

Aus dem Institut für Anatomie II
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Glykostrukturen als prognostische Marker beim adenoid zystischen Karzinom der Speicheldrüsen

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Janina Teegen
aus Hamburg

Hamburg, 2008

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
Der Universität Hamburg am: 06.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Vorsitzender: Prof. U. Schumacher

1. Gutachter: Prof. U. Mangold

2. Gutachter: Prof. T. Löning

Inhaltsverzeichnis:

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	8
2. Einleitung	7
2.1. Das adenoid zystische Karzinom.....	7
2.1.1. Ätiologie und Epidemiologie.....	7
2.1.2. Histologische Unterteilung	7
2.1.3. Prognose	8
2.1.4. Therapieoptionen	8
2.2. Die Metastasierungskaskade.....	10
2.3. Aufbau und Funktion der Zellmembran	11
2.4. Charakterisierung der Zuckerreste von Membranglykoproteinen durch Lektine.....	12
2.5. Bedeutung der Glykosylierung von Membranproteinen für die Metastasierung	13
2.5.1. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1	13
2.5.2. Das Zelladhäsionsmolekül L1	14
2.5.3. Die Zelladhäsionsmoleküle P- und E-Selektin	15
2.5.4. Das Adhäsionsmolekül CD44	15
2.5.5. Das Urgebrachyury.....	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1. Histologisches Untersuchungsgut	17
3.2. Patientencharakteristika	17
3.3. Anfertigung von Paraffinschnitten	18
3.4. Lektin histochemie.....	18
3.4.1. Indirekte Methode	19
3.4.2. Zuckerhemmung.....	20

3.5. Immunhistochemie	21
3.5.1. Darstellen des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1.....	21
3.5.2. Darstellen des Zelladhäsionsmoleküls L1.....	22
3.5.3. Darstellen der Zelladhäsionsmoleküle P-und E-Selektin	22
3.5.4. Darstellen des Zelladhäsionsmoleküles CD44.....	23
3.5.5. Darstellen des Urgens Brachyury	23
3.6. Histologische Auswertung	24
3.6.1. Lektin- und Immunhistochemie	24
3.7. Statistische Auswertungen	25
3.7.1. Univariate Analyse.....	25
3.7.2. Korrelation der gefundenen Marker	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Subtypen des ACC.....	26
4.1.1. Prognostische Wertigkeit der histologischen Subtypen	27
4.2. Pseudozysten des cribriformen Subtyps	29
4.2.1. Auftreten von Pseudozysten im cribriformen Subtyp	30
4.2.2. Lektinhistochemische Auswertungen.....	32
4.2.2.1. HPA	32
4.2.2.2. GNA	33
4.2.3. Immunhistochemische Auswertungen	33
4.2.3.1. CEACAM1.....	33
4.2.3.2. Brachyury.....	36
4.3. Lektinhistochemische Auswertungen	36
4.3.1. HPA	36
4.3.2. PHA-L	38
4.3.3. DBA	38
4.3.4. GNA.....	38
4.3.5. SNA-I	39

4.3.6. MAA.....	39
4.4. Immunhistochemische Auswertungen.....	40
4.4.1. CD44.....	40
4.4.2. E-Selektinbindungsstellen.....	41
4.4.3. P-Selektinbindungsstellen.....	41
4.4.4. CEACAM1	41
4.4.5. L1	44
4.4.6. Brachyury.....	45
4.5. Korrelation der gefundenen Marker	46
5. Diskussion	47
5.1. Prognostische und funktionelle Relevanz von Glykokonjugaten.....	47
5.2. Pseudozysten.....	48
5.3. Das Zelladhäsionsmolekül L1	49
6. Zusammenfassung.....	53
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Danksagung	69
9. Lebenslauf.....	70
10. Erklärung	71

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ACC	Adenoid zystisches Karzinom
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft
bHPA	Methode mit biotinyliertem HPA
CAM	Cell adhesion molecule
CD44	Cluster designation molecule 44
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ECM	Extrazelluläre Matrix
Gal	Galaktose
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin
GalNAc	N-Azetylgalaktosamin
GlucNAc	N-Azetylglukosamin
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA	<i>Helix pomatia</i> Agglutinin
iHPA Methode	Indirekte HPA-Methode
MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

LP	Lektinpuffer
PBS	Phosphatpuffer
pH	pH-Wert; potentia hydrogenii
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leukoagglutinin
SCR	Short Consensus repeat
Siglec	Sialinsäurebindendes Lektin
SNA-I	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin I
TBS	Trispuffer
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer (klinische Stadieneinteilung)

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das adenoid zystische Karzinom ist ein schwer zu therapierender Tumor der großen Speicheldrüsen, da er zu multiplen Rezidiven und zur Metastatisierung neigt und es bisher keine überzeugenden kurativen Behandlungsansätze gibt. Außer der histopathologischen Einteilung in drei Subtypen gibt es für das Adenoid zystische Karzinom derzeit keine prognostischen Indikatoren. Die Unterteilung in histologische Subtypen gibt keinerlei Hinweise über die möglichen Mechanismen der Metastasierung bei diesem Tumor. Daher ist es zunächst notwendig, die der Metastasierung zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um auf diesen Grundlagen innovative und rationale Therapieansätze erarbeiten zu können.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, den invasiv rezidivierenden und den metastatischen Phänotyp der adenoid zystischen Karzinome näher zu charakterisieren und Indikatoren für eine Metastasierung zu ermitteln.

Es soll daher untersucht werden:

- Ob die Bindung verschiedener Lektine an Zellen der Primärtumore von adenoid zystischen Karzinomen prognostisch relevant ist und somit das Kohlenhydratprofil des invasiv-rezidivierenden und des metastatischen Phänotyps des adenoid zystischen Karzinoms charakterisiert werden kann.
- Welche Methoden der Lektin- und Selektinhistochemie am besten geeignet sind, das Kohlenhydratprofil der Tumorzellen zu charakterisieren.
- Ob die Expression von CEACAM1, L1, CD44, P- und E-Selektinbindungsstellen einen Zusammenhang mit einer Rezidivbildung oder einer Metastasierung aufweist.
- Ob das gefundene Kohlenhydratprofil Glykotope auf den Zelladhäsionsmolekülen CEACAM1, L1 und CD44 zugeordnet werden kann.
- Wie hoch die prognostische Wertigkeit der gefundenen Glykokonjugate im Vergleich zu der Einteilung in histologische Subtypen ist.

2 Einleitung

2.1. Das adenoid zystische Karzinom

2.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Das adenoid zystische Karzinom ist ein bösartiger Tumor, der von proliferierenden Epithelzellen und Myoepithelzellen der großen Kopfspeicheldrüsen ausgeht und die langsam perineural entlang der Nervfasern wachsen. Billroth beschrieb diesen Tumortyp erstmals 1856 und benannte es nach seinem histologischen Erscheinungsbild: Klindroma, welches die alte Bezeichnung für diesen Tumor war (Chen et al; 2006).

Zehn Prozent der malignen Tumoren der Glandula parotis und der submandibulären Speicheldrüsen sind adenoid zystische Karzinome. Somit ist das Auftreten des adenoid zystischen Karzinoms der Speicheldrüsen eine der häufigsten malignen Erkrankungen der großen Speicheldrüsen (Chen et al., 2006; Triantafillidou et al., 2006; Teymoortash et al., 2006). Am häufigsten tritt das adenoid zystische Karzinom in den kleineren Kopfspeicheldrüsen (Glandula submandibularis, sublingualis) (31%) auf, wobei 14%, bezogen auf den Befall maligner Tumore der großen Speicheldrüsen, auf die submandibulären Speicheldrüsen entfallen. In der Glandula parotis ist es nur in 2% der Fälle zu finden (Triantafillidou et al., 2006).

Der Altersgipfel für das Auftreten eines adenoid zystischen Karzinoms ist das fünfte und sechste Lebensjahrzehnt. Frauen sind 1,5-fach häufiger betroffen als Männer. (Triantafillidou et al., 2006). Unter allen malignen Kopf- und Halstumoren sind jedoch lediglich 2-4% adenoid zystische Karzinome der großen Speicheldrüsen.

2.1.2. Histologische Unterteilung

Histologisch wird das adenoid zystische Karzinom der großen Speicheldrüsen in drei Subtypen unterteilt: solid, cribriform und tubulär. Alle drei Subtypen können auch nebeneinander in einem Tumor vorkommen.

Eine Besonderheit des cribriformen Subtyps ist die Ausbildung von Pseudozysten (Toida et al., 1985; Gustafsson et al., 1986), welche durch inselartig angeordnete neoplastische Epithelzellen entstehen. Die zystisch aussehenden Räume sind keine echten Lumina der Ausführungsgänge, sie werden von Tumorzellen umgeben (Ellis et al., 1996).

Während in den cribriformen und tubulären Tumorarealen sehr selten mitotische Zellkerne vorkommen, weisen solide Subtypen eine hohe Mitoserate auf. Nekrosen treten ebenfalls meist nur bei soliden Tumoren auf (Nakashima et al., 2006).

2.1.3. Prognose

Im Vergleich zu anderen Karzinomen mit sehr schlechten Überlebensraten weist das adenoid zystische Karzinom eine gute Überlebensrate während der ersten fünf Jahre auf. Hingegen ist die Überlebensrate nach fünfzehn bis zwanzig Jahren (21% bzw. 9%) ausgesprochen schlecht (Friedrich et al., 2003). Die tubuläre und die cribriforme Wachstumsform haben eine bessere Prognose als die solide Wachstumsform des adenoid zystischen Karzinoms. Die tubuläre Wachstumsform weist die beste Prognose auf (Brackrock et al., 2005), wohingegen die solide Wachstumsform die ungünstigste Prognose aufweist, da die frühe Metastasierung eine schlechte fünf Jahresüberlebensrate bedingt (Darling et al., 2002).

Desweiteren weisen adenoid zystische Karzinome eine sehr hohe Rezidivrate (51%) auf (Brackrock et al., 2005), wobei Rezidive auch noch Jahre nach dem Tumorbefall und erfolgter operativer Tumorentfernung mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) (Chen et al., 2006) vorkommen. Daher wird eine lebenslange engmaschige Kontrolle der Patienten empfohlen (Sequeiros Santiago et al., 2005). Ein metastasieren in regionale Lymphknoten tritt bei adenoid zystischen Karzinomen weniger häufig als bei anderen Karzinomen auf. Lungenmetastasen treten bei rund 50% der erkrankten Patienten auf, besonders wenn der Primärtumor unzureichend behandelt worden war (Triantafillidou et al., 2006).

2.1.3. Therapieoptionen

Die Behandlung des adenoid zystischen Karzinoms der Speicheldrüsen ist seit Jahren umstritten. Einigung herrscht darüber, dass bei operablem Tumor eine chirurgische Tumorentfernung die Therapie der Wahl ist (Friedrich et al., 2003; Triantafillidou et al., 2006). Hierbei ist von prognostischer Bedeutung, ob der Tumor komplett entfernt werden konnte (R0), oder aufgrund eines perineuralen Wachstums des Tumors, Tumorreste nicht entfernt werden konnten, um zum Beispiel ummauerte Nerven zu erhalten (R1). Patienten mit R1 Resektion haben eine deutlich schlechtere Prognose und erleiden häufiger Rezidive und Metastasen.

Der Nutzen der postoperative Radiotherapie ist hingegen sehr wenig belegt. So rät die Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft (AWMF) in ihren Leitlinien zu einer postoperativen Radiotherapie bei adenoid zystischen Karzinomen, wenn perineurale Tumorinvasion/-ausbreitung, und/oder inkomplette oder knapp im Gesunden durchgeführte Resektionen vorliegen. Desweiteren ist jedoch die genaue Indikation zu einer Strahlentherapie umstritten. Einige Autoren plädieren für die

Bestrahlung aller Patienten mit adenoid zystischen Karzinomen nach Resektion (Chen et al., 2006; Triantafillidou et al., 2006; Brackrock et al., 2005; Gurney et al., 2005), andere hingegen sehen diese Therapie nur für Patienten mit adenoid zystischen Karzinomen vor, deren Resektionsränder nicht tumorfrei waren, oder deren Tumor perineural invadierte (Umeda et al., 2000; Fordice et al., 1999; Prokopakis et al., 1999). Wiederum andere sehen diese Therapie als nicht erfolgsversprechend an (Kokemueller et al., 2004) und plädieren für radikale chirurgische Eingriffe im fortgeschrittenen Stadium und keinerlei Bestrahlung oder Chemotherapie (Khafif et al., 2005). Auch die Bestrahlungsform wird unterschiedlich diskutiert. So variiert sowohl die Dosis von 20 Gy (Brackrock et al.; 2005) bis 60 Gy (Chen et al., 2006; Triantafillidou et al., 2006), als auch die Bestrahlungsart, Photonen oder Neutronen. Neutronen werden bevorzugt, da sie eine geringere Streubreite besitzen und somit die Toxizität für das umgebene Gewebe herabgesetzt werden kann (Douglas et al., 2000). Da aber in der Strahlentherapie die meisten Tumoren mit Photonen bestrahlt werden und Neutronenbestrahlungsgeräte weltweit sehr selten vorhanden sind (Brackrock et al.; 2005; Huber et al., 2001) werden Bestrahlungen meist mit Photonen vorgenommen (Chen et al., 2006; Brackrock et al., 2005), obwohl die Neutronenbestrahlung die besseren Ergebnisse erzielt (Brackrock et al., 2005; Huber et al., 2001; Douglas et al., 2000). Eine standardisierte Chemotherapie gibt es für das adenoid zystische Karzinom nicht.

Insgesamt weist lediglich die Unterteilung des adenoid zystischen Karzinoms in die drei histologischen Subtypen ungefähre prognostische Anhaltspunkte auf (Brackrock et al., 2005; Nakashima et al., 2006). Bis jetzt existieren keinerlei prognostische Marker, welche die Aggressivität des Tumors unabhängig vom histologischen Subtypen aufzeigt. Somit besteht zurzeit keine Möglichkeit eine individuelle Therapie aufgrund tumorbiologischer Kriterien festzulegen.

Daraus ergibt sich die Dringlichkeit, neue prognostische Marker zu finden, die unabhängig vom histologischen Subtyp, die Tumoraktivität (Rezidivneigung, Metastasierungswahrscheinlichkeit) ermittelten und somit die Wahl der Therapie bestimmen könnten.

2.2. Die Metastasierungskaskade

Die Metastasierung von Tumorzellen gleicht einer Kaskade, bei der eine Abfolge von Einzelschritten in einer bestimmten Reihenfolge durchlaufen werden muss. Der vorangehende Schritt muss jeweils erfolgreich abgeschlossen sein, bevor der nächste Schritt beginnen kann (Abbildung 1). Der erste Schritt dieser Metastasierungskaskade beinhaltet die Proliferation der Tumorzellen am Ort des Primärtumors. Ist eine bestimmte Tumormasse erreicht, bewirken angiogene Faktoren das Einwachsen von Blutgefäßen. Vitale Tumorzellen lösen sich dann aus dem Zellverband und dringen in die umgebende extrazelluläre Matrix ein. Morphologisch wird ein neuer Schritt sichtbar, wenn die Tumorzellen die Basalmembran und das Endothel der Tumorblutgefäße penetrieren und somit in den Blutkreislauf gelangen. Im Blutstrom müssen die Tumorzellen zunächst überleben, um sich dann an das Gefäßendothel des Zielorgans anzuheften und wiederum das Endothel und die darunter liegende Basalmembran durchwandern. Erst wenn die Tumorzellen hier lokal proliferieren, entstehen klinisch manifestierte Metastasen (Hart und Saini, 1992; Engers und Gabbert, 1998; Hart et al., 1989).

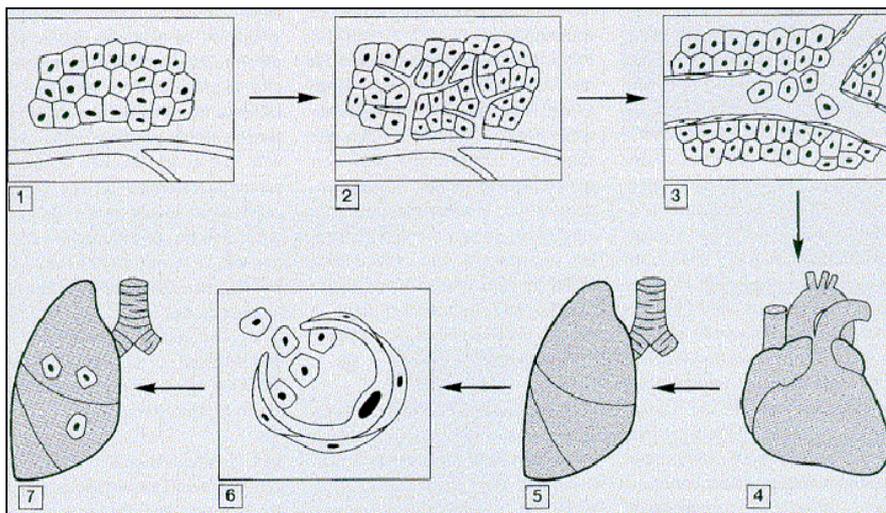


Abbildung 1: Die Metastasierungskaskade. Die primär entartete Zelle wächst zu einer Tumormasse heran (1), die ab einer bestimmten Größe angiogene Signale aussendet. Dies führt zum Einsprossen von Blutgefäßen (2). Nach Degradation der extrazellulären Matrix und Penetration der Basallamina und des Gefäßendothels (3) gelangen die Tumorzellen in die Blutbahn (4). Im Blutstrom müssen die Tumorzellen überleben, sich an das Endothel am Ort der zukünftigen Metastase anheften (5) und wiederum Endothel und Basallamina durchwandern (6) und sich im Wirtsgewebe einnisten. Erst nach erfolgter lokaler Proliferation resultieren klinisch erkennbare Metastasen (7). (Abbildung angefertigt von Frau C. Lück, Zeichnerin des Instituts für Anatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Bei all diesen beschriebenen Prozessen kommt es zu Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen zwischen den Tumorzellen einerseits und dem umgebenden Gewebe andererseits. Deshalb ist der Aufbau und die Zusammensetzung der Zellmembran, die diese Interaktionen vermittelt, von besonderer Bedeutung, da sie bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle einnimmt.

2.3. Aufbau und Funktion der Zellmembran

Die Zelloberfläche jeder Zelle eines Säugetieres, maligne Tumorzellen eingeschlossen, besteht aus einer Zellmembran, welche aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Die extrazelluläre Zelloberfläche ist weitgehend mit der Glykokalix bedeckt, welche aus Kohlenhydraten besteht (Silbernagel und Despopoulos et al., 2003). Diese Kohlenhydrate sind kovalent an Lipide, Proteine und an die Proteincores von Glykosaminglykanen gebunden, welche in die Zellmembran integriert sind (Abbildung 2). Die nahezu ausschließliche Lokalisation der Zucker an der Zelloberfläche legt die Vermutung nahe, dass diese Kohlenhydrate an Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen beteiligt sind. Selektine sind Transmembranproteine von Endothelzellen, als Beispiel dafür seien die Selektine genannt. Wegen ihrer funktionellen Bedeutung ist es wichtig, diese Kohlenhydrate zu charakterisieren. Dies kann unter anderem mit Lektinen geschehen.

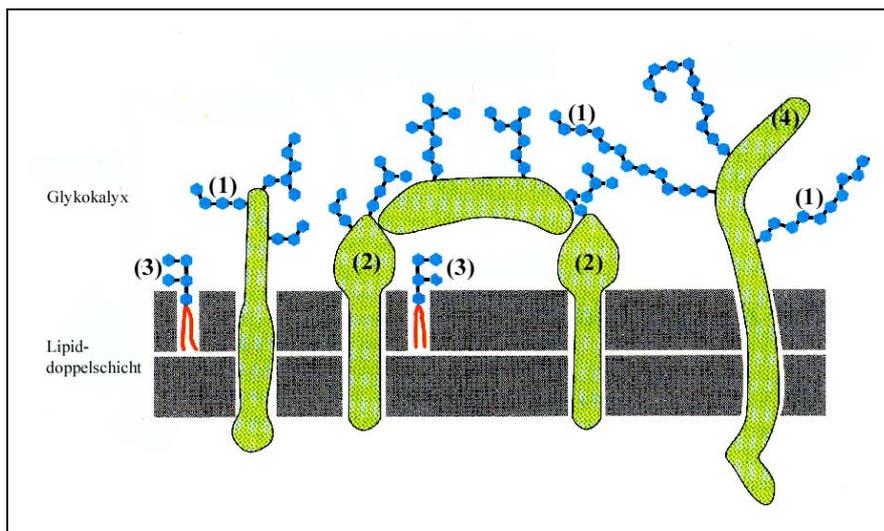


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Glykokalix einer eukaryontischen Zelle. Die Glykokalix setzt sich aus Oligosacchariden (1) der Membranglykoproteine (2), -lipide (3) und der Membranproteoglykane (4) zusammen. Die Kohlenhydrate spielen eine wichtige Rolle bei Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen. Abbildung modifiziert nach Alberts et al., 1994, modifiziert nach Dr. A. Thies 1999.

2.4. Charakterisierung der Zuckerreste von Membranglykoproteinen durch Lektine

Lektine sind Proteine nicht immunologischer Herkunft, die Zellen agglutinieren und/oder Glykoproteine präzipitieren können (Pusztai, 1991). Der Name Lektin wurde von Boyd und Shapleigh (1954) geprägt, er leitet sich aus dem lateinischen Verb *legere* ab, welches auswählen bedeutet. Lektine verfügen über Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRD = carbohydrate recognition domains), über die sie nicht-kovalente Bindungen mit den für sie spezifischen Kohlenhydraten eingehen können. Durch diese Eigenschaft der Lektine, nur an spezifische Kohlenhydrate zu binden, hat die Verwendung von Lektinen Einzug und Bedeutung in die Tumorforschung erhalten, da sie in der Lage sind, Veränderungen der Glykokalyx, die während der malignen Transformation auftreten, darstellen zu können. Besonders die Bindung des Lektins aus der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* Agglutinin (HPA) erwies sich als prognostisch relevant in einer Reihe von malignen Tumoren. In histologischen Schnitten band sich dieses Lektin besonders an die Zellen solcher Primärtumoren, deren Träger eine schlechte Prognose hatten. Da bei Krebspatienten eine schlechte Prognose generell mit einer Metastasierung gleichgesetzt werden kann, kann man die Bindung von HPA an Karzinomzellen des Primärtumors als einen Indikator für ihre hohe Metastasierungstendenz ansehen. Diese hohe prognostische Relevanz des HPA-Bindungsverhaltens konnte bereits bei Mamma- (Leathem und Brooks et al., 1996) und Kolonkarzinomen (Schumacher et al., 1994), sowie bei Prostata- (Shirashi et al., 1992), Magen- (Kakeji et al., 1992) bronchialen Adenokarzinomen (Laak et al., 2002 -a), und malignen Melanomen (Thies et al., 2001, 2006) nachgewiesen werden.

Eine solche positive Assoziation zwischen Lektinbindung und schlechter Prognose konnte nicht nur für HPA, sondern auch für eine Reihe weiterer Lektine gezeigt werden. Eine Abnahme der SNA-I (*Sambucus nigra* Agglutinin) Bindung erwies sich als Indikator für ein erhöhtes Metastasierungsrisiko bei Prostatakarzinomen (Kosanovic et al., 2005). Zudem wurde eine positive Assoziation zwischen einer erhöhten SNA-I und *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA) Bindung und dem Auftreten vom Plattenepithelkarzinomen der Lunge aufgezeigt (Chovanec et al., 2004). Die Expression von MAA-Bindungsstellen stieg bei malignen Prostataveränderungen (Ohyama et al., 2004).

Die Bindung des Lektins *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) wies bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen eine prognostische Relevanz auf (Fernandes et al., 1991). Postmitotische, sich früh differenzierende Zellen in Plattenepithelkarzinomzellen banden das Lektin *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) (Hrdlickova-Cela et al., 2001), desweiteren konnten erste Oberflächenveränderungen im Sinne einer Differenzierung von pluripotenten

murinen Stammzellen durch eine erhöhte DBA-Bindung angezeigt werden (Nash et al., 2007).

Der Nachweis der prognostischen Relevanz der Veränderungen der terminalen Kohlenhydrate der Glykokalix durch die Lektine wirft die Frage nach den dahinter stehenden molekularen Mechanismen auf, die bisher nur in Ansätzen geklärt sind (Dwek et al., 2001; Brooks et al., 2008).

2.5. Bedeutung der Glykosylierung von Membranproteinen für die Metastasierung

Grundsätzlich können Membranproteine und -lipide durch Glykosylierung in ihrer Funktion modifiziert werden. Bei der Metastasierung sind die membranständigen Zelladhäsionsmoleküle von besonderer Bedeutung, da ihre Modulation eine wichtige Rolle bei der Ablösung metastatischer Tumorzellen vom Primärtumor, bei der Bildung von Tumorzellaggregaten im Blutstrom, sowie bei der Anheftung an Gefäßendothelien des Zielorgans und bei der Bildung solider Metastasen spielt (Hart und Saini, 1992). Im Hinblick auf die Zelladhäsionsmoleküle spielt die Glykosylierung der Membranproteine und der Glykolipide eine zweifache funktionelle Rolle. Zum einen kann die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle durch die Glykosylierung verändert werden. Damit hat die Glykosylierung einen direkten Einfluß auf die Funktion eines Zelladhäsionsmoleküls. Als Prototyp eines solchen glykosylierten Moleküls kann das CEACAM1 gelten. Zum anderen können Zuckerreste auf den Tumorzellen auch als Liganden für zuckerbindende Zelladhäsionsmoleküle dienen. Ein solches Molekül stellt das sialinsäurebindende Siglec L1 dar. Desweiteren gibt es Zelladhäsionsmoleküle, die Kohlenhydrate binden und somit Bindungen mit Liganden anderer Zelloberflächen eingehen. P- und E-Selektine gehören zu diesen Molekülen. Andere Adhäsionsmoleküle interagieren mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix und unterstützen somit die Wanderung von Zellen durch die extrazelluläre Matrix (ECM) und die Ansiedlung in bestimmten Gewebekompartimenten. Ein solches Molekül ist CD44.

2.5.1. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1

CEACAM1 ist ein Mitglied der CEA-Genfamilie des CD66 Clusters hochglykolysierter Adhäsionsmoleküle, welche der Immunglobulin-Superfamilie angehören (Thompson et al., 1991). CEACAM1 besteht zu mind. 35% des Molekulargewichts (160kD) aus

Kohlenhydraten dessen Oligosaccharidkette N-glykosidisch mit den Peptidketten verknüpft ist (Yamashita et al., 1989; Wagener et al., 1999).

CEACAM1 ist in vielen humanen Epithelzellen exprimiert (Prall et al., 1996). Im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, der Zervix uteri, im Endometrium und der Blase ist eine CEACAM1 Expression beschrieben worden (Prall et al., 1996). In der myeloischen Reihe ist CEACAM1 hauptsächlich auf Granulozyten exprimiert; hingegen konnte auf Lymphozyten bisher nur bei T-Zell-Leukämien und auf stimulierten T-Lymphozyten CEACAM1 nachgewiesen werden (Haneberg et al., 1994; Kammerer et al., 1998). Bei Endothelzellen weist CEACAM1 die Eigenschaften eines angiogenen Faktors auf (Ergün et al., 2000), desweiteren wird es stark von invasiven Trophoblasten exprimiert (Bamberger et al., 1999). Beim malignen Melanom zeigte sich eine Heraufregulation von CEACAM1 als unabhängiger prognostischer Marker für eine Metastasierung (Thies et al., b, 2002; Thies et al., 2007). Auch beim Adenokarzinom der Lunge ist die Hochregulation von CEACAM1 mit einer schlechten Prognose assoziiert (Laack et al., b, 2002).

Dagegen wird CEACAM1 in einer Reihe von epithelialen Tumoren eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben (Izzi et al., 1999). Beim Mamma- (Riethdorf et al., 1997), kolorektalen (Neumaier et al., 1993), sowie beim Prostatakarzinom (Luo et al., 1999) konnte eine herunterregulierte Expression von CEACAM1 im Vergleich zu normalen Gewebe gezeigt werden. Für das Endometriumkarzinom ist eine Dysregulation von CEACAM1 beschrieben worden (Bamberger et al., 1998).

2.5.2. Das Zelladhäsionsmolekül L1

Das Zelladhäsionsmolekül L1 gehört ebenfalls zu der Immunglobulin-Superfamilie (Moos et al., 1988) und reguliert eine Reihe von Zellerkennungsmechanismen im zentralen und im peripheren Nervensystem (Kowitz et al., 1993; Martini, 1994).

L1 vermittelt sowohl homotypische, als auch heterotypische Zelladhäsion (Kadmon et al., 1990 a, b; Blaess et al., 1998; Grumet et al., 1993; Grumet und Edelman, 1988). Die Expression von L1 wurde nicht nur in Nervengewebe, sondern auch in Lymphozyten, Granulozyten und Epithelzellen des Intestinal- und Urogenitaltraktes beschrieben (Kowitz et al., 1992; Kujat et al., 1995; Thor et al., 1987; Allory et al., 2005; Kaifi et al., 2006). Ferner wurde in einer Reihe hochmaligner Tumoren, unter anderem in Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen, Retinoblastomen und Bronchialkarzinomen, eine L1-Expression beschrieben. Eine signifikante Korrelation zwischen der Heraufregulation von L1 und der Metastasierung wurde im kutanen malignen Melanom beschrieben (Thies et al., 2002).

2.5.3. Die Zelladhäsionsmoleküle P- und E-Selektin

Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle, die Kohlenhydrate binden, und daher zur Gruppe der Lektine gehören. Der Begriff Selektin steht für selective lectin-dependent cell adhesion molecule. Selektine spielen eine bedeutende Rolle für die Bindung von Leukozyten an das Endothel und damit für die Extravasation von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen.

Selektine gehören einer Klasse von Zelloberflächen-Kohlenhydratrezeptoren an, welche Bindungen mit Liganden anderer Zelloberflächen bildet. Vor allem Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten und freien Phagozyten gehen Bindungen über die Selektine ein, die auf Endothelzellen exprimiert sind. Selektine besitzen eine extrazelluläre Region bestehend aus einem N-terminalen Ca^{2+} Lektin-Abschnitt, einem EGF (= epidermal growth Faktor) Motiv, einer variablen Anzahl von kurzen sich wiederholenden Einheiten (SCR = short Consensus repeats), einem transmembranen Abschnitt und einem intrazellulären cytoplasmatischen Ende (Wagener et al., 1999).

P-Selektine werden nach Stimulation auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert und vermitteln die Adhäsion von Thrombozyten, Leukozyten und Lymphozyten an Endothelzellen sowie an Phagozyten (Wagener et al., 1999).

Tumorzellen ahmen diesen oben beschriebenen gleichen Mechanismus der Leukozyten nach, um aus dem Blutgefäß in die ECM des Wirtsgewebes zu gelangen. Medikamente, welche die Expression von E-Selektin im vaskulären Endothel unterbinden und somit eine Anheftung der Tumorzellen verhindern, werden bereits erfolgreich bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eingesetzt (Matsumoto et al., 2002).

2.5.4. Das Adhäsionsmolekül CD44

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, welches auf den Oberflächen von Leukozyten, Erythrozyten und vielen Epithelien, sowie auf anderen Zellen aus dem Neuroektoderm, wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie auf Gliazellen und Astrozyten des zentralen Nervensystems exprimiert wird (D'Alessandro et al., 1994; Tsukuda und Kawano, a, 2005). CD44 vermittelt Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Kontakte, wobei Hyaluronsäure den wichtigsten Ligand darstellt (Wagener et al., 1999). Die Interaktion von zellulärem CD44 mit Hyaluronsäure sowie mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix unterstützt die Migration von Zellen durch die ECM und die Ansiedlung in bestimmten Gewebekompartimenten. CD44 reguliert die Bindung von Leukozyten an periphere Lymphknoten, sowie die Bindung an mukoide und synoviale Endothelzellen (Wagener et al., 1999).

Bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen, zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der Hochregulation von CD44 und einer schlechten Überlebensrate der Patienten (Kosma und Kosunen, 2007). Des Weiteren ist die CD44 Konzentration im Patientenserum ein Klassifizierungskriterium bei Kopf- und Halstumoren, je größer die CD44 Konzentration ist, desto schlechter ist die Prognose des Patienten (Kawano et al., 2005 - a). Eine Herabregulation von CD44 ist hingegen bei der Entstehung von humanem Prostatakrebs beobachtet worden, hierbei ist unter anderem die Hyaluronsäure- Bindungsfähigkeit reduziert (Miyake et al., 1998). Die Fähigkeit des CD44 Metastasierungen hämatogener und solider Knochentumore zu regulieren und somit entscheidenden Einfluss auf Ausbildung von skelettalen Mikrometastasen zu haben, wird derzeit diskutiert (Hill et al., 2006). Da eine Hochregulation der CD44-Expression mit einer erhöhten Metastasierungsrate und einer schlechten Prognose assoziiert ist und das Binden von CD44 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern terminale Veränderungen/Differenzierungen von leukämischen Blasten in einige Subtypen auslösen kann, wird eine Therapie für Leukämie diskutiert, in der die CD44 bedingte Differenzierung verhindert werden soll (Liu et al., 2006).

2.5.5. Das Urogen Brachyury

Der Name Brachyury kommt von dem griechischen Wort „brackhus“ welches „kurz“ bedeutet und „oura“, welches „Schwanz“ bedeutet.

Das Brachyurygen kodiert für einen 436 Aminosäuren großen embryonalen nukleären Transkriptionsfaktor, welcher entscheidend für die Kontrolle der frühen Formation des vertebralen Embryos ist (Kispert et al., 1993). Die Expression des Brachyurygens ist ein diagnostischer Bio-Marker für das Chordom, ein seltener maligner primärer Knochentumor, der an der Schädelbasis, meist am Clivus Blumenbachii und von Resten der Chorda dorsalis, dem Nucleus pulposus des Discus intervertebralis ausgeht. Somit ist Brachyury ein entscheidender Regulator der notochordalen Entwicklung und beweist, dass Chordome aus Zellen des Notochords entstehen weil nur diese den Brachyury Transkriptionsfaktor exprimieren (Vujovic et al.; 2006).

3 Material und Methoden

3.1. Histologisches Untersuchungsgut

In Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Primärtumore des adenoid zystischen Karzinoms von 71 Patienten, die im Zeitraum zwischen 1985 und 1996 in der Strahlentherapie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf postoperativ mit Neutronen bestrahlt worden waren, wurden initial aus dem Archiv der Strahlentherapie herausgesucht. In die Untersuchung wurden nur die Primärtumore aufgenommen, für die eine lückenlose Dokumentation der klinischen Nachuntersuchungen vorlag.

Für 34 adenoid zystischen Karzinome konnte anhand vollständiger Krankenblätter der Zeitpunkt der Diagnosestellung, der Operation, sowie das Auftreten von Metastasen und Rezidiven, sowie das Versterben der Patienten ermittelt werden. Nur die Daten dieser 34 adenoid zystischen Karzinome werden im Folgenden berücksichtigt. 37 Fälle des adenoid zystischen Karzinoms fielen aus der Untersuchung heraus, da entweder die Dokumentation lückenhaft war, oder die Dokumente nicht zur Verfügung gestellt werden konnten.

3.2. Patientencharakteristika

Von den 34 Patienten waren 19 weiblich und 15 männlich. Das Durchschnittsalter betrug 59,5 Jahre mit einer Altersspanne von 29 bis 76 Jahren. Von den untersuchten adenoid zystischen Karzinomen waren jeweils 9 vom tubulären- und 9 vom soliden histologischen Subtyp. 15 Patienten wiesen einen cribriformen histologischen Subtyp auf, ein einziges adenoid zystisches Karzinom lag in tubulär/cribriformer- Mischform vor. Von den 34 Patienten starben 17 aufgrund der Tumorerkrankungen, zwei weitere Patienten sind an anderen Erkrankungen verstorben. Rezidive traten bei 15 Patienten auf, Metastasen wurden bei 12 Patienten dokumentiert. Von den 34 Patienten sind drei an Folgen der Metastasierung verstorben, vier an Folgen aggressiv-invasiv wachsenden Rezidiven. Neun der Patienten hatten sowohl Rezidive als auch Metastasen.

3.3. Anfertigung von Paraffinschnitten

Von den routinemäßig in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten adenoid zystischen Karzinomen wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden auf silanbeschichtete Objektträger (Histo Bond®, Marienfeld, Deutschland) aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgenden Färbungen und Reaktionen rehydriert.

3.4. Lektin histochemie

Alle Inkubationen wurden, soweit es nicht anders beschrieben ist, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ (alle Reagenzien Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten) und anschließend mit 10 µg/ml des jeweiligen biotinylierten Lektins eine Stunde inkubiert. An Lektinen wurden DBA, GNA, PHA-L, SNA-I und biotinyliertes HPA (alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie MAA (Vektor, Deutschland) verwendet. Die Herkunftsspezies, die Abkürzungen und die Zuckerspezifitäten der verwendeten Lektine sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach dreimaligem Spülen in Trispuffer (TBS: 50 mM Trizma Base (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 150 mM NaCl; pH 7,6), wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wiederum in TBS gespült und die Farbreaktion wie folgt durchgeführt: 7,5 ml einer 4%igen Natriumnitritlösung wurden mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin in 100 ml 2 n HCl) vermischt. Es wurden sofort 150 ml TBS (pH 8,64), versetzt mit 180 µl Tween 20 (Sigma, Steinheim, Deutschland) zur Unterdrückung der Hintergrundfärbung sowie 60 mg Levamisole (Sigma, Steinheim, Deutschland) zur Hemmung der endogenen nicht-intestinalen alkalischen Phosphatase zugegeben. Anschließend wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 750 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Präparate wurden in dieser Lösung 20 Minuten unter Lichtausschluß

belassen. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt. Abschließend wurden die Präparate in 50%igem Mayers Hämalaun 10 Sekunden gegengefärbt, 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit dem wasserhaltigen Eindeckmedium Clarion/Chrystal Mount (Biomedica, Foster City, CA, USA) eingedeckt.

In jeder Serie wurde jeweils ein Schnitt eines Falles, der zuvor positiv für das jeweilige Lektin war, zur Kontrolle der Intensität der Enzymfarbreaktion mitgefärbt.

Herkunftsspezies	Abkürzung	Kohlenhydratspezifität
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	α -D-N Azetylgalaktosamin
Galanthus nivalis agglutinin	GNA	Nicht reduzierte Enden von terminalen D-Mannosylreste
Helix pomatia Agglutinin	HPA	N-Azetylgalaktosamin/N-Azetylglukosamin
Maackia amurensis Agglutinin	MAA	Sialinsäure (α 2-3 gebunden)
Phaseolus vulgaris Agglutinin	PHA-L	Kohlenhydrate vom komplexen Typ (β 1-6 glykosidisch verbunden)
Sambucus nigra Agglutinin	SNA-I	Sialinsäure (α 2-6 verbunden)

Tabelle 1: Herkunftsspezies, Abkürzungen und Kohlenhydratspezifitäten der verwendeten Lektine.

3.4.1. Indirekte Methode

Für die Bindung des Lektins HPA wurde noch eine zusätzliche Färbemethode verwendet, diese wird im Folgenden als indirekte Methode (iHPA) bezeichnet. Die oben beschriebene Methode unter Verwendung des biotinylierten HPA, wird entsprechend als bHPA bezeichnet.

Bis zur Inkubation mit 10 μ g/ml HPA, wurde mit den Schnitten verfahren, wie oben

beschrieben. Statt des biotinylierten HPAs wurde für diese Methode jedoch natürliches HPA verwendet. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in TBS gewaschen und mit einem 1:400 verdünnten Kaninchen-anti-HPA Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS, wurden die Schnitte eine Stunde mit einem 1:400 in TBS verdünnten, biotinylierten Schweine-anti-Kaninchen Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum in TBS dreimal fünf Minuten gespült. Abschließend wurden die Schritte mit dem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex 30 Minuten inkubiert, die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wurde entwickelt, die Schnitte gegengefärbt, gebläut und eingedeckt, wie oben beschrieben.

3.4.2. Zuckerhemmung

Da das Lektin HPA an zwei Zucker (N-Azetylgalaktosamin(GalNac) und N-Azetylglucosamin (GlucNac)) bindet, galt es herauszufinden, ob beim adenoid zystischen Karzinom HPA an nur einen oder beide Zucker bindet. Daher wurden drei Lösungen mit HPA angesetzt, von denen die erste mit einer molearen Konzentration von 200 mM GlucNac, die zweite mit 200 mM GalNac und die dritte mit insgesamt 200 mM GlucNac und GalNac angesetzt wurde. Somit konnte Lösung I nur Bindungen hemmen, die mit GalNac eingegangen wurden, da nur diese Bindungsstellen noch für Bindungen zur Verfügung standen. Lösung II konnte nur Bindungen hemmen, die mit GlucNac eingegangen wurden, während Lösung III Bindungen von GalNac und GlucNac hemmte. Die Lösungen wurden eine Stunde vor Anfang der Lektinfärbung angesetzt und viertelstündlich während der Inkubation auf einem Schüttelinkubator (Janke & Kunkel, IKA®-Labortechnik, Deutschland) durchmischt, um eine vollständige Bindung zwischen Zucker und Lektinbindungsstelle zu ermöglichen. Die Durchführung der Färbung entsprach der direkten Methode, welche oben beschrieben wurde.

3.4.3. Darstellen der Bindungsstellen für die P- und E-Selektine

Die rehydrierten Schnitte wurden dreimal für fünf Minuten in LP gespült. Anschließend wurde mit Normalserum aus dem Kaninchen (DAKO, Glostrup, Dänemark) 1:10 in AB-Solution von DAKO für 30 Minuten inkubiert. Hiernach wurde mit löslichem E-Selektin- (20

µg/ml) bzw. P-Selektin-Fusionsprotein (8 µg/ml) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in TBS gespült um anschließend mit einem 1:200 verdünnten Kaninchen-Anti-Human-biotinyliert (DAKO, Glostrup, Dänemark) für eine Stunde inkubiert zu werden. Hiernach wurde dreimal für fünf Minuten in TBS gewaschen und danach mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) für 30 Minuten inkubiert. Die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wurde entwickelt, die Schnitte wurden gegengefärbt, gebläut und eingedeckt, wie oben beschrieben.

3.5. Immunhistochemie

Alle verwendeten Antikörper wurden in “Antibody Diluent with Background Reducing Components” (DAKO, Carpinteria, Kalifornien, USA) verdünnt und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.5.1. Darstellen des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1

Der monoklonale Antikörper 4D1/C2 gegen das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. C. Wagener (Abteilung für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

Der monoklonale Antikörper 4D1/C2 wurde gemäß etablierter Methoden hergestellt, aufgereinigt und auf seine Spezifität getestet (Ebrahimnejad et al., 2000).

Die rehydrierten Schnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6.0) in der Mikrowelle fünfmal für je zwei Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter Zitratpuffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend wurden die Schnitte in TBS (pH 7,6) dreimal fünf Minuten gespült und die unspezifischen Bindungen mit 10% igem Kaninchen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem 1:125 verdünnten 4D1/C2 Antikörper, über Nacht bei 4° C. Je nach Größe des Schnittes wurden 100 bis 200 µl der Antikörperlösung verwendet. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS entfernt und die Schnitte mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Maus Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer 1:40 Verdünnung für 20 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS

für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex 30 Minuten inkubiert und die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wie zuvor beschrieben, entwickelt, wobei hier eine Konzentration des Levamisols von 100 mg pro 200 ml vorlag. Abschließend wurden die Schnitte gegengefärbt, gebläut, und mit Crystal Mount, (Biomedica, Foster City Kalifornien, USA) eingedeckt. Mit Negativkontrollen wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurde die Inkubation mit dem monoklonalen primären Antikörper durch Iso-IgG (Maus IgG2a, κ UPC-10; Sigma, Frankfurt, Germany) ersetzt.

3.5.2. Darstellen des Zelladhäsionsmoleküls L1

Der monoklonale Kanichenantikörper gegen L1 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. P. Altevogt (Institut für Tumorummunologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Zur Immunisierung des Kaninchens wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne von L1 und dem Fc-Fragment von humanem I_HH1, verwendet. Die Immunisierung erfolgte nach einer etablierten Methode (Rathjen und Schachner, 1984). Das zur Immunisierung verwendete Fusionsprotein wurde aus transfizierten CHO Zellen gewonnen (Chen et al., 1999). Die Antikörper wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Spezifität im Western Blot und ELISA-Verfahren bestätigt (Haspel et al., 2000).

Die rehydrierten Schnitte wurden in EDTA Puffer (pH 8.0) in der Mikrowelle dreimal für je fünf Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter EDTA Puffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend wurden die Schnitte in LP (pH 7.6) dreimal fünf Minuten gespült und die unspezifischen Bindungen mit 10%igem Ziegen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) blockiert. Es folgte eine Inkubation mit 1:100 verdünnten L1-11A (unverdünnter Zellüberstand), über Nacht bei 4° C. Je nach Größe des Schnittes wurden 100 bis 200 µl der Antikörperlösung verwendet. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS (pH 7.6) entfernt und die Schnitte mit einem biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer 1:40 Verdünnung für 40 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex 30 Minuten inkubiert und wiederum dreimal fünf

Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase mit Naphtol AS Bisphosphat als Substrat und Neufuchsin zur simultanen Koppelung sichtbar durchgeführt und die Präparate gegengefärbt, gebläut und eingedeckt, wie oben beschrieben.

3.5.3 . Darstellen des Zelladhäsionsmoleküls CD44

Die rehydrierten Schnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6.0) in der Mikrowelle fünfmal für je zwei Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter Zitratpuffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend wurden die Schnitte in TBS (pH 7,6) dreimal fünf Minuten gespült und die unspezifischen Bindungen mit 10%igem Kaninchen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem 1:25 verdünnten Maus-anti-Human CD44 Antikörper (Pharmingen Art. No.: 550392), über Nacht bei 4° C. Je nach Größe des Schnittes wurden 100 bis 200 µl der Antikörperlösung pipettiert. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS entfernt und die Schnitte mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Maus Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer 1:200 Verdünnung für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte in einer Lösung aus 20% iger Essigsäure in Methanol für drei Minuten gespült, um dann mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex für 30 Minuten inkubiert zu werden. Nach anschließendem dreimaligen Waschen in TBS wurde die Enzymreaktion durchgeführt, gegengefärbt, gebläut und eingedeckelt, wie oben beschrieben.

3.5.4. Darstellen des Transkriptionsfaktors/ Urgens Brachyury

Die rehydrierten Schnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6.0) in der Mikrowelle fünf Mal für je zwei Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter Zitratpuffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend wurden die Schnitte in TBS (pH 7.6) drei mal fünf Minuten gespült und unspezifische Bindungen mit 10%igem Kaninchen-

Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) blockiert. Es folgte eine Inkubation mit 1:20 verdünnten Ziege-anti-human Brachyury Antikörper (R&D Systems Cat. No.: AF2085) über Nacht, bei 4° C. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen in TBS + 0,1% BSA (Sigma, Steinheim, Deutschland) und einmaligem Waschen in TBS entfernt und die Schnitte mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Ziege Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer 1:200 Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen in TBS + 0,1% BSA und einmaligem Waschen in TBS für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) für 30 Minuten inkubiert. Es wurde wiederum zweimal mit TBS + 0,1% BSA und einmal mit TBS für je fünf Minuten gespült und die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wurde entwickelt, die Schnitte wurden gegengefärbt, gebläut und eingedeckt, wie oben beschrieben.

3.6. Histologische Auswertung

3.6.1. Lektin- und Immunhistochemie

Die histologischen Schnitte wurden kodiert und ohne die Kenntnis der klinischen Daten der dazugehörigen Patienten ausgewertet. Alle Tumorschnitte wurden zweimal mikroskopiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Fragliche Tumorschnitte wurden von einem zweiten, unabhängigen Untersucher, beurteilt und die Ergebnisse diskutiert. Alle histologischen Schnitte wurden mit einem Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Zur Befunddokumentation wurden einzelne Tumorschnitte mit der digitalen Axiocam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fotografiert. Alle untersuchten lektin- und immunhistochemischen Schnitte wurden in positive und negative Fälle unterteilt. Als negativ galten alle Schnitte, welche eine Farbreaktion in weniger als 5% der Tumorzellen aufwiesen. Supranukleäre Anfärbung des Golgiapparates durch das Lektin HPA wurden ebenfalls als negativ bewertet. Diese Auswertungskriterien wurden in mehreren Arbeiten bereits erfolgreich angewandt, wie z. B. beim kolorektalen Karzinom (Schumacher et al., 1994), beim malignen Melanom (Thies et al., 2001, 2007). Desweiteren wurde eine Farbintensitätsabstufung vorgenommen und die Farbreaktion in schwach (+), mittelgradig (++) und intensiv (+++) eingeteilt (Thies et al., 2001, a, b; 2002; 2007). Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der Markerexpression innerhalb des

Gesamt tumors bewertet und in größer als 80% ($> 80\%$) und kleiner als 80% ($< 80\%$) eingeteilt.

3.7. Statistische Auswertungen

3.7.1. Univariate Analyse

Für jeden Marker (Antigenexpressionsstatus bzw. Lektinbindungsstatus) wurden Kaplan-Meier Analysen (Kaplan und Meier, 1958) für den Zeitraum von Diagnose des Karzinoms bis zum Rezidiv, der Metastasierung und des Todes erstellt.

Zudem wurde diese Analysen jeweils mit Abstufungen der Intensität erstellt, in denen intensive (+++) Färbungen geringeren Intensitäten gegenüber gestellt wurde, sowie Analysen in denen Markerepression in $> 80\%$ der Tumorzellen im Vergleich zu geringer Expression auftrat.

Die Kaplan-Meier Analysen wurden mittels Graph Pad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, Kalifornien, USA) erstellt; $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.7.2. Korrelation der Glykotope

Die neu gefundenen Marker wurden mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizient (Rko) auf eine Korrelation hin untersucht. Auch für diese Analysen wurde das Programm Graph Pad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, Kalifornien, USA) angewandt und ebenfalls $P < 0.05$ als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1. Subtypen des adenoid zystischen Karzinoms

Von den 34 untersuchten adenoid zystischen Karzinomen waren 9 vom soliden, 9 vom tubulären und 15 vom cribriformen histologischen Subtyp (Abb. 3). Ein adenoid zystisches Karzinom lag in tubulär/cribriformer Mischform vor.

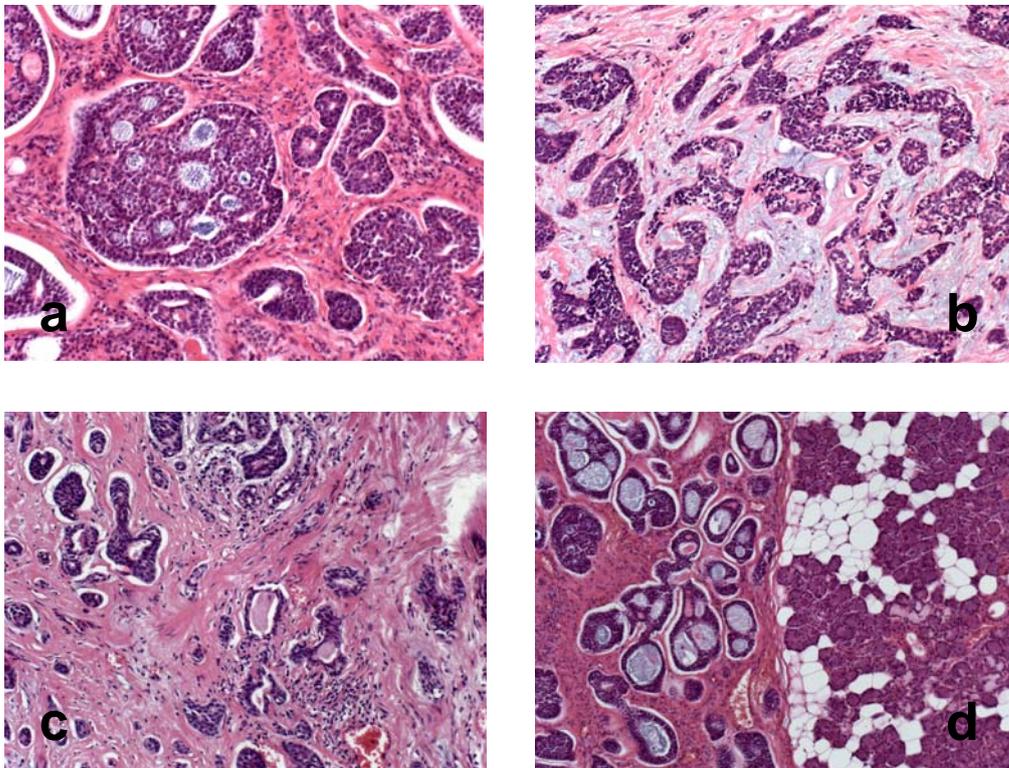


Abbildung 3: Darstellung der drei histologischen Subtypen des adenoid zystischen Karzinoms. Der cribriforme Subtyp (a) wird am häufigsten in unserer Serie angetroffen, der solide Subtyp tritt am seltensten auf (c). Am zweithäufigsten tritt der tubuläre Subtyp auf (b). Abbildung (d) zeigt ein adenoid zystisches Karzinom vom cribriformen Subtyp in direkter Nachbarschaft zu gesundem Drüsengewebe (linke Bildhälfte). Vergrößerung 50-fach, (d) 25-fach.

4.1.1. Prognostische Wertigkeit der histologischen Subtypen

Gesamtüberleben

Kaplan-Meier Analysen für das Gesamtüberleben zeigