auf Veränderungen der Gensequenz des *Kras* Onkogens untersucht und es wurde der Expressionsstatus des aktivierten EGF-Rezeptors ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mit dem Tumorstaging (TNM) und -grading, der Tumorlokalisation, dem Geschlecht und dem Alter der Patienten verglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, Zusammenhänge zwischen einer möglichen Mutation des *Kras*-Onkogens, der Expressionshäufigkeit des EGF-Rezeptors und dem anhand klinischer und pathologischer Parameter definierten Malignitätsgrad herzustellen. Dies erscheint sinnvoll, um den möglichen Nutzen einer Anti-EGFR-Therapie wie sie bereits bei kolorektalen Karzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen durchgeführt wird, für die Behandlung von Malignomen der Speicheldrüsen abzuschätzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Systemrecherche

Unter Verwendung des Programms PAS-definitiv des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Würzburg wurden Fälle nach folgenden Kriterien gesucht: maligne Veränderung der Kopfspeicheldrüse (Diagnoseschlüssel "SP/11") sowie der Suchbegriffe "adenoidzystisch", "mucoepidermoid" und „adenokarzinom“. Die Ergebnisse in Form von Fallnummern und patientenspezifischen Informationen wurden in einer Excel-Tabelle zusammengeführt und auf Übereinstimmungen hin überprüft. Anschließend wurden die Fälle einzeln im System nach Plausibilität (Speicheldrüsenkarzinom, Lokalisation, Größe) überprüft sowie die relevanten klinischen und pathologischen Daten (Alter, Geschlecht, TNM, Grading) erfasst.

2.1.2 Patientenkollektiv

Es wurden 43 Tumorexzisate untersucht von 24 männlichen und 19 weiblichen Patienten.

Bei 23 Patienten wurde ein Adenoidzystisches Karzinom, bei 17 ein Mukoepidermoides und bei 3 Patienten ein Adenokarzinom vom Typ NOS diagnostiziert.

12 der 43 Tumoren waren pT1, weitere 12 pT2, 11 pT3 und 6 Karzinome wurden als pT4 klassifiziert.

Fernmetastasen wurden bei keinem der Fälle diagnostiziert.

Der pN-Status war bei 7 Fällen pN0, bei 3 Fällen pN1, bei 1 Fall pN2a und bei 7 Fällen pN2b. Bei den übrigen Patienten wurden keine lokalen Lymphknoten exzidiert.

2 Material und Methoden

Zusammen ergaben sich 9 Tumoren im Stadium 1, 6 im Stadium 2 und jeweils 8 in den Stadien 3 und 4.

Der Grad der Differenzierung war bei 3 Fällen gut, bei 5 mäßig und bei 10 schlecht.

Lokalisiert waren 24 Karzinome in der Glandula parotidea, 5 in der Glandula submandibularis, 11 im Bereich des weichen Gaumens und 3 in den kleinen Speicheldrüsen der Nasennebenhöhlen.

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3 und 4 stellen die verwendeten Reagenzien und Arbeitsutensilien dar, die im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Würzburg zur Untersuchung der Proben verwendet wurden.

Tabelle 3: gebrauchsfertige Reagenzien und Arbeitsmaterialien

Name	Hersteller
ABI Prism BigDye Terminator (#4336923)	Applied Biosystems, Van Allen Way 5791, PO Box 6482 Carlsbad, California 92008, USA
Agarosepulver Low EEO	AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt
AL-Puffer	QIAgen, Spoorstraat 50, 5911 KJ Venlo, Niederlande
ATL-Puffer	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
AW1/2-Puffer	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
Caps 1,5µl	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Caps 2µl	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
Coverplate-System	Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman Street Waltham, MA 02454, USA
Combitips Plus 5ml	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
dNTP-Set, 100mM Solutions (#R0181)	Fermentas GmbH, Opelstraße 9, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland
Ethanol (100%, 90%, 80%, 70%)	BrüggemannChemical, Salzstraße 131, 74076 Heilbronn, Deutschland

2 Material und Methoden

Ethidiumbromid (#45681372)	Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 96293 Darmstadt
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas 68789 St. Leon-Rot, Dtlid.
HiDi Puffer Formamide	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
HRP-Advance Nachweissystem (#K4067)	Dako, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark
Illustra Sephadex G-50 Fine DNA-Grade	GE Healthcare Bio-Sciences AB, SE-751 84 Uppsala, Schweden
Liquid DAB+ Substrate (#K3468) 1:50 verdünnt	Dako, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark
Loading Dye Gel Pilot 5x	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
Multipette Pus	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
Objekträger Thermo Scientific	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Saarbrückener Str. 248, 38116 Braunschweig, Deutschland
PB-Puffer	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
PE-Puffer	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
Pipettierplatte Microamp 96-well reaction plate	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
Pop Polymer	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
Proteinase K	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
Puffer EDTA	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
Puffer mit Magnesium	Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008, USA
Puffer ohne Magnesium	Invitrogen, 6482, Carlsbad, USA
QIAquick Mini Spin Columns	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
QIAquick PCR Purification Kit (#28106)	QIAgen, 5911 KJ Venlo, Niederlande
REAL Antibody Diluent	Dako, 2600 Glostrup, Denmark
TAQ-DNA-Polymerase	Invitrogen, 6482, Carlsbad, USA
Target-Retrieval Solution (#S1699)	Dako, 2600 Glostrup, Denmark
Xylol	CSC Jäcklechemie GmbH & Co.KG, Matthiasstraße 10-12, 90431 Nürnberg, Deutschland

2 Material und Methoden

Tabelle 4: *hergestellte Reagenzien und deren Zusammensetzung*

Reagenz/Material	Hersteller
Citronensäure-Puffer pH 6,0 42g Citronensäure 20,9g NaOH Plättchen	
PBS pH 7,4 72,0g NaCl 14,8g Na ₂ HPO ₄ 4,3g KHPO ₄	
Objektträger Silanisierung 3-Aminopropylethoxysilan Objektträger	Sigma Aldrich, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen Thermo Scientific, USA
Hämalaun nach Meyer 6g Hämatoxylin 1g Natriumjodat 250g Kaliumaluminiumsulfat 250g Chloralhydrat 5g Citronensäure 5000ml Aqua dest.	Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt AppliChem GmbH, Darmstadt AppliChem GmbH, Darmstadt
Agaroseplatten 2%ig 2g Agarosepulver 4µl Ethidiumbromid 1% 120ml TBE-Puffer 1/2	Merck KGaA, Darmstadt
TBE-Puffer 5x TRIS 270g Borat 137,5g 0,5 M EDTA pH 8,0	

2.1.4 Geräte

Für die molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 5: *verwendete Geräte*

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Druckkochtopf	WMF, Geislingen/Steige
Eindeckautomat Tissue-Tek	DiaTec, Sakura Finetek
Elektrophoresis-Power-	Pharmacia, Stockholm Schweden

2 Material und Methoden

Supply LKB GPS 200/400	
Gefrierschrank -20°C	Privileg, Fürth
Mikroskop DMLB	Leica, Wetzlar
Pipetten	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
Primus 96 Advanced	Peqlab Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2b, 91052 Erlangen, Deutschland
Schlittenmikrotom	Mikrom HM 400
Genetic Analyzer AB 3130 XL	Applied Biosystems, 6482 Carlsbad, USA
Thermomixer Komfort	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, 70 Orville Drive, Bohemia, New York, 11716, USA
Zentrifuge 5424	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland

2.1.5 Antikörper und Primer

Primer und Primär-Antikörper wurden wie in Tabelle 6 angegeben verwendet.

Tabelle 6: Primer und Primär-Antikörper

Produktname	Hersteller
KRAS-D1	Eurofins MWG Operon, Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland
KRAS-D2	
KRAS-LP	
pY1068 (#1727-1)	Epitomics, Inc. 863 Mitten Road, Suite 103, Burlingame, CA 94010-1303, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung des Tumormaterials

Nach Abschluss der Systemrecherche wurden die fallspezifischen histologischen Schnitte sowie die korrespondierenden Paraffinblöcke von vorerst vier Fällen zur Durchführung der Vorversuche begutachtet und die histologisch maligne alterierten Areale markiert.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Schnitte verschiedener Dicke hergestellt. Die immunhistochemische (IHC) Untersuchung der Expression des EGF-Rezeptors benötigt möglichst dünne Schnitte von ca. 2-3µm Schichtdicke, wohingegen für die molekularpathologische Untersuchung mehrere 5-8µm dicke Schnitte erforderlich sind um genügend Tumormaterial zu sammeln. Mit Hilfe des markierten Schnittes wurden die korrespondierenden Areale möglichst exakt vom Rest des Gewebes getrennt und in ein steriles 1,5µl fassendes Cap übertragen. Die Schnitte für die IHC-Färbung wurden dekantiert und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2 Molekularpathologische Untersuchung/Mutationsanalyse

2.2.2.1 Versuchsanordnung

Zum Nachweis der *Kras*-Gensequenz wurde der *Kras*-Primer und das Nachweissystem QIAamp® DNA sowie QIAquick® PCR purification Kit verwendet.

Das geschnittene Material wurde entsprechend der Markierung auf dem HE-Schnitt vom Objektträger abgeschabt und in ein steriles Cap überführt. Es wurden je 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K hinzugefügt und anschließend wurde das Material bei 56°C im Thermomixer für 24h zur Verdauung der Zellbestandteile stetig vermischt. Darauf folgend wurden die Proben entsprechend dem QIAamp®-Protokoll aufgereinigt:

- Zentrifugieren bei 8000 U/min für 30 s
- Hinzufügen von 200µl AL-Puffer
- Puls-Vortex für 15 s
- Erhitzen im Thermostat für 10min bei 70°
- Zentrifugieren bei 8000 U/min für 30 s
- Hinzufügen von 200µl Ethanol
- Puls-Vortex für 15 s
- Zentrifugieren bei 8000 U/min für 30 s

- Pipettieren des Produkts in QIAamp Mini spin columns dieses und in Auffang-Röhrchen platzieren
- Zentrifugieren bei 8000 U/min für 1 min
- Wechseln des Auffang-Röhrchens
- Hinzufügen von 500µl AW1-Puffer
- Zentrifugieren bei 8000 U/min für 1 min
- Wechseln des Auffang-Röhrchens
- Hinzufügen von 500µl AW2-Puffer
- Zentrifugieren bei 14000 U/min für 3 min
- Entleeren des Auffangröhrchens, Trocknen und Wiederverwenden desselben
- Zentrifugieren bei 14000 U/min für 1 min

Abhängig vom Volumen des Tumormaterials wurden anschließend zwischen 20 und 50µl Aqua dest. hinzugefügt und die Probe für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie noch einmal für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts wurde nun eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt mit folgendem Ansatz:

- 16,87µl Aqua dest.
- 2,5µl Pufferlösung (-MgCl)
- 1µl Pufferlösung (+MgCl)
- 2µl dNTP-Mix
- 0,5µl Primer *kRas* D1 (Verdünnung 1:10)
- 0,5µl Primer *kRas* LP (Verdünnung 1:10)
- 0,13µl Taq-Polymerase

2 Material und Methoden

Die angegebenen Mengen wurden je nach Probenanzahl entsprechend vervielfacht und mit jeweils 1,5µl der gereinigten Probe vermischt in ein 0,5ml Sequenzier-Cap pipettiert. Es wurden nun 35 Zyklen der PCR durchgeführt mit einer Annealing-Temperatur von 58°C, bei der es jeweils zur Bindung (Hybridisierung) des Primers an das entsprechende DNA-Template kommt.

Nach erfolgter Amplifikation wurden 4µl des PCR-Produkts mit 1µl Markersubstanz Gene Pilot Loading Dye 5x vermischt und auf ein 2%-Agarosegel geladen. Zur Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz, der keine DNA enthielt, sowie 1,3µl Gene Ruler 100bp DNA Ladder vermischt mit der Markersubstanz jeweils neben die Proben auf das Gel geladen.

Die Gelelektrophorese wurde für 15min bei 130V Gleichspannung durchgeführt. Die Agarosegel-Platten wurden anschließend unter UV-Licht betrachtet und das Bild fotografiert und ausgedruckt.

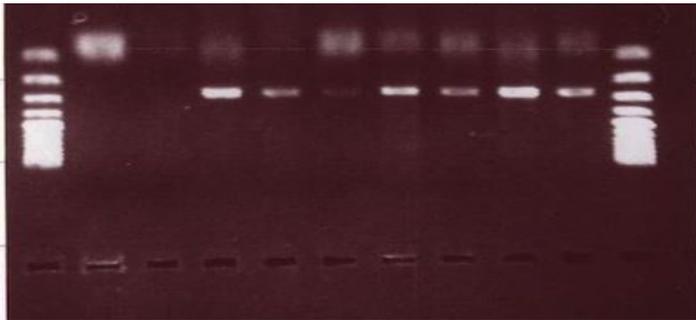


Abbildung 4: Bild einer Gel-Elektrophorese nach DNA-Amplifikation

Bei schwach ausgeprägten Banden, entsprechend einer geringen Menge des gesuchten DNA-Abschnitts, wurde erneut eine Amplifikation mit dem Produkt der ersten Amplifikation und einem Primer bestehend aus einem enger begrenzten DNA-Abschnitt (D2-Upper-Primer) durchgeführt (Nested-PCR).

Zur weiteren Aufreinigung der Probe wurden entsprechend dem QIAquick® Spin Handbook folgende Schritte durchgeführt:

- Hinzufügen von 80µl PB-Puffer und Durchmischen der Probe
- Platzieren der Probe in QIAquick-Säule und 2ml Auffangröhrchen

2 Material und Methoden

- Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 1 min
- Entsorgen des Filtrats
- Hinzufügen von 600µl PE-Puffer
- Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 30-60 s
- Entsorgen des Filtrats
- Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 2 min
- Platzieren der QIAquick-Säule in 1,5ml-Röhrchen
- Hinzufügen von 10-50µl Aqua dest. zum Lösen der DNA

Anschließend wurde das aufgereinigte Produkt noch einmal mithilfe der PCR für die anschließende Sequenzierung amplifiziert (Sequenzier-PCR). Hierfür wurden für jede Probe zwei Ansätze für beide DNA-Stränge pipettiert:

- 5µl Aqua dest.
- 2µl Sequenzer-Mix
- 1µl *Kras*-Primer (D1/D2 bzw. LP)
- 2µl der amplifizierten DNA

Dann wurde die DNA mit Hilfe einer Sephadex-Gelsäule weiter aufgereinigt:

- 1,5ml-Cap mit Pipettierspitze mit Filter sowie Schraubdeckel mit Loch
- Hinzufügen von 300µl Sephadex
- Zentrifugieren bei 3000 U/min für 3min
- Wechseln des Caps

- Hinzufügen von 10µl des Produkts der Sequenzier-PCR (jeweils für oberen und unteren DNA-Strang, d.h. zweimal pro Probe)
- Zentrifugieren bei 3000 U/min für 3min

Anschließend wurden 10µl des Filtrats mit 20µl HiDi-Puffer vermischt und in die Pipettierplatte des Sequenzers pipettiert.

2.2.2.2 Sequenzierung mit dem Genetic Analyzer

Mit dem Programm 3130XL Data Collection wurde der Genetic-Analyzer entsprechend des Pipettierschemas der Pipettierplatte programmiert mit den Einstellungen „New Sequencing Analysis“, „Sequenzierung“ und den Voreinstellungen für „Jak2“ und „Standard-Sequenzierung“.

2.2.3 Immunhistochemische Analyse der EGFR-Expression

2.2.3.1 EGFR-Antikörper pY1068

Zur Analyse der EGF-Rezeptor Expression wurde der Kaninchen-Antikörper EGFR (pY1068) Rabbit mAb der Fa. EPITOMICS verwendet.

Dieser Antikörper bindet die phosphorylierte und damit aktivierte Form der großen Bindungsstelle Y1068 [21, 77].

Das Nachweissystem und der Ablauf wurden analog dem Protokoll der Abteilung für Immunhistochemie des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Würzburg wie folgend dargestellt verwendet.

2.2.3.2 Vorversuche und Versuchsanordnung

Da bei einer immunhistochemischen Färbung verschiedene Faktoren das Ergebnis bzw. die Beurteilbarkeit eines gefärbten Präparates beeinflussen [81], wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Um eine möglichst differenzierte und objektive Beurteilung der Färbungen zu ermöglichen wurden Probeschnitte einzelner Paraffinblöcke, die Tumorsektate enthalten, mit dem Schlittenmikro-

tom zu je ca. 2µm angefertigt. Folgendes allgemeine Protokoll wurde verwendet:

- Trocknung der Schnittpräparate bei Raumtemperatur für 24h
- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol
- Rehydratation in absteigender Alkoholreihe
- Kochen der Schnitte in Pufferlösung:

Die Schnitte wurden probeweise in drei verschiedenen Pufferlösungen gekocht. Getestet wurden Citratpuffer pH 6.0, Citratpuffer pH 7.0 sowie Target Retrieval Solution pH 6.1. Die Kochzeiten betragen für Citratpuffer pH 6.0 und pH 7.0 je 13min und für Target Retrieval Solution pH 6.1 12min. Bei allen weiteren Untersuchungen wurde Target Retrieval Solution pH 6.1 verwendet, da hier das beste Färbeergebnis vorzufinden war. Weitere Vorgehensweise nach Abkühlen der gekochten Schnitte:

- Überführung in PBS-Puffer pH 7.4
- Überführen in das Coverplate-System
- Dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer
- Inkubieren der Schnitte mit 100µl Primär-Antikörper für 60 min

Getestet wurden Verdünnungen des Primär-Antikörpers 1:200, 1:500 und 1:750 verdünnt mit Dako REAL Antibody Diluent. Die Verdünnung von 1:500 stellte sich als die geeignetste heraus und wurde im weiteren Verlauf verwendet.

- Dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer
- Inkubieren der Schnitte mit HRP-Link für 20 min
- Dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer
- Inkubieren der Schnitte mit HRP-Enzyme für 20 min

- Dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer
- Inkubieren der Schnitte mit dem Chromogen DAB+ für 10 min
- Ausspülen von DAB+ mit Aqua dest.
- Gegenfärben der Schnitte mit Hämalaun nach Mayer für 3 min
- Waschen der Schnitte in Leitungswasser für 10 min
- Überführen der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Deckgläschen (Automat TissueTek)

Analog diesem Protokoll wurden 43 Tumorresektate geschnitten und gefärbt.

2.2.4 Auswertung

2.2.4.1 Molekularpathologische Analyse

Die Auswertung der DNA-Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm 3130xl Data Collection. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Graph dargestellt (Abbildung 5) und die Nukleotidsequenz konnte so abgelesen werden.

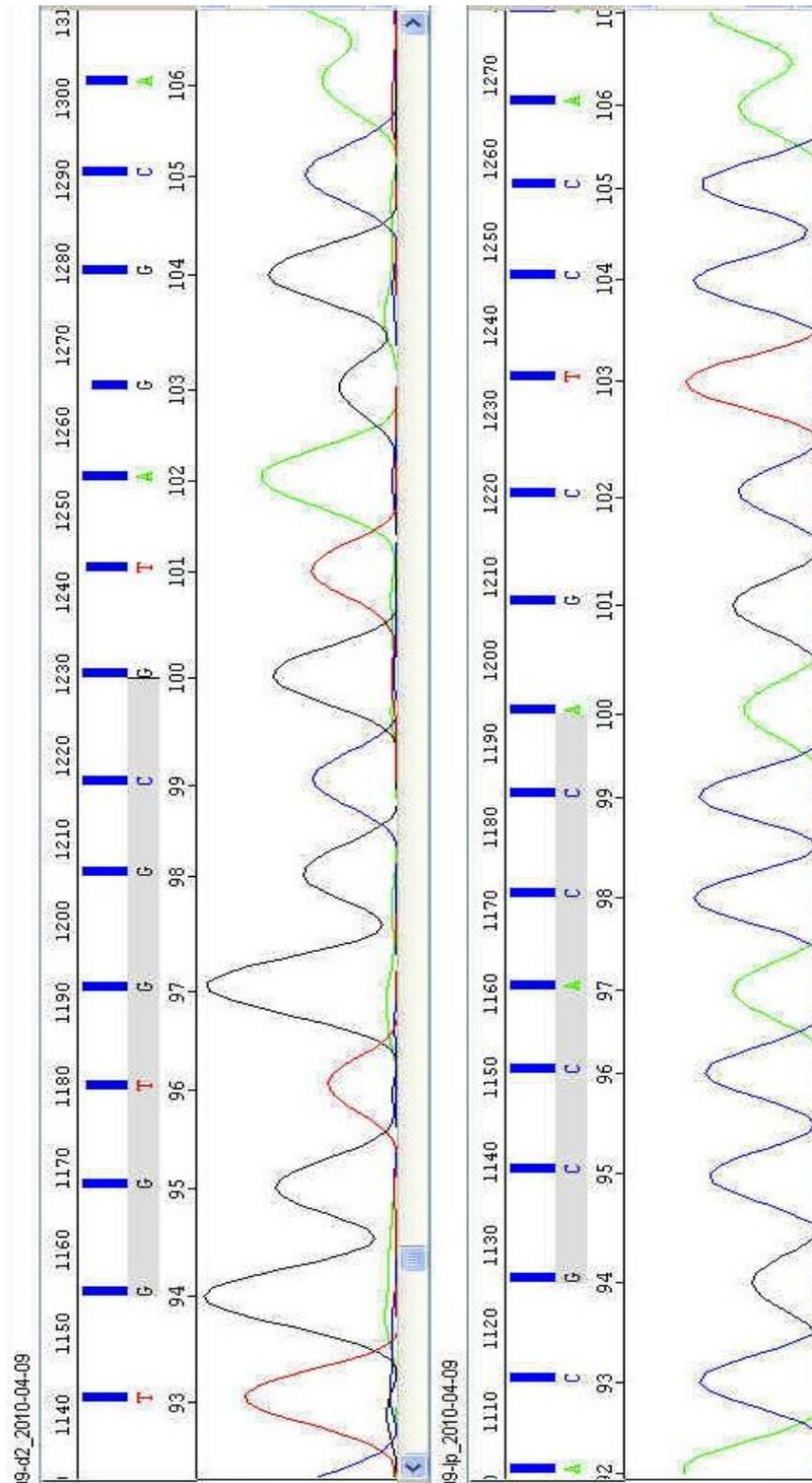


Abbildung 5: Bildschirm-Ausschnitt aus der Analyse der Gensequenz Codon 12 und Codon 13 von Upper Primer und Lower Primer markiert

2.2.4.2 Immunhistochemische Auswertung

Abbildung 6 und 7 zeigen exemplarisch Resultate der immunhistochemischen Färbung.

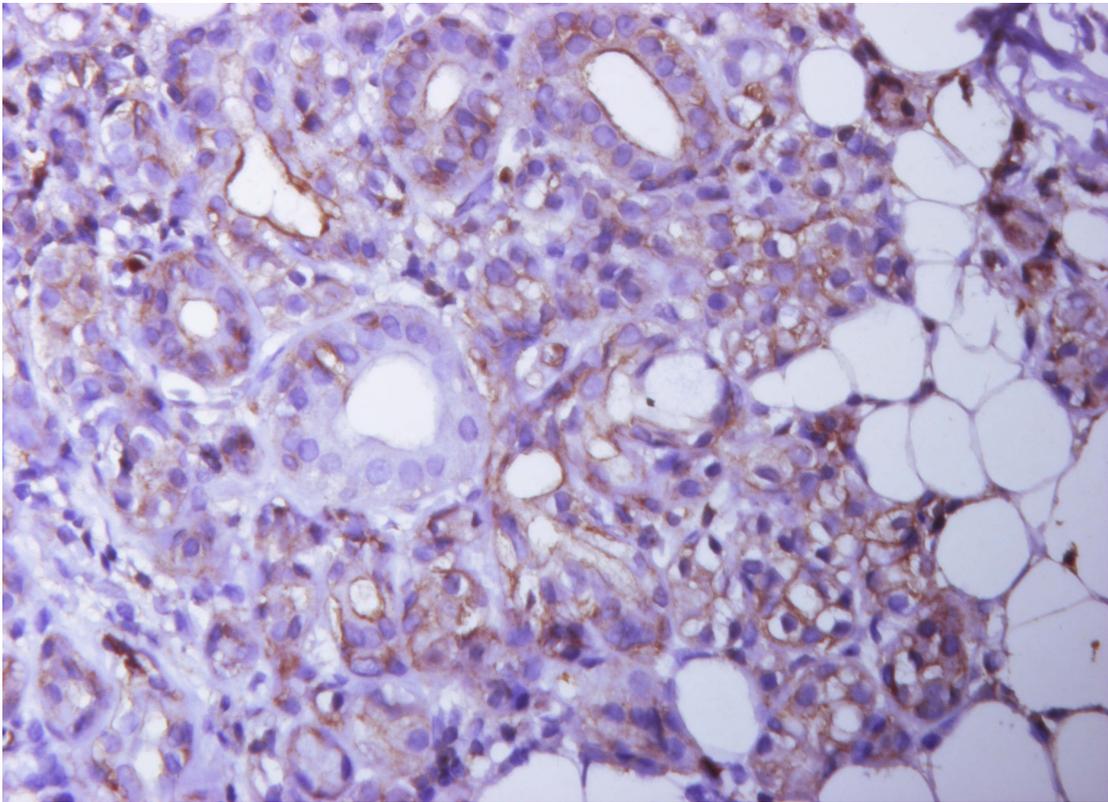


Abbildung 6: Präparat mit intensiver Färbung der Plasmamembran

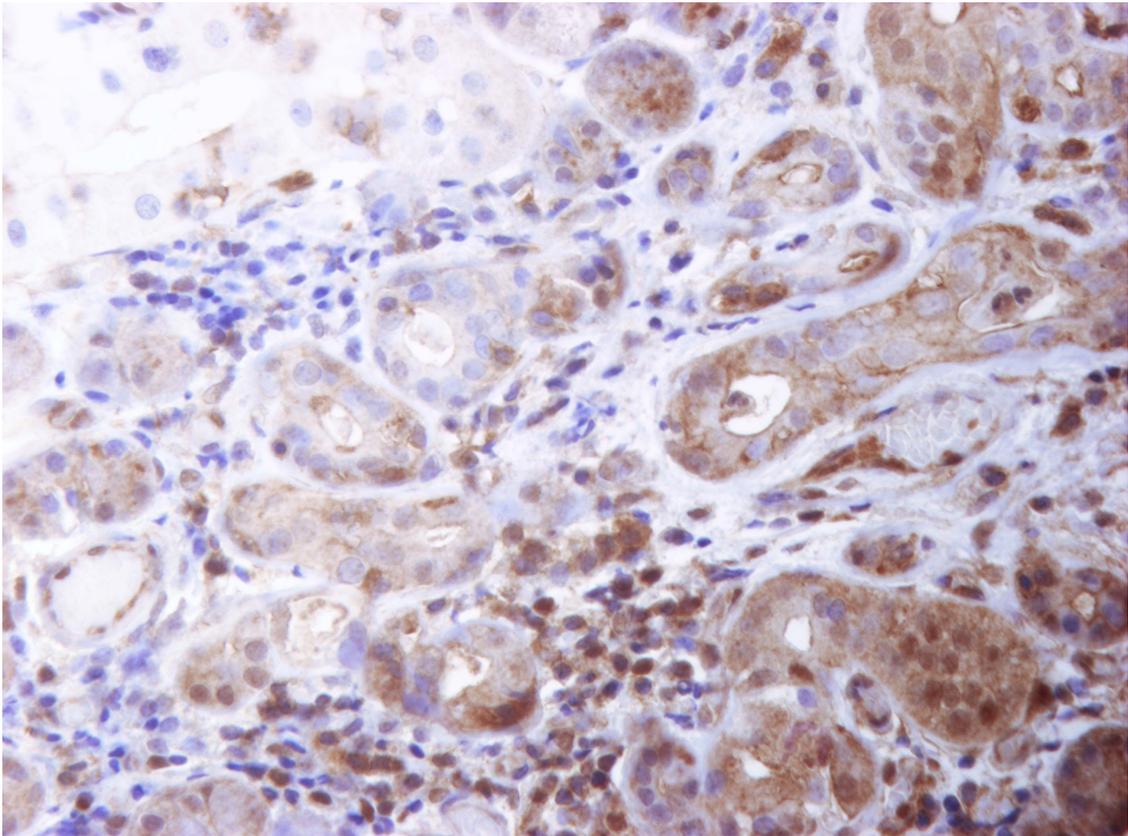


Abbildung 7: Präparat mit Färbung von Zytoplasma und Plasmamembran

Zur Quantifizierung der Färberegebnisse wurden innerhalb der Tumorareale die Anzahl der Zellen gezählt, die den Farbstoff aufgenommen hatten. Die Zählung der gefärbten Zellen erfolgte prozentual. Wie in Abbildung 8 und Tabelle 7 zu sehen, wurden dazu drei verschiedene Einteilungen der prozentualen Färbefrequenzen gewählt: *Positivity Scores 1,2 und 3*. [52].

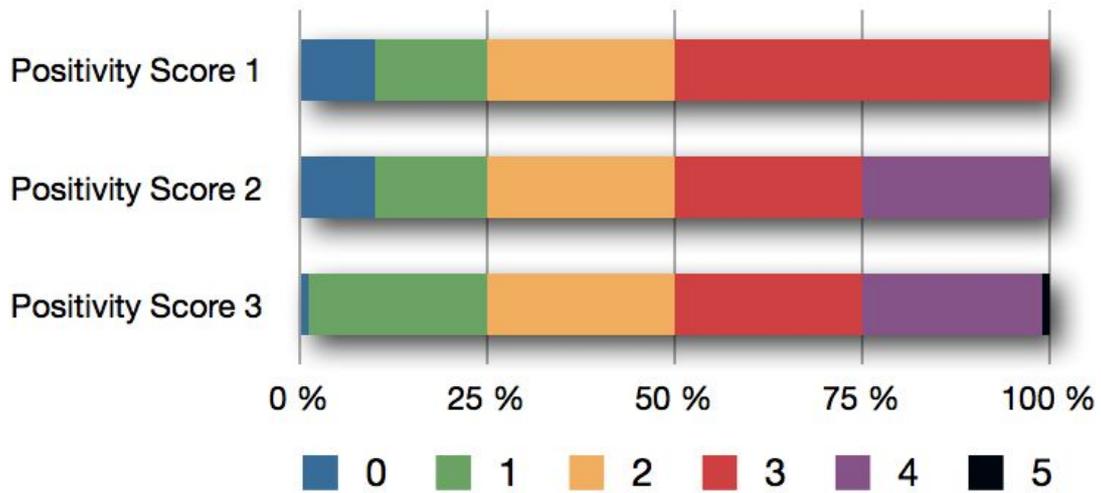


Abbildung 8: Positivity Scores 1-3: Anzahl gefärbter Zellen

Positivity Score 1 teilt das Ergebnis der Färbung in 4 Gruppen: 0-10% der gefärbten Zellen haben den Score 0, 10-25% den Score 1, 25-50% den Score 2 und Werte größer als 50% haben den Score 3.

Positivity Score 2 teilt das Ergebnis der Färbung in 5 Gruppen: Score 0-2 sind analog der Einteilung von Positivity Score 1, Score 3 beinhaltet die Werte 50-75% und zu Score 4 zählen alle Proben mit 75-100% der gefärbten Zellen.

Positivity Score 3 teilt das Ergebnis in 6 Gruppen: 0%, >0% und <25%, 25-50%, 50-75%, > 75% und <100% und 100%.

Tabelle 7: Verwendete Scores [52]

Scorename	Erklärung	Annehmbare Werte
Positivity Score 1	10-25%;25-50%;>50%	0-1-2-3
Positivity Score 2	10-25%;25-50%;50-75%;>75%	0-1-2-3-4
Positivity Score 3	0%;1-25%;25-50%;50-75%;75%-99%;100%	0-1-2-3-4-5
<i>Intensity</i>	staining intensitiy	0-1-2-3
Multiplicative Score 1	Positivity Score 1 x Intensity	0-9
Multiplicative Score 2	Positivity Score 2 x Intensity	0-12
Multiplicative Score 3	Positivity Score 3 x Intensity	0-15
Additive Score 1	Positivity Score 1 + Intensity	0-6
Additive Score 2	Positivity Score 2 + Intensity	0-7
Additive Score 3	Positivity Score 3 + Intensity	0-8

Qualitativ beurteilt wurde die Expression des EGF-Rezeptors als Intensität (*Intensity*) angelehnt an das EGFR pharm-DX Scoring System (Fa. Dako), jedoch ohne ausschließlich das Färbeverhalten der Zytoplasmamembran zu untersuchen, da der hier verwendete EGFR-Antikörper pY1068 im Gegensatz zum EGFR pharm-DX der Fa. Dako den phosphorylierten/aktivierten, und damit auch im Zytoplasma lokalisierten Rezeptor nachweist [21, 52].

Die Einteilung des Färbequalität zeigt Tabelle 8. Wie in Tabelle 7 dargestellt, wurde die qualitative Färbung (*Intensity*) mit der quantitativen (*Positivity*) jeweils in Addition und in Multiplikation verrechnet [52], sodass jeweils drei multiplizierte (*Multiplicative*) Scores und drei summierte (*Additive*) Scores entstehen, die zusammen mit der Färbeintensität für die statistische Analyse verwendet wurden.

Tabelle 8: Intensität der Färbung (*Intensity*)

Wert	Färbeverhalten
0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	moderate Färbung
3	intensive Färbung

Die Auswertung wurde vom Autor sowie von Dr. A.S. durchgeführt.

2.2.4.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte im Lehrstuhl für Statistik des Instituts für Mathematik der Universität Würzburg mit Hilfe von

SPSS 15. Angewendet wurden nicht-parametrische Tests um die einzelnen Variablen miteinander zu vergleichen. Nicht-ordinale Variablen mit zwei oder mehr nicht skalierbaren unterschiedlichen Werten (Geschlecht, Tumorart, Lokalisation) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests (Chi-Quadrat) sowie des Mann-Whitney-U-Tests mit den einzelnen Scores verglichen.

Für die Korrelationen der ordinalen Variablen zu den Scores wurden diese mithilfe von SPSS miteinander verglichen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten (Signifikanzniveaus) aller Tests erfüllen etablierte Konventionen ($p < 0,10$ tendenziell signifikant, $p < 0,05^*$ signifikant, $p < 0,001^{**}$ hochsignifikant).

Tabellen und Diagramme zur Beschreibung von Histologien, Lokalisation, Verteilung von Alter sowie Geschlecht wurden mit der Software Calc Fa. Open-Office erstellt.

2.3 Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit wurden Paraffinblöcke von Karzinomen der großen und kleinen Kopfspeicheldrüsen untersucht. Die Recherche des Patientenkollektivs erfolgte wie alle anschließenden Untersuchungsmethoden am Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

Verwendete Geräte, Chemikalien und Arbeitsutensilien sind in Kapitel 2.1.3 und Kapitel 2.1.4 aufgeführt.

Um das Tumormaterial hinsichtlich Gen-Mutationen und Expression von Oberflächenproteinen zu analysieren, wurden Methoden der Immunhistochemie und Molekularbiologie, speziell der DNA-Amplifikation mittels PCR und -Sequenzierung angewandt.

Die Auswertung der Befunde erfolgte durch den Autor sowie Dr. A.S. Die statistische Analyse erfolgte am Lehrstuhl für Statistik des Instituts für Mathematik der Universität Würzburg.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse von Kras

Die molekularbiologische Analyse zeigt bei keinem Fall Mutationen in der Kras-Gensequenz an Codon 12 und 13. Abbildung 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Sequenzanalyse eines Falles.

3.2 Expression der EGFR Antigene

34 der 43 Schnitte (79%) wurden durch den monoklonalen EGFR pY1068 Antikörper markiert und angefärbt. Bei 7/43 Schnitten (21%) konnte keine Anfärbung und somit keine Expression des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden.

Wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben zeigt Tabelle 9 die Auswertung der Färbeintensität und -häufigkeit eingeteilt in die verschiedenen Scores.

Tabelle 9: *Ergebnisse der Auswertung der Scores*

	Positivity Score 1	Positivity Score 2	Positivity Score 3	+/-	Staining
	0-3	0-4	0-5		3
0	11	11	8	9	9
1	3	3	6	34	22
2	13	13	10		11
3	16	7	10		1
4		9	8		
5			1		

Das Ergebnis der Addition bzw. Multiplikation der einzelnen Scorewerte ist in Tabelle 10 dargestellt.

3 Ergebnisse

Tabelle 10: errechnete Scores und Anzahl der jeweiligen Proben.

	Multiplicative Score 1	Multiplicative Score 2	Multiplicative Score 3	Additive Score 1	Additive Score 2	Additive Score 3
Max. Wert	9	12	15	6	7	8
Score Wert	Extent (3) x Staining (3)	Extent (4) x Staining (3)	Extent (5) x Staining (3)	Extent (3) + Staining (3)	Extent (4) + Staining (3)	Extent (5) + Staining (3)
0	11	11	9	9	9	8
1	3	3	5	2	2	1
2	8	8	8	3	3	5
3	9	6	6	8	8	8
4	5	8	4	14	11	8
5	0	0	1	6	4	6
6	6	1	4	1	5	6
7	0	0	0		1	1
8	0	5	5			0
9	1	0	0			
10		0	0			
11		0	0			
12		1	1			
13			0			
14			0			
15			0			

3.3 Korrelation der Scores mit dem Alter

Zur Veranschaulichung wurde das Patientenkollektiv wie Abbildung 9 zeigt, in vier Altersgruppen eingeteilt. Gruppe 1 beinhaltet Patienten, die jünger als 30 Jahre bei der Diagnosestellung waren. Zu Gruppe 2 werden 30-50 jährige, zu Gruppe 3 51-70 jährige und zu Gruppe 4 alle älteren Patienten zusammengefasst. Abbildung 9 zeigt den Anteil der EGFR-positiven Proben innerhalb der jeweiligen Altersgruppe.

3 Ergebnisse

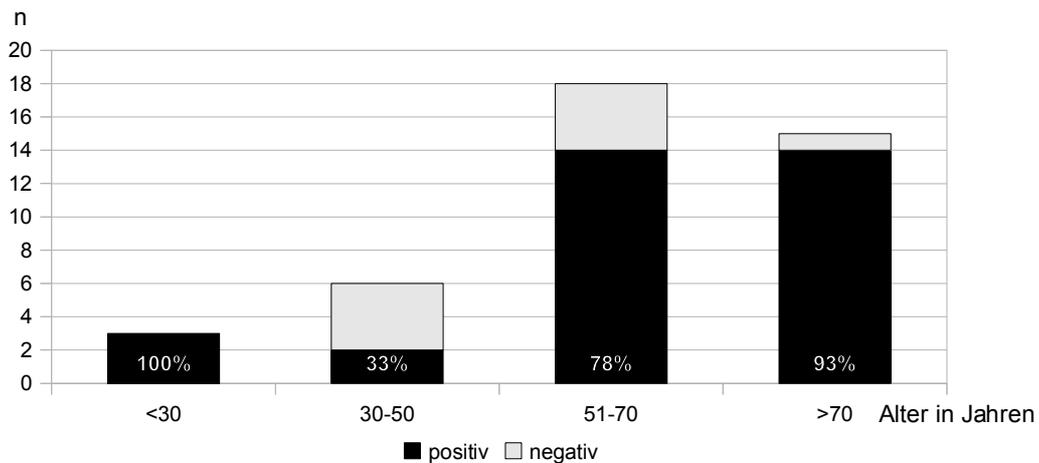


Abbildung 9: Anteil von EGFR-positiven Proben in den Altersgruppen

Die Übersicht über die Durchschnittswerte der einzelnen Scores sowie der Vergleich mit den Altersgruppen stellt Abbildung 10 dar. Es zeigt sich, dass die durchschnittlichen Scores in den beiden oberen Altersgruppen von 50-70 bzw. über 70 Jährigen über den Gesamtdurchschnittscores liegen.

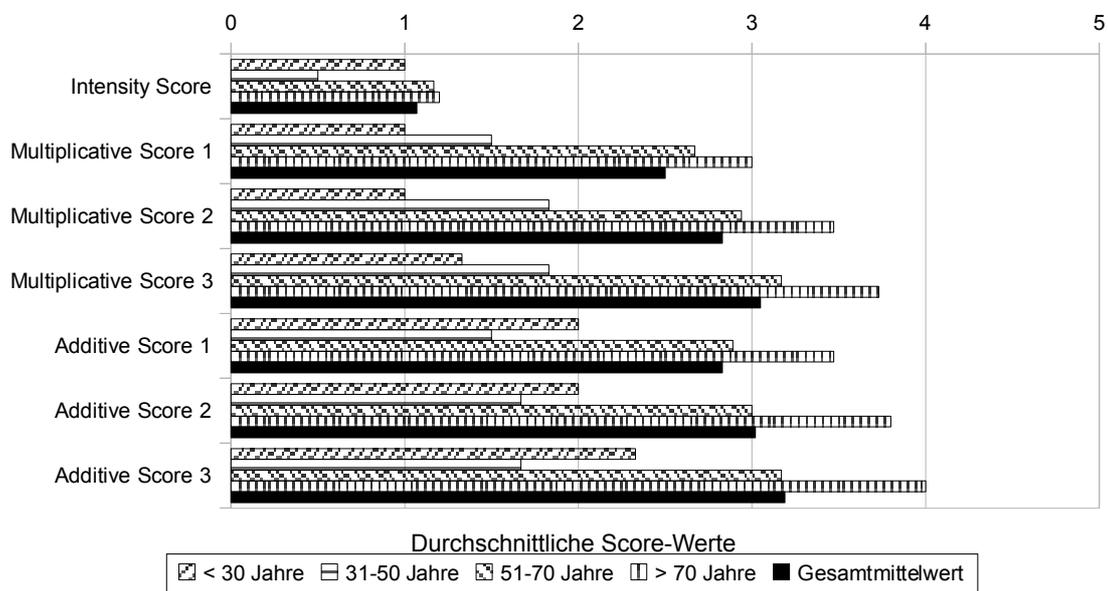


Abbildung 10: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit dem Alter

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ansteigenden Alter und der Höhe der sechs errechneten Scores ($p = 0,017$)

bis $p = 0,049$) wie Tabelle 8 zeigt. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Intensität der Färbung und dem Alter besteht nicht ($p = 0,156$).

Tabelle 11: Korrelation der Scores mit dem Alter

Score	Korr. Koeff.	p
Intensity Score	0,196	0,156
Multiplicative Score 1	0,256	0,049*
Multiplicative Score 2	0,284	0,028*
Multiplicative Score 3	0,271	0,034*
Additive Score 1	0,286	0,029*
Additive Score 2	0,308	0,017*

3.4 Korrelation der Scores mit dem Geschlecht

Wie Abbildung 11 zeigt, sind 71% der Tumor-Exzisate von männlichen Patienten und 89% von weiblichen Patienten positiv für eine EGFR-Expression.

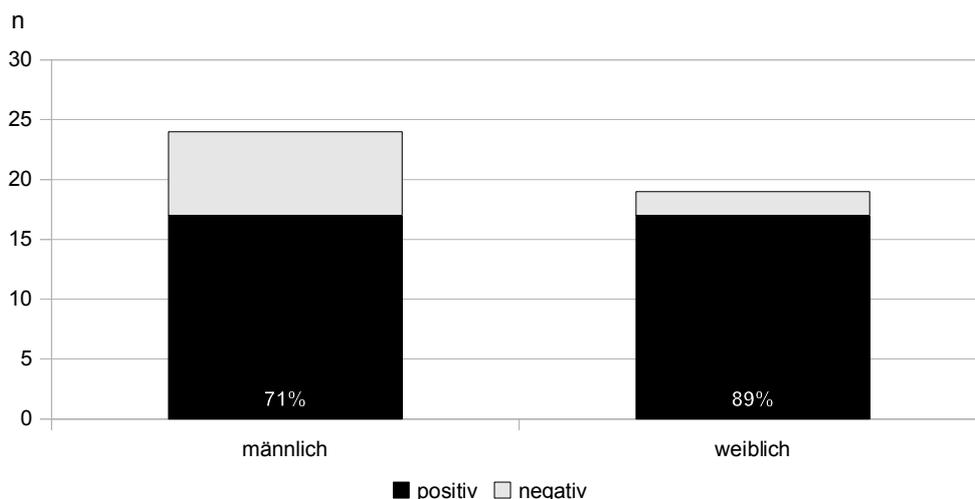


Abbildung 11: Anteil der EGFR-positiven Proben bei den Geschlechtern

Die Mittelwerte für die einzelnen Scores liegen bei männlichen Proben sowohl bezüglich der Intensität als auch der prozentualen Verteilung geringfügig unter den globalen Mittelwerten. Die Mittelwerte der Scores bei weiblichen Proben liegen jeweils über den globalen Mittelwerten wie Abbildung 12 zeigt.

3 Ergebnisse

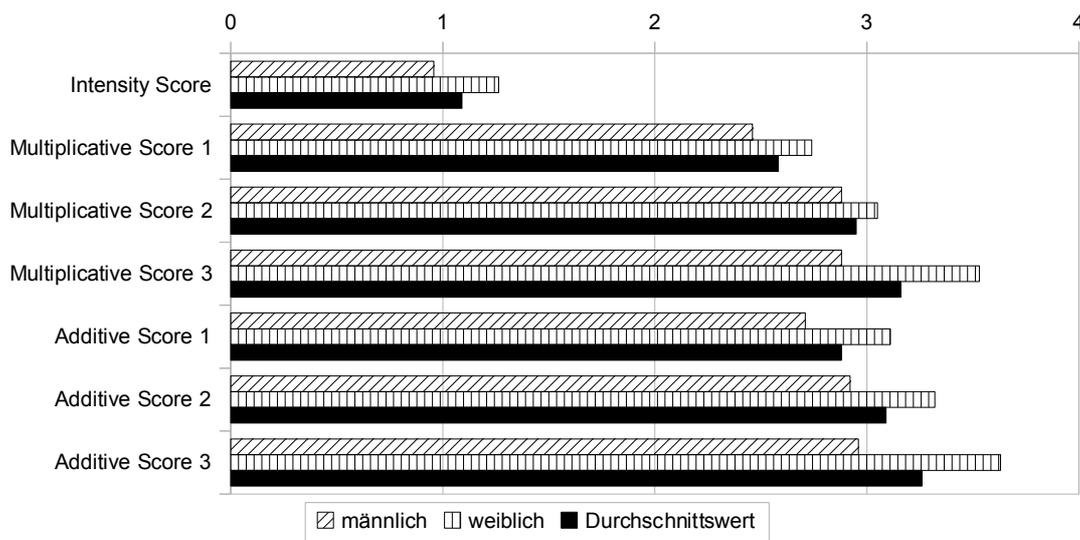


Abbildung 12: Verteilung der Scores zwischen den Geschlechtern

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Geschlecht und der Höhe der Scores besteht nicht (Tabelle 12).

Tabelle 12: Korrelation der Scores mit dem Geschlecht

	Mann-Whitney-U	Wilcoxin-W	Sign.
Intensity Score	172,000	472,000	0,135
Multiplicative Score 1	196,500	496,500	0,433
Multiplicative Score 2	196,000	496,000	0,426
Multiplicative Score 3	184,000	484,000	0,276
Additive Score 1	197,500	497,500	0,443
Additive Score 2	197,500	497,500	0,448
Additive Score 3	186,500	486,500	0,304

3.5 Korrelation der Scores mit der Tumor-Histologie

Abbildung 13 zeigt die Verteilung der verschiedenen histologischen Tumortypen. Begutachtet wurden 23 Proben vom Typ Adenoidzystisches Karzinom, 17 vom Typ Mukoepidermoides Karzinom und 3 Adenokarzinome „not otherwise specified“ (NOS), entsprechend einem Anteil von jeweils 53%, 40% und 7% des Gesamtkollektivs. EGFR-positiv waren 78% der Exzysate vom Typ ACC, 82% vom Typ MEC und 67% der Adenokarzinome NOS.

3 Ergebnisse

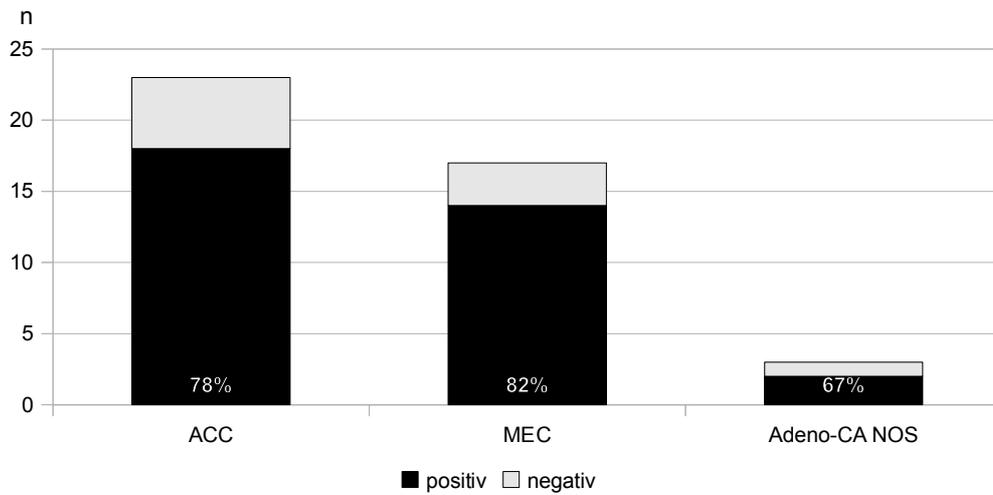


Abbildung 13: Anteil von EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen histologischen Tumor-Typen

Die mittleren Scores der Adenoidzystischen Karzinome liegen geringfügig über den Mittelwerten aller untersuchten Proben während die Scores von Mukoepidermoiden und NOS Adenokarzinomen geringfügig darunter liegen (Abbildung 14).

3 Ergebnisse

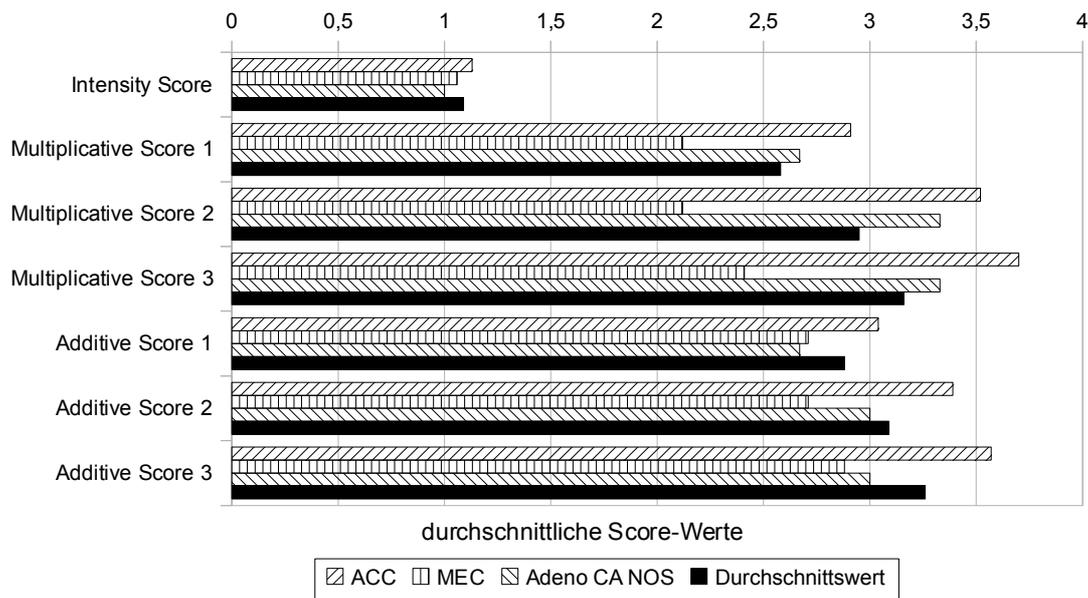


Abbildung 14: Verteilung der mittleren Scores bei unterschiedlichen Tumortypen

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem histologischen Tumortyp und der Höhe der Scores besteht jedoch nicht (Tabelle 13)

Tabelle 13: Korrelation der Scores mit dem histologischen Tumortyp

	Chi-Quadrat	p
Intensity Score	0,080	0,963
Multiplicative Score 1	0,440	0,802
Multiplicative Score 2	0,930	0,628
Multiplicative Score 3	0,810	0,668
Additive Score 1	0,740	0,692
Additive Score 2	1,320	0,517
Additive Score 3	1,350	0,510

3.6 Korrelation der Scores mit der Lokalisation des Primärtumors

Zur näheren Betrachtung wurden die Tumoren der unterschiedlichen Lokalisationen in vier Gruppen zusammengefasst: Ohrspeicheldrüse, Glandula submandibularis, kleine Speicheldrüsen im Bereich des weichen Gaumens sowie der Nasennebenhöhlen. Abbildung 15 stellt die Häufigkeit der einzelnen Tumorlokalisationen sowie der Anteil der EGFR-positiven Proben daran jeweils dar.

3 Ergebnisse

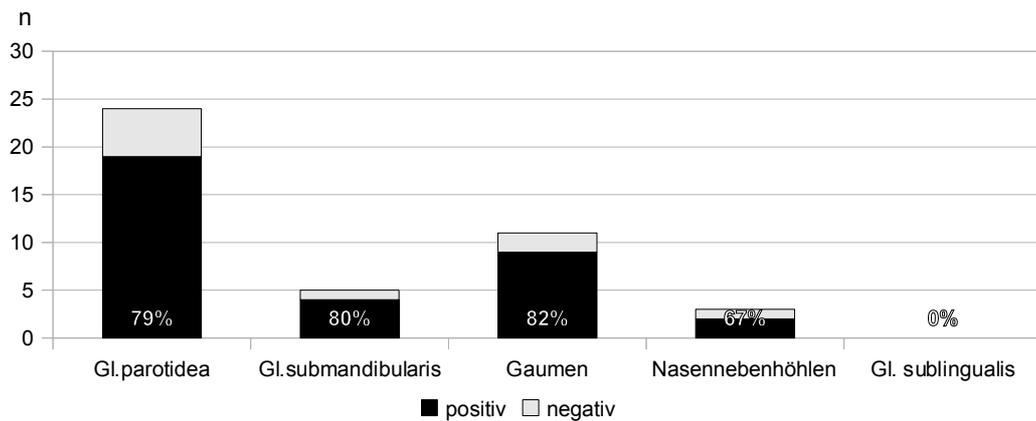


Abbildung 15: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen

Abbildung 16 zeigt, dass Tumoren, die dem weichen Gaumen und den Nasennebenhöhlen entstammen, im Mittel höhere Scores haben als das Gesamtkollektiv. Tumoren der Ohrspeicheldrüse zeigen nicht signifikant geringere Scores im Mittel.

3 Ergebnisse

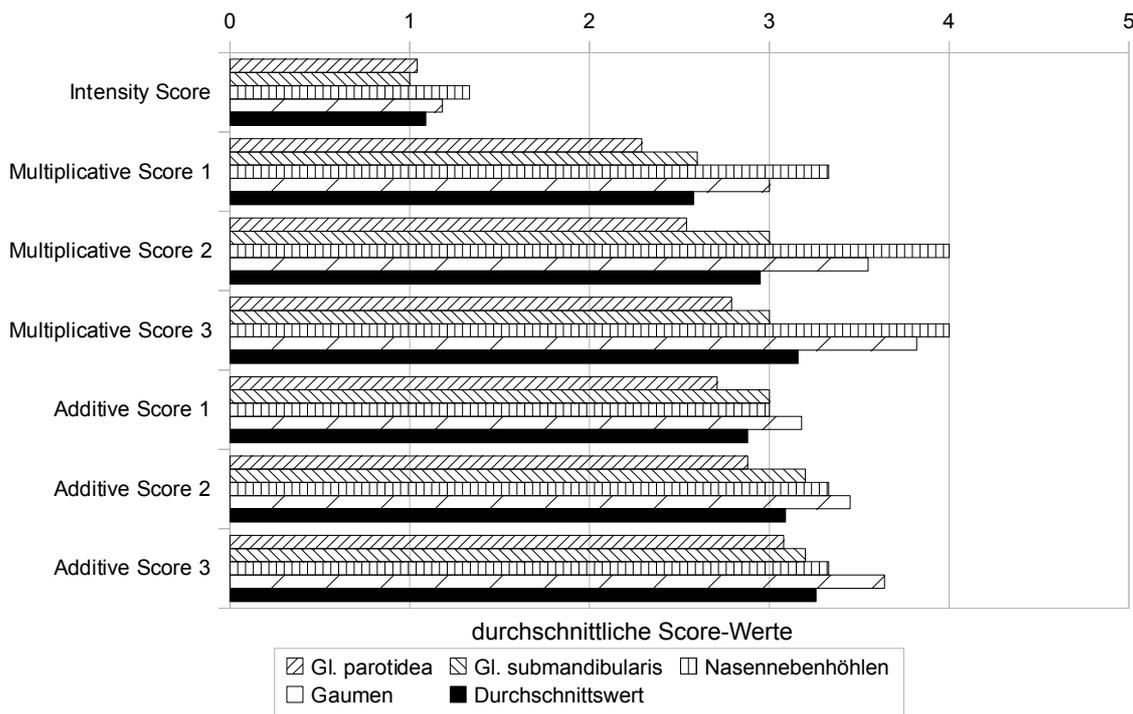


Abbildung 16: Vergleich durchschnittliche Scores und Lokalisation

Eine signifikante Korrelation zwischen Lokalisation des Primärtumors und Höhe der Scores besteht jedoch nicht (Tabelle 14).

Tabelle 14: Korrelation der Scores mit der Tumorlokalisation

	Chi-Quadrat	p
Intensity Score	0,600	0,897
Multiplicative Score 1	0,900	0,826
Multiplicative Score 2	0,810	0,848
Multiplicative Score 3	0,800	0,849
Additive Score 1	0,950	0,813
Additive Score 2	0,890	0,829
Additive Score 3	0,690	0,876

3.7 Korrelation der Scores mit der Tumor-Größe (pT-Klassifikation)

Wie in Kapitel 1.1.4 dargelegt, werden Tumoren der großen Speicheldrüsen anhand der TNM-Klassifikation eingeteilt. Abbildung 17 zeigt die Aufteilung des

3 Ergebnisse

Gesamtkollektivs in die entsprechenden Kategorien für die Größe der Primärtumoren.

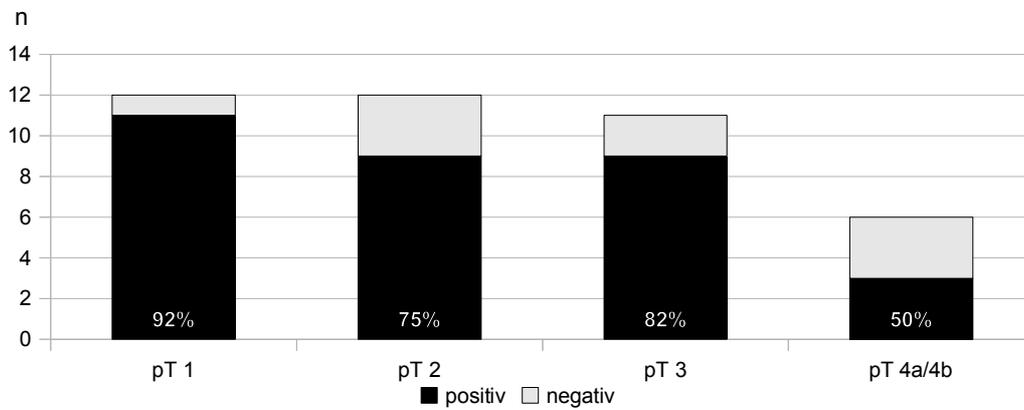


Abbildung 17: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichem pT-Status

Die Höhe der durchschnittlichen Scores innerhalb der einzelnen Gruppen zeigt Abbildung 17. Wie in Abbildung 18 zu erkennen, sind die durchschnittlichen Scores der Gruppe pT1 höher als die der anderen Gruppen.

3 Ergebnisse

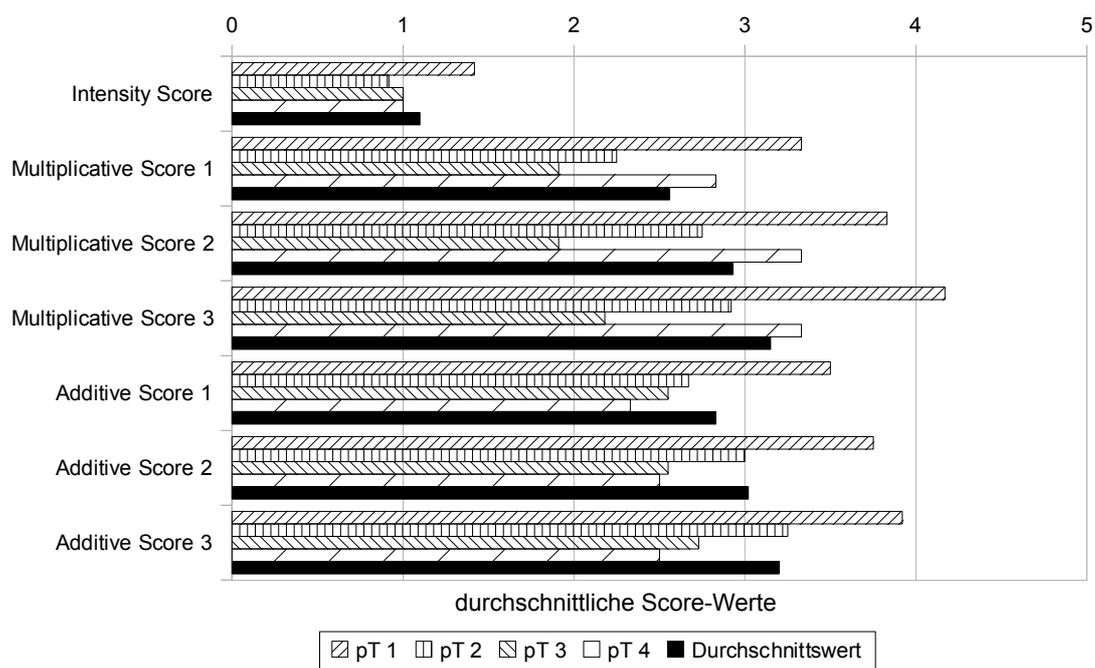


Abbildung 18: Durchschnittliche Scores und pT-Status

Dieser Zusammenhang zeigt sich bei einem Score (*Additive Score 3*) als Tendenz auf dem Signifikanzniveau ($p = 0,100$), so dass sich hierbei die Variable pT invers zur Höhe des Scores verhält. D.h. je größer pT, desto kleiner die Scores (Tabelle 15).

Tabelle 15: Korrelation der Scores mit pT

	Korr. koeff.	p
Intensity Score	-0,213	0,119
Multiplicative Score 1	-0,196	0,127
Multiplicative Score 2	-0,200	0,118
Multiplicative Score 3	-0,206	0,104
Additive Score 1	-0,196	0,131
Additive Score 2	-0,200	0,119
Additive Score 3	-0,209	0,100

3.8 Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenbefall

Von 43 untersuchten Fällen wurden bei 18 Lymphknoten exstirpiert und histologisch begutachtet. Abbildung 19 zeigt die Verteilung von EGFR-positiven Proben unter den Tumoren mit und ohne Lymphknotenbefall gekennzeichnet als pN-positiv bzw. pN-negativ.

3 Ergebnisse

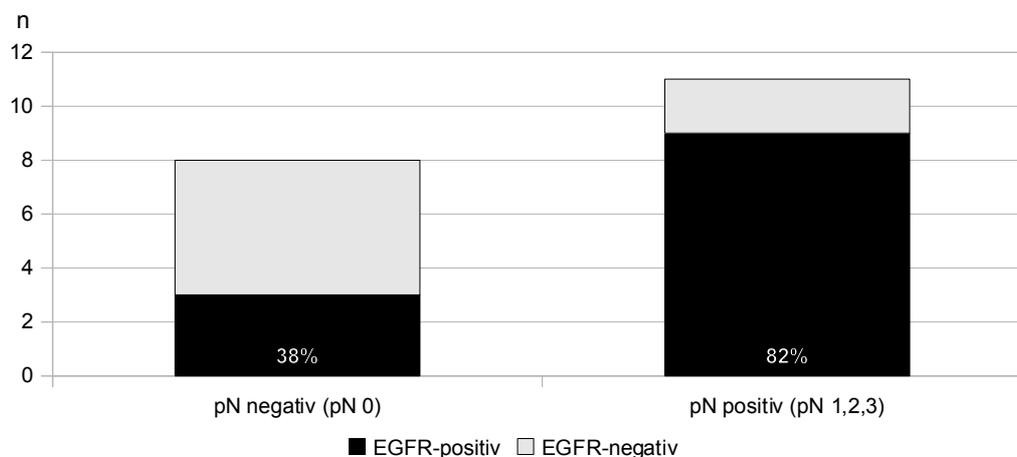


Abbildung 19: Anteil der EGFR-positiven Proben bei positivem/negativem Lymphknotenbefall

Wie in Abbildung 20 dargestellt, sind die durchschnittlichen Scores bei Tumoren mit lymphogener Metastasierung (pN1, pN2a, pN2b, pN3) höher als bei Tumoren ohne Lymphknotenbefall (pN0). Fälle, bei denen keine Lymphknoten histologisch untersucht wurden, sind in dieser Darstellung ausgenommen und wurden zur Berechnung der Korrelationen nicht mit herangezogen.

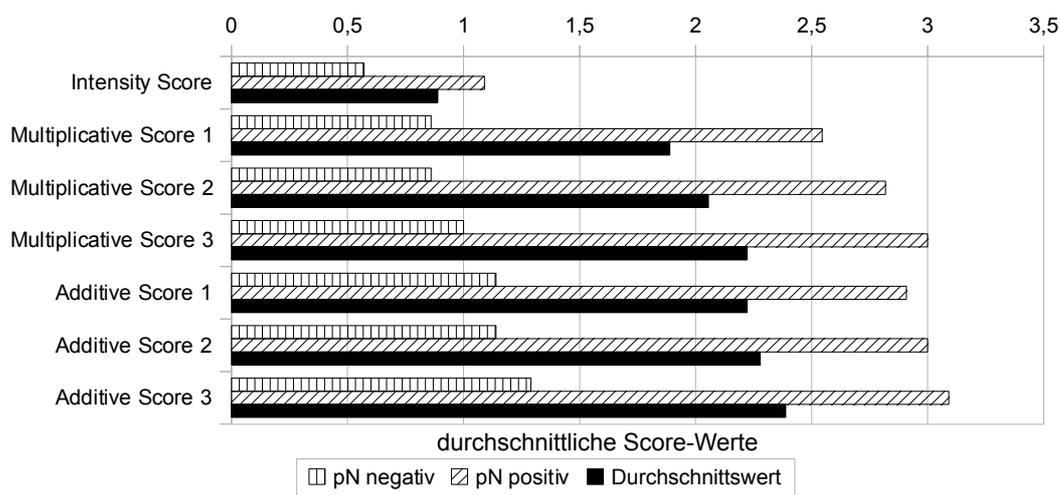


Abbildung 20: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit pN (positiv/negativ)

Dieser Zusammenhang ist bei allen berechneten Scores statistisch hochsignifikant bis signifikant ($p = 0,001$ bis $p = 0,038$, siehe Tabelle 16)

3 Ergebnisse

Tabelle 16: Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenbefall

	Korr. koeff.	p
Intensity Score	0,313	0,127
Multiplicative Score 1	0,373	0,021*
Multiplicative Score 2	0,344	0,038*
Multiplicative Score 3	0,341	0,026*
Additive Score 1	0,467	0,001**
Additive Score 2	0,460	0,001**
Additive Score 3	0,439	0,001**

3.8.1 Korrelation der Scores mit dem Lymphknotenstatus (pN)

Bei der detaillierten Betrachtung der Gruppen bzgl. des Lymphknotenstatus ergibt sich eine Verteilung der EGFR-positiven Proben wie in Abbildung 21 zu sehen.

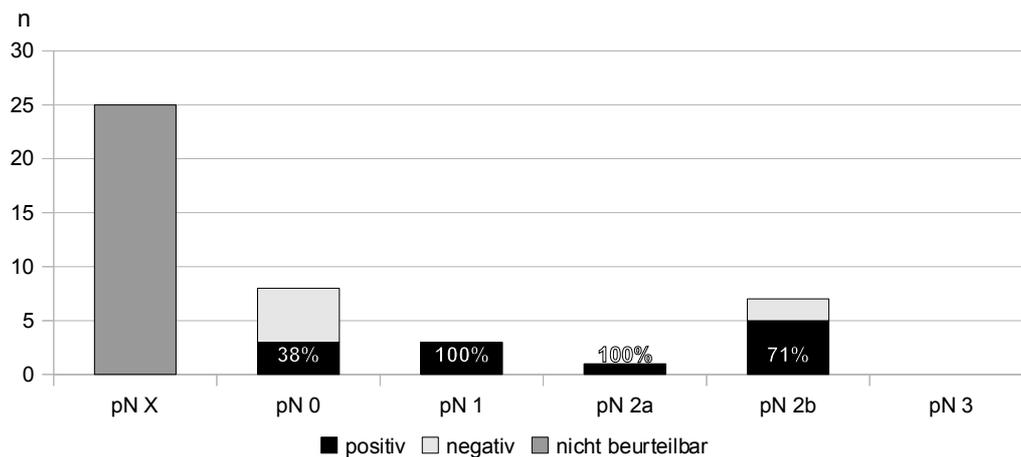


Abbildung 21: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Lymphknotenstatus (pN)

Es zeigt sich, dass die Scores im Durchschnitt mit dem pN-Status ansteigen, wie Abbildung 22 veranschaulicht.

3 Ergebnisse

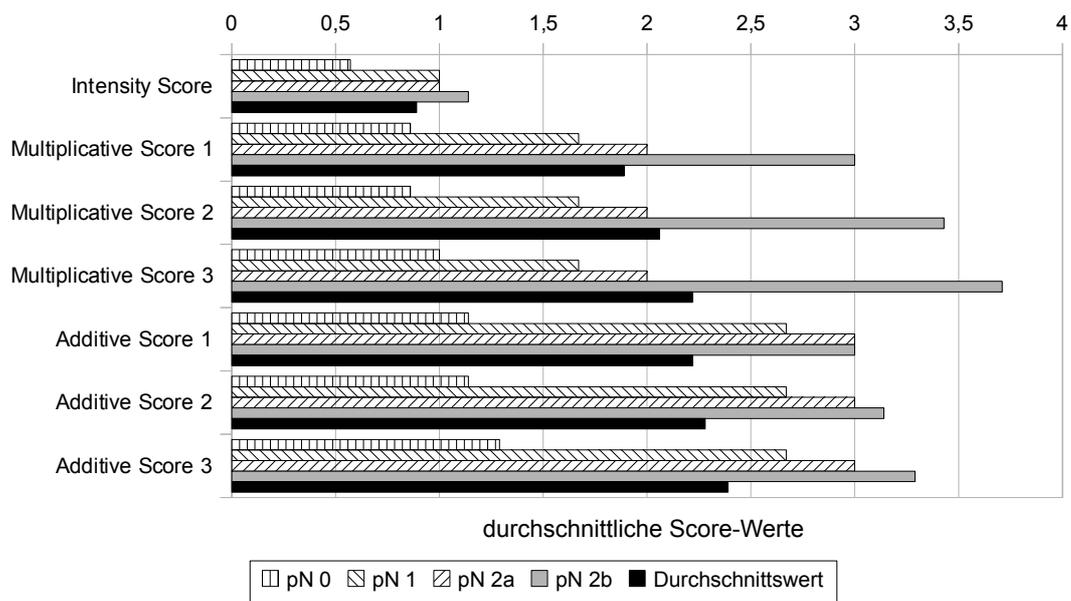


Abbildung 22: Vergleich der durchschnittlichen Scores mit pN

Statistisch besteht weiterhin ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der drei addierten Scores und der Variable pN ($p = 0,019$ bis $p = 0,029$, siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Korrelation der Scores mit dem pN-Status

	Korr. koeff.	p
Intensity Score	0,306	0,218
Multiplicative Score 1	0,426	0,206
Multiplicative Score 2	0,406	0,208
Multiplicative Score 3	0,416	0,142
Additive Score 1	0,444	0,029*
Additive Score 2	0,447	0,029*
Additive Score 3	0,439	0,019*

3.9 Korrelation der Scores mit dem Tumor-Grading

Bei 18 von 43 Proben (42%) wurde der Grad der Entdifferenzierung ermittelt. Die Verteilung und der Anteil an EGFR-positiven Proben zeigt Abbildung 23.

3 Ergebnisse

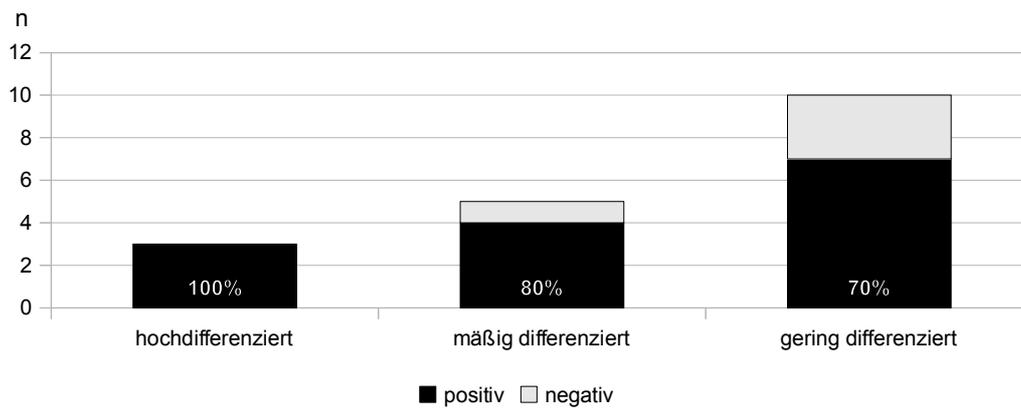


Abbildung 23: Anteil der EGFR-positiven Proben bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden

Auffällig ist, dass die mäßig differenzierten Karzinome (G2) höhere mittlere Scores haben als das Gesamtkollektiv aber auch im Vergleich zu den gering differenzierten Karzinomen (G3) (Abbildung 24).

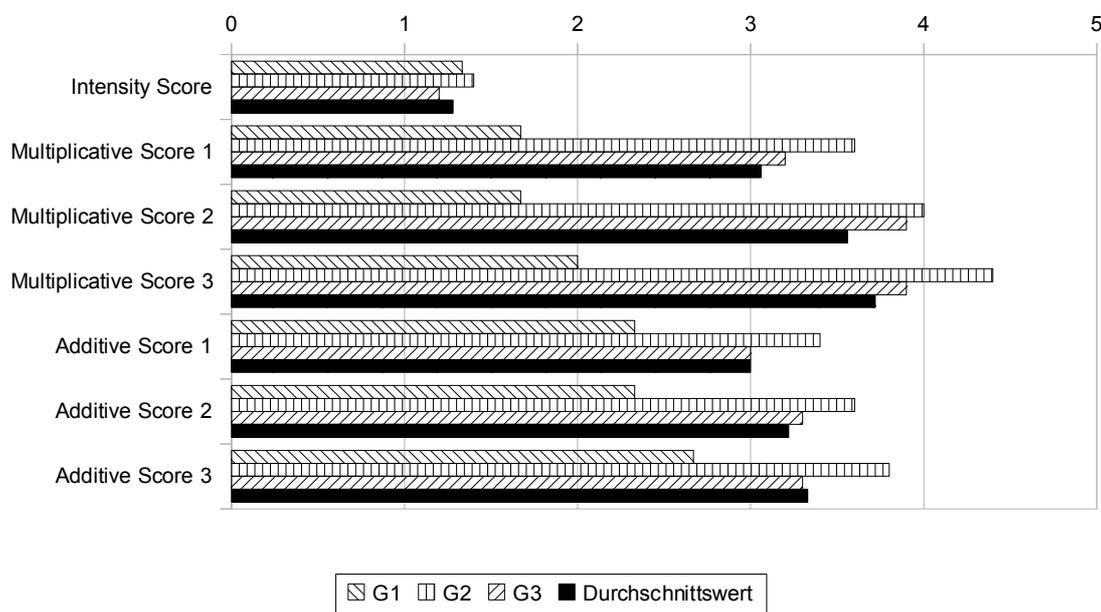


Abbildung 24: Durchschnittliche Scores im Vergleich zum Gradin

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und Höhe der Scores besteht nicht (Tabelle 18).

3 Ergebnisse

Tabelle 18: Korrelation der Scores mit dem Differenzierungsgrad

	Korr. koeff.	p
Intensity Score	-0,078	0,719
Multiplicative Score 1	0,081	0,696
Multiplicative Score 2	0,097	0,634
Multiplicative Score 3	0,061	0,763
Additive Score 1	0,063	0,761
Additive Score 2	0,079	0,697
Additive Score 3	0,070	0,730

3.10 Korrelation der Scores mit dem Tumor-Stadium

Die Verteilung der Fälle aufgeteilt nach Tumor-Stadium zeigt Abbildung 25.

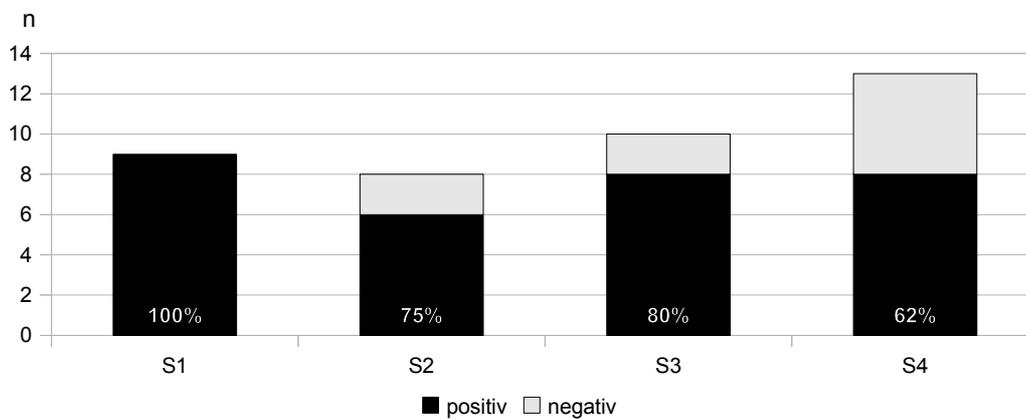


Abbildung 25: Anteil EGFR-positive Proben nach Tumor-Stadium

Abbildung 26 zeigt, dass die mittleren Scores in der Gruppe Tumorstadium 1 höher als in den anderen Gruppen sind.

3 Ergebnisse

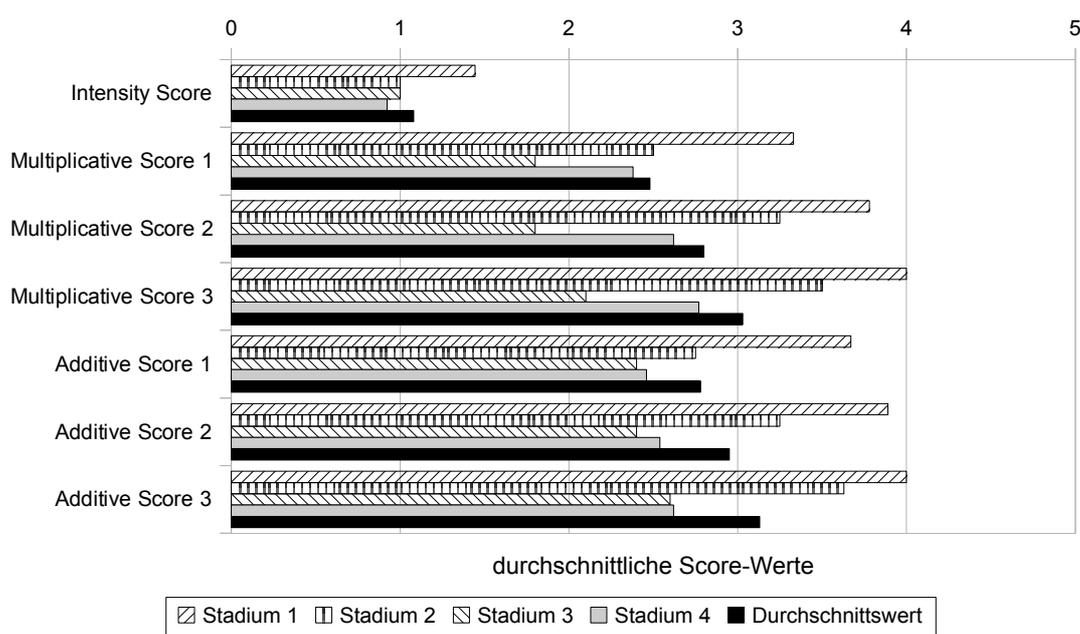


Abbildung 26: Vergleich der Scores mit den Tumor-Stadien

Der Intensity-Score korreliert tendenziell invers mit dem Tumorstadium ($p = 0,097$), ein signifikanter Zusammenhang besteht jedoch nicht (Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelation der Scores mit dem Tumorstadium

	Korr. koeff.	p
Intensity Score	-0,229	0,097
Multiplicative Score 1	-0,177	0,174
Multiplicative Score 2	-0,189	0,145
Multiplicative Score 3	-0,194	0,131
Additive Score 1	-0,194	0,139
Additive Score 2	-0,207	0,111
Additive Score 3	-0,207	0,107

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Mutation der *Kras*-Gensequenz konnte in keinem Fall nachgewiesen werden (Kapitel 3.1).

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) war bei 79% der untersuchten Malignome exprimiert. Nicht signifikante Zusammenhänge sind zwischen dem Grad der Expression und dem weiblichen Geschlecht (Kapitel 3.4), der Tumorhistologie mit einer möglicherweise stärkeren mittleren Expression bei Adenoidzysti-

3 Ergebnisse

schen Karzinomen (Kapitel 3.5) und der Tumorlokalisation mit höheren durchschnittlichen Scores bei Karzinomen der kleinen Speicheldrüsen möglich (Kapitel 3.6). Des Weiteren zeigt sich ein tendenziell signifikanter inverser Zusammenhang zwischen der Größe des Primär-Tumors pT und der Höhe der Scores (Kapitel 3.7). Der Vergleich des Grades der Entdifferenzierung (*Grading*) mit der Höhe der Scores lässt keine Schlussfolgerung auf einen Einfluss des Differenzierungsgrades auf den Score zu, da Tumoren mit mäßiger Entdifferenzierung (G2) die höchsten mittleren Scores aufweisen (Kapitel 3.9).

Signifikante Zusammenhänge konnten zwischen dem Alter und allen kombinierten Scores festgestellt werden (Kapitel 3.3 sowie Tabelle 20).

Der Vergleich der Scores mit dem Lymphknotenbefall allgemein (pN+/pN-) und auch differenzierter mit pN zeigt statistisch hochsignifikante bis signifikante Zusammenhänge (Kapitel 3.8, Tabelle 16, 17 & 20).

Das Tumor-Stadium, also die Kombination aus pT, pN und pM hat keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Scores, tendenziell korreliert das Tumor-Stadium invers mit der Färbeintensität (Kapitel 3.10 sowie Tabelle 20).

Tabelle 20: Korrelation der ordinalen Variablen mit den Scores

		pT	pN	Grading	Stadium	Alter
Intensity Score	<i>Korr. koeff.</i>	-0,213	0,306	-0,078	-0,229	0,196
	<i>p</i>	0,119	0,218	0,719	0,097	0,156
Multiplicative Score 1	<i>Korr. koeff.</i>	-0,196	0,426	0,081	-0,177	0,256
	<i>p</i>	0,127	0,206	0,696	0,174	0,049*
Multiplicative Score 2	<i>Korr. koeff.</i>	-0,200	0,406	0,097	-0,189	0,284
	<i>p</i>	0,118	0,208	0,634	0,145	0,028*
Multiplicative Score 3	<i>Korr. koeff.</i>	-0,206	0,416	0,061	-0,194	0,271
	<i>p</i>	0,104	0,142	0,763	0,131	0,034*
Additive Score 1	<i>Korr. koeff.</i>	-0,196	0,444	0,063	-0,194	0,286
	<i>p</i>	0,131	0,029*	0,761	0,139	0,029*
Additive Score 2	<i>Korr. koeff.</i>	-0,200	0,447	0,079	-0,207	0,308
	<i>p</i>	0,119	0,029*	0,697	0,111	0,017*
Additive Score 3	<i>Korr. koeff.</i>	-0,209	0,439	0,070	-0,207	0,305
	<i>p</i>	0,100	0,019*	0,730	0,107	0,018*

3 Ergebnisse

Tabelle 21: Korrelation der nicht-ordinalen Variablen

		Geschlecht		Tumorart	Lokalisation
Intensity Score	<i>Mann-Whitney-U</i>	172,000	<i>Chi-Quadrat</i>	0,080	0,600
	<i>Wilcoxon-W</i>	472,000			
	<i>p</i>	0,135	<i>p</i>	0,963	0,897
Multiplicative Score 1	<i>Mann-Whitney-U</i>	196,500	<i>Chi-Quadrat</i>	0,440	0,900
	<i>Wilcoxon-W</i>	496,500			
	<i>p</i>	0,433	<i>p</i>	0,802	0,826
Multiplicative Score 2	<i>Mann-Whitney-U</i>	196,000	<i>Chi-Quadrat</i>	0,930	0,810
	<i>Wilcoxon-W</i>	496,000			
	<i>p</i>	0,426	<i>p</i>	0,628	0,848
Multiplicative Score 3	<i>Mann-Whitney-U</i>	184,000	<i>Chi-Quadrat</i>	0,810	0,800
	<i>Wilcoxon-W</i>	484,000			
	<i>p</i>	0,276	<i>p</i>	0,668	0,849
Additive Score 1	<i>Mann-Whitney-U</i>	197,500	<i>Chi-Quadrat</i>	0,740	0,950
	<i>Wilcoxon-W</i>	497,500			
	<i>p</i>	0,443	<i>p</i>	0,692	0,813
Additive Score 2	<i>Mann-Whitney-U</i>	197,500	<i>Chi-Quadrat</i>	1,320	0,890
	<i>Wilcoxon-W</i>	497,500			
	<i>p</i>	0,448	<i>p</i>	0,517	0,829
Additive Score 3	<i>Mann-Whitney-U</i>	186,500	<i>Chi-Quadrat</i>	1,350	0,690
	<i>Wilcoxon-W</i>	486,500			
	<i>p</i>	0,304	<i>p</i>	0,510	0,876

4 Diskussion

4.1 Molekularbiologische Analyse

Ogleich Mutationen der *Kras*-Gensequenz in epithelialen Tumoren häufig sind und bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Kolons mit einem Anteil von 42,3% vertreten sind [35], waren alle Proben des vorliegenden Patientenkollektivs vom *Kras*-Wildtyp.

DAHSE et al. fanden 2009 in 98,5% der untersuchten Speicheldrüsenkarzinome ebenfalls den *Kras*-Wildtyp und lediglich in einem Fall (1,5%) eine Mutation in Codon 12 [16].

Weitere Untersuchungen zur Bedeutung von *Kras*-Mutationen sowohl allgemein bezüglich des Einflusses auf eine Wirksamkeit von Anti-EGFR-Therapeutika als auch speziell in Bezug auf deren Auftreten in Speicheldrüsenkarzinomen sollten folgen, da die Datenlage gerade im Fall der malignen Speicheldrüsenenerkrankungen nur gering ist.

Ob die mögliche Anwendung von monoklonalen Antikörpern im EGFR-Signalweg bei Speicheldrüsenkarzinomen trotz in dieser Arbeit nicht gefundener Mutationen bei *Kras* tatsächlich erfolgversprechend sein kann, muss in nötigen weiteren Untersuchungen und klinischen Studien ermittelt werden.

4.2 Immunhistochemie

Trotz vieler Herausforderungen und Unzulänglichkeiten bei immunhistochemischen Untersuchungen wie der Subjektivität und dem Vorhandensein verschiedener Scoring-Systeme haben JARAJ et al. 2009 gezeigt, dass zwischen trainierten und untrainierten Begutachtern eine beachtlich hohe Einigkeit beim Bewerten der Färbeintensität besteht [33].

Es ist allerdings inzwischen auch bekannt, dass immunhistochemische Untersuchungen aufgrund der o.g. Vielzahl vorhandener Scoring Systeme nicht ideal

sind für die EGFR-Detektion [1, 19]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nicht ein einzelner, sondern mehrere Scores einzeln und in Kombination miteinander verwendet (Vgl. Kapitel 2.2.3) [52]. Statistisch signifikante Zusammenhänge sollten somit nicht vom Design des Scoring-Systems abhängig sein. Jedoch sind durch die Vielzahl möglicher Korrelationen zwischen den verschiedenen Scores und den klinisch-pathologischen Daten vereinzelt signifikante Ergebnisse wahrscheinlicher. Es sollten somit stets die Signifikanzniveaus aller Scores betrachtet werden.

Bei der Untersuchung von Mamma-Karzinomen zeigten RÜGGE et al. 2006, dass drei verschiedene Antikörper gegen EGFR z.T. deutlich unterschiedliche Färbeverhalten aufwiesen. So dominierte zwar das membranöse Färbemuster, jedoch wurden auch intrazytoplasmatische Färbungen mit viel unspezifischem Hintergrund gefunden [63]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper (vgl. Kapitel 2.2.3.1) zeigte insgesamt ein ebenfalls sehr heterogenes Färbeverhalten, das ein intra- und interindividuell unterschiedlich sowohl membranös als auch zytoplasmatisches Signal zur Folge hatte. Es ist hervorzuheben, dass verschiedene Autoren die Verwendung von Antikörpern gegen aktivierten/phosphorylierten EGFR wie in der vorliegenden Arbeit nicht deutlich kennzeichnen. Die Phosphorylierung erfolgt in der Regel durch die Ligandenbindung mit EGF, wird aber auch in dessen Abwesenheit im Sinne einer Autophosphorylierung beobachtet, die für die proliferative und mitogene Signaltransduktion relevant sind [62, 88].

Die Verwendung von sogenannten Microarrays zur automatisierten Zählung der gefärbten Zellen brächte zwar gegebenenfalls eine höhere Verlässlichkeit hinsichtlich der quantitativen Ergebnisse [81], jedoch müssen dabei Artefakte wie sie im Randbereich oft vorkommen ausgeschlossen werden um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

4.3 Expression von EGFR

In der vorliegenden Arbeit sind 79% der Proben positiv für eine EGFR-Expression. Dies stellt eine Bestätigung der häufig beobachteten gesteigerten Expression von EGFR in epithelialen Tumoren dar. Mit 75,5% und ca. 70% berichteten DAHSE et al. 2009 und LOCATI et al. 2009 von ähnlich hohen Zahlen bei Karzinomen der Kopfspeicheldrüsen und WILLIAMS et al. fanden bei Speicheldrüsenkarzinomen eine Ausprägung von 69,8% [16, 42, 86].

MACARENCO et al. zeigten 2008, dass 91 bzw. 92% der untersuchten ACC und MEC der Lunge unabhängig vom EGFR-Mutationsstatus EGFR exprimierten [46].

4.4 Korrelationen der klinischen und pathologischen Parameter mit den Scores

Welche Schlüsse kann man aus den vorliegenden Korrelationen zwischen histopathologischen und klinischen Parametern ziehen? Zu welchen Ergebnissen haben ähnliche Untersuchungen geführt? Besonders für den Krankheitsverlauf auf konventionelle Chemotherapie nicht ansprechender Adenoidzystischer Karzinome und für oder wider einem möglichen Benefit durch eine gezielte molekulare Therapie sind diese Fragen bedeutsam.

Allerdings haben weder NANNINI et al. 2010 bei kolorektalen Adenokarzinomen noch SARKIS et al. 2010 bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx einen signifikanten Zusammenhang zwischen immunhistochemisch ermitteltem EGFR Status und klinisch-pathologischen Charakteristika (Geschlecht, Lokalisation, Grading, Staging) feststellen können [52, 65].

In dieser Arbeit konnten indessen statistisch hochsignifikante Unterschiede mit $p = 0,001$ zwischen den Untersuchungsgruppen hinsichtlich Lymphknotenbefall sowie signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen hinsichtlich Alter und pN-Status jeweils zur Expression von EGFR gezeigt werden. Die ne-

gative prognostische Relevanz einer lymphogenen Metastasierung ist in Kapitel 1.1.5 erläutert.

Die beschriebene tendenzielle Signifikanz einer inversen Korrelation zwischen der TumorgroÙe pT und zwei der kombinierten Scores (vgl. Kapitel 2.2.4.2 und Kapitel 3.7) deckt sich ebenfalls nicht mit den Ergebnissen anderer Autoren, bei denen die klinisch-pathologischen Daten nicht in Korrelation zur Expression von EGFR stehen [23 , 42, 52, 65]. Die bei den beiden betroffenen Scores verstärkte Differenzierung des quantitativen Färbeergebnisses könnte diesen Zusammenhang erklären, da „Positivity Score 3“ (Vgl. Kapitel 2.2.4.2), der in dem mit $p = 0,100$ tendenziell signifikante Score als Summand eingeht und somit auch die prozentual geringer gefärbten Präparate differenzierter erfasst. Wie jedoch in Abbildung 17 sowie Tabelle 15 dargestellt, sind die Werte bei kleineren pT1-Tumoren auch bei den übrigen Scores und insbesondere bzgl. der Färbeintensität im Mittel höher als bei größeren Tumoren. Die bei immunhistochemischen Färbungen mitunter auftretenden Artefakte im Randbereich und die damit verbundene schwierigere Interpretation könnte den inversen Zusammenhang zusätzlich beeinflusst haben.

Die in der vorliegenden Untersuchung gezeigte Zunahme der Expression von EGFR mit steigendem Alter deckt sich mit Untersuchungen von Kim et al. 2008, die einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Alter und EGFR-Status bei Magenkarzinomen fanden [36].

Die Ergebnisse hinsichtlich EGFR-Expression und Tumor-Grading (vgl. Kapitel 3.9) sind aufgrund der unterschiedlichen Tumorentitäten/Histologien, der damit verbundenen unterschiedlichen Einteilungen der jeweiligen Differenzierungsgrade und der kleinen untersuchten Gruppen nur bedingt aussagekräftig. Bei der Betrachtung der verschiedenen Grading-Kategorien beurteilten Seethala et al. 2009 die bestehenden Einteilungen gerade bei mukoepidermoiden Karzinomen aber auch insgesamt als mitunter beschwerlich und umständlich, obwohl gerade der Differenzierungsgrad ein signifikanter Prädiktor für den weiteren Krankheitsverlauf sei. Vor allem jedoch „demonstrierte die Gruppe der mäßig differenzierten Karzinome die höchste Variabilität zwischen den verschiedenen Einteil-

lungen“ [68]. Auch in der vorliegenden Untersuchung ist diese Gruppe der mäßig differenzierten Tumore sehr heterogen und durch geringfügig höhere mittlere Scores gegenüber den gering und hoch differenzierten Karzinomen gekennzeichnet.

Dass EGFR-Antikörper verschiedener Herstellerfirmen unterschiedliche Ergebnisse bzgl. des Färbeverhaltens zum Vorschein bringen können, zeigten RÜGGE et al. 2006. Sie fanden weiterhin bei der Untersuchung von Mamma-Karzinomen eine vom Antikörper abhängige Korrelation zwischen EGFR-Expression und pN-Status sowie EGFR und Tumorgrading. So waren einerseits hochsignifikante Korrelationen ($p < 0,0001$) zwischen Expression und Grading festzustellen während die Untersuchungen mit zwei weiteren Antikörpern schlechtere Signifikanzniveaus aufwiesen ($p < 0,01$ und $p < 0,04$) [63].

In der hier durchgeführten Untersuchung konnte der Zusammenhang zwischen pN-Status und Expression festgestellt werden. Eine signifikante Korrelation zwischen Grading und EGFR-Status besteht nicht; jedoch wiesen mäßig differenzierte Tumoren gegenüber den hoch- aber interessanterweise auch gegenüber den gering differenzierten Tumoren jeweils höhere Score-Werte auf. Dies könnte in der geringen Größe des Kollektivs begründet sein, aber auch mit der Heterogenität bzgl. der Tumor-Histologien zusammenhängen.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Unabhängigkeit des Expressionsmusters vom histopathologischen Tumortyp bestätigt die Ergebnisse von DAHSE et al., die zeigten, dass einerseits eine Überexpression von EGFR und der *Kras*-Wildtyp häufig sind und der histologische Tumortyp keinen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors darstellt [16].

ETTL et al. zeigten 2008 bei einer Untersuchung von Speicheldrüsentumoren, dass das Expressionsmuster von EGFR einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor darstellt, fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Daten und EGFR-Expression [23]. Wie in Kapitel 3.8 beschrieben, konnte in der vorliegenden Untersuchung signifikante Korrelation

zwischen EGFR-Expression und pN-Status festgestellt werden, der einen negativ prognostischen Faktor entspricht.

Ernüchternd sind die Ergebnisse zum therapeutischen Erfolg von Cetuximab als monoklonaler Antikörper gegen EGFR von LOCATI et al. Sie deuten darauf hin, dass unabhängig von einer Überexpression von EGFR eine objektiv messbare Wirksamkeit einer Anti-EGFR-Therapie bei Speicheldrüsenkarzinomen nicht zu erwarten sei. Gründe dafür sehen die Autoren vor allem in der Patientenauswahl in Hinblick auf die Progression, da Patienten mit langsamerem Krankheitsverlauf in der Untersuchung überrepräsentiert waren und der Beobachtungszeitraum mit nur sechs Monaten ggf. zu kurz war [42]. Gerade aber für Patienten, bei denen das Tumorwachstum rasch voranschreitet und die nicht oder nur ungenügend auf eine konventionelle Radio-Chemo-Therapie ansprechen wie oft bei Adenoidzystischen Karzinomen zu beobachten, wäre eine gezielte molekulare Chemotherapie mit einem möglicherweise lebensverlängerndem Effekt verbunden. Da wie in Kapitel 1.1.1 erläutert, die Fallzahlen sowohl relativ als auch absolut von Karzinomen der Kopfspeicheldrüsen sehr gering sind, wären multizentrische länger andauernde Studien sinnvoll um einen Effekt tatsächlich ausschließen oder belegen zu können.

Mögliche weitere signifikante Ergebnisse sollten nicht ausgeschlossen werden, da in einzelnen Gruppen z.T. nur geringe Fallzahlen vorhanden waren und verlässlichere Ergebnisse erst bei einem größeren Patientenkollektiv erzielt werden können.

5 Ausblick

Da verschiedene Autoren eine positive Wirkung von Anti-EGFR-Therapeutika bei der Behandlung anderer Tumorentitäten vor allem bei Patienten ohne Mutation im *Kras*-Gen beobachtet haben, scheint eine Therapie auch von Karzinomen der Kopfspeicheldrüsen möglich, falls weitere Untersuchungen bestätigen, dass Mutationen der *Kras*-Gensequenz nicht oder nur äußerst selten vorkommen. Im gegenteiligen Fall wäre eine routinemäßige Mutationsanalyse vor einem molekulartherapeutischen Eingreifen, wie sie bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen durchgeführt wird, denkbar.

Bei lymphogen metastasierten Karzinomen der Kopfspeicheldrüsen könnte der pharmazeutische Angriff an den EGF-Rezeptor möglicherweise zu besseren Resultaten führen als bei Tumoren mit negativem Lymphknotenbefall, da erstere wie hier gezeigt signifikant häufiger EGFR exprimieren und damit eine Wirkung wahrscheinlicher wäre.

Gegen einen therapeutischen Effekt von Anti-EGFR Medikamenten bei Speicheldrüsenkarzinomen sprechen dagegen die Ergebnisse von LOCATI et al. Ob der Expressionsstatus diesbezüglich eine Relevanz aufweist wird von LOCATI et al. verneint, bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten [42, 43].

Problematisch hierbei ist die Tatsache, dass das Vorkommen von Karzinomen der Speicheldrüsen im Vergleich etwa zu kolorektalen Karzinomen verhältnismäßig selten ist und die für signifikante Ergebnisse benötigten hohen Fallzahlen zumeist fehlen.

Für eine Immunhistochemische und/oder molekularbiologische Therapievorhersage für Speicheldrüsenkarzinome bedarf es noch weiterer Untersuchungen sowohl hinsichtlich möglichst verlässlicher standardisierter Verfahren als auch der klinischen Anwendbarkeit von Anti-EGFR-Therapeutika bei Speicheldrüsentumoren generell.

6 Literatur

1. Abd El All, H.S., A.M. Mishriky, and F.A. Mohamed, *Epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma: correlation with clinico-pathological prognostic factors*. *Colorectal Dis*, 2008. 10(2): p. 170-8.
2. Airoidi, M., et al., *Phase II randomized trial comparing vinorelbine versus vinorelbine plus cisplatin in patients with recurrent salivary gland malignancies*. *Cancer*, 2001. 91(3): p. 541-7.
3. Anderson, J.N., Jr., et al., *Prognostic factors in minor salivary gland cancer*. *Head Neck*, 1995. 17(6): p. 480-6.
4. Auclair, P.L., R.K. Goode, and G.L. Ellis, *Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases*. *Cancer*, 1992. 69(8): p. 2021-30.
5. Batsakis, J.G., M.A. Luna, and A. el-Naggar, *Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: III. Adenoid cystic carcinomas*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1990. 99(12): p. 1007-9.
6. Benvenuti, S., et al., *Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies*. *Cancer Res*, 2007. 67(6): p. 2643-8.
7. Böcker, W., *Pathologie*. 2008, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
8. Bradley, P.J., *Distant metastases from salivary glands cancer*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2001. 63(4): p. 233-42.
9. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. *Mol Cell*, 2003. 12(3): p. 541-52.
10. Calvo, F., L. Agudo-Ibanez, and P. Crespo, *The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies*. *Bioessays*, 2010. 32(5): p. 412-21.
11. Chen, A.M., et al., *Base of skull recurrences after treatment of salivary gland cancer with perineural invasion reduced by postoperative radiotherapy*. *Clin Otolaryngol*, 2009. 34(6): p. 539-45.
12. Chen, A.M., et al., *Local-regional recurrence after surgery without post-operative irradiation for carcinomas of the major salivary glands: implications for adjuvant therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. 67(4): p. 982-7.

13. Chung, K.Y., et al., *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry*. J Clin Oncol, 2005. 23(9): p. 1803-10.
14. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. 358(11): p. 1160-74.
15. Ciccolallo, L., et al., *Survival from salivary glands adenoid cystic carcinoma in European populations*. Oral Oncol, 2008.
16. Dahse, R., et al., *KRAS status and epidermal growth factor receptor expression as determinants for anti-EGFR therapies in salivary gland carcinomas*. Oral Oncol, 2009.
17. Dahse, R. and H. Kosmehl, *Detection of drug-sensitizing EGFR exon 19 deletion mutations in salivary gland carcinoma*. Br J Cancer, 2008. 99(1): p. 90-2.
18. de Castro-Carpeno, J., et al., *EGFR and colon cancer: a clinical view*. Clin Transl Oncol, 2008. 10(1): p. 6-13.
19. Dei Tos, A.P., *The biology of epidermal growth factor receptor and its value as a prognostic/predictive factor*. Int J Biol Markers, 2007. 22(1 Suppl 4): p. S3-9.
20. Elkin, A. and C. Jacobs, *Tamoxifen for salivary gland adenoid cystic carcinoma: report of two cases*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. 134(10): p. 1151-3.
21. Endoh, H., et al., *Immunohistochemical analysis of phosphorylated epidermal growth factor receptor might provide a surrogate marker of EGFR mutation*. Lung Cancer, 2009. 63(2): p. 241-6.
22. Erovic, B.M., et al., *Multimodal treatment of patients with minor salivary gland cancer in the case of recurrent disease*. Head Neck, 2010.
23. Ettl, T., et al., *Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas*. Histopathology, 2008. 53(5): p. 567-77.
24. Gallegos Ruiz, M.I., et al., *EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens*. Cell Oncol, 2007. 29(3): p. 257-64.
25. Gattenlohner, S., C. Germer, and H.K. Muller-Hermelink, *K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. 360(8): p. 835; author reply 835-6.

26. Goldstein, N.S. and M. Armin, *Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system*. *Cancer*, 2001. 92(5): p. 1331-46.
27. Heinemann, V., et al., *Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR*. *Cancer Treat Rev*, 2009. 35(3): p. 262-71.
28. Horch, H.-H., *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 2007, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
29. Hunter, T., *Signaling--2000 and beyond*. *Cell*, 2000. 100(1): p. 113-27.
30. Hurwitz, H.I., et al., *The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer*. *Oncologist*, 2009. 14(1): p. 22-8.
31. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(5): p. 341-54.
32. Iyer, N.G., et al., *Factors predicting outcome in malignant minor salivary gland tumors of the oropharynx*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010. 136(12): p. 1240-7.
33. Jaraj, S.J., et al., *Intra- and interobserver reproducibility of interpretation of immunohistochemical stains of prostate cancer*. *Virchows Arch*, 2009. 455(4): p. 375-81.
34. Jonker, D.J., et al., *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2007. 357(20): p. 2040-8.
35. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2008. 359(17): p. 1757-65.
36. Kim, M.A., et al., *EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number*. *Histopathology*, 2008. 52(6): p. 738-46.
37. Laurie, S.A. and A. Argiris, *Chemotherapy in the Management of Malignant Tumors of Salivary Gland Origin*, in *Salivary Gland Disorders*. 2007, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 477-494.
38. Laurie, S.A. and L. Licitra, *Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers*. *J Clin Oncol*, 2006. 24(17): p. 2673-8.
39. Le, Q.T., et al., *Postoperative irradiation of minor salivary gland malignancies of the head and neck*. *Radiother Oncol*, 1999. 52(2): p. 165-71.

40. Li, S., et al., *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. *Cancer Cell*, 2005. 7(4): p. 301-11.
41. Linardou, H., et al., *Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. 6(6): p. 352-66.
42. Locati, L.D., et al., *Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: A phase II study*. *Oral Oncol*, 2009. 45(7): p. 574-8.
43. Locati, L.D., et al., *Treatment relevant target immunophenotyping of 139 salivary gland carcinomas (SGCs)*. *Oral Oncol*, 2009. 45(11): p. 986-90.
44. Löning, T., *Speicheldrüsentumoren—Tumortypisierung und Grading*, K.T. Jäkel, Editor. 2003: Der Pathologe.
45. Löning, T. and K.T. Jakel, *[Salivary gland tumors--tumor typing and grading]*. *Pathologe*, 2004. 25(1): p. 38-45.
46. Macarenco, R.S., et al., *Salivary gland-type lung carcinomas: an EGFR immunohistochemical, molecular genetic, and mutational analysis study*. *Mod Pathol*, 2008. 21(9): p. 1168-75.
47. Masui, H., et al., *Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies*. *Cancer Res*, 1984. 44(3): p. 1002-7.
48. Matsuba, H.M., et al., *Adenoid cystic salivary gland carcinoma: a clinico-pathologic correlation*. *Head Neck Surg*, 1986. 8(3): p. 200-4.
49. Mendelsohn, J., *The molecular basis of cancer*. 2008, Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier.
50. Messersmith, W.A. and D.J. Ahnen, *Targeting EGFR in colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2008. 359(17): p. 1834-6.
51. Moroni, M., et al., *Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study*. *Lancet Oncol*, 2005. 6(5): p. 279-86.
52. Nannini, M., et al., *Molecular detection of epidermal growth factor receptor (EGFr) in colorectal cancer: does it still make sense?* *Colorectal Dis*, 2010.
53. Normanno, N., et al., *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. 10(1): p. 1-21.
54. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. *Mol Syst Biol*, 2005. 1: p. 2005 0010.

55. Parsons, J.T., et al., *Management of minor salivary gland carcinomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. 35(3): p. 443-54.
56. Peel, R.L. and R.R. Seethala, *Pathology of Salivary Gland Disease*, in *Salivary Gland Disorders*, S.B. Heidelberg, Editor. 2007, Springer: Berlin, Heidelberg.
57. Piazzzi, G., et al., *Molecular determination of epidermal growth factor receptor in normal and neoplastic colorectal mucosa*. Br J Cancer, 2006. 95(11): p. 1525-8.
58. Pires, F.R., et al., *Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. 130(2): p. 174-80.
59. Qing, J., et al., *[Prognostic analysis of adenoid cystic carcinoma of major salivary glands of 64 cases]*. Ai Zheng, 2006. 25(9): p. 1138-43.
60. Ramos, F.J., et al., *Understanding the predictive role of K-ras for epidermal growth factor receptor-targeted therapies in colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2008. 7 Suppl 2: p. S52-7.
61. Reiß, M., *Facharztwissen HNO-Heilkunde*. 2009, Heidelberg: Springer.
62. Reynolds, A.R., et al., *EGFR activation coupled to inhibition of tyrosine phosphatases causes lateral signal propagation*. Nat Cell Biol, 2003. 5(5): p. 447-53.
63. Rügge, A.-B., *Möglichkeiten und methodische Grenzen immunhistochemischer Methoden zur Therapieprädiktion des invasiven Mammakarzinoms am Beispiel des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR)*. 2006, Münster.
64. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. 19(3): p. 183-232.
65. Sarkis, S.A., et al., *Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis*. Head Neck Oncol, 2010. 2: p. 13.
66. Sartori, G., et al., *EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors*. Am J Clin Pathol, 2009. 131(4): p. 478-89.
67. Schlessinger, J., *Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor*. Cell, 2002. 110(6): p. 669-72.

68. Seethala, R.R., *An update on grading of salivary gland carcinomas*. Head Neck Pathol, 2009. 3(1): p. 69-77.
69. Sequeiros Santiago, G., et al., [*Prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of salivary glands*]. Acta Otorrinolaringol Esp, 2005. 56(8): p. 361-7.
70. Shah, J.P. and J.K. Ihde, *Salivary gland tumors*. Curr Probl Surg, 1990. 27(12): p. 775-883.
71. Shields, J.M., et al., *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'*. Trends Cell Biol, 2000. 10(4): p. 147-54.
72. Smith, A., et al., *Mucoepidermoid carcinoma arising in an intraparotid lymph node*. Cancer, 1985. 55(2): p. 400-3.
73. Spiro, R.H., et al., *Tumors of minor salivary origin. A clinicopathologic study of 492 cases*. Cancer, 1973. 31(1): p. 117-29.
74. Spiro, R.H., et al., *The importance of clinical staging of minor salivary gland carcinoma*. Am J Surg, 1991. 162(4): p. 330-6.
75. Stintzing, S., et al., *The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status*. Dtsch Arztebl Int, 2009. 106(12): p. 202-6.
76. Strutz, J., *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. 2010, Stuttgart [u.a.]: Thieme.
77. Tawbi, H., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and mutational analysis in synovial sarcomas and malignant peripheral nerve sheath tumors*. Oncologist, 2008. 13(4): p. 459-66.
78. Tsuchihashi, Z., et al., *Responsiveness to cetuximab without mutations in EGFR*. N Engl J Med, 2005. 353(2): p. 208-9.
79. Umeda, M., et al., *The role of radiotherapy for patients with adenoid cystic carcinoma of the salivary gland*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. 89(6): p. 724-9.
80. Vander Poorten, V.L., et al., *Stage as major long term outcome predictor in minor salivary gland carcinoma*. Cancer, 2000. 89(6): p. 1195-204.
81. Walker, R.A., *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I*. Histopathology, 2006. 49(4): p. 406-10.
82. Weber, G.F., *Molecular mechanisms of cancer*. 2007, Dordrecht: Springer.

83. Weinberg, R.A., *The biology of cancer*. 2007, New York, NY [u.a.]: Garland Science.
84. Wild, R., et al., *Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) is not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels*. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(1): p. 104-13.
85. Wiley, H.S., S.Y. Shvartsman, and D.A. Lauffenburger, *Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology*. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(1): p. 43-50.
86. Williams, M.D., et al., *Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: empirical and therapeutic significance*. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(8): p. 2266-74.
87. Wittekind, C., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 2010, Weinheim: Wiley-Blackwell.
88. Yarden, Y. and J. Schlessinger, *Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation*. *Biochemistry*, 1987. 26(5): p. 1434-42.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Urs Müller-Richter bedanken, der mich von Beginn der Arbeit an bis zuletzt stets zeitnah und fachlich kompetent unterstützte. Vielen Dank für Ihr herausragendes Engagement.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Annette Strehl, die mich bei allen Fragestellungen die Pathologie und Methodik betreffend tatkräftig unterstützte. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg, insbesondere denen der Abteilungen für Immunhistochemie und Molekularpathologie, die mich mit großer Geduld und methodischer Hilfestellung unterstützten, gilt mein Dank.

Professor Dr. Andreas Rosenwald, Vorstand des Pathologischen Instituts, und seinem Vorgänger Professor Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit, im Rahmen dieser Promotionsarbeit im Pathologischen Institut arbeiten zu dürfen. Überdies möchte ich Herrn Professor Rosenwald für die Übernahme des Korreferats herzlich danken.

LEBENS LAUF

TIM SCHNEIDER

Zahnarzt

Persönliche Daten

E-Mail: tim.f.schneider@gmail.com

Geburtsdatum und -ort: 23. September 1983 in Hessisch Lichtenau
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule und Studium

seit Oktober 2009	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Studium der Humanmedizin
Juli 2009 - Oktober 2009	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Promotionsstudium
April 2004 - Juni 2009	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Studium der Zahnheilkunde
Juli 2003 - März 2004	Grundwehrdienst 2.PzArtBtl/2, Hessisch Lichtenau
September 1994 - Juni 2003	Freiherr-vom-Stein-Schule, Hessisch Lichtenau
September 1990 - Juli 1994	Grundschule Eschenwaldschule, Eschenstruth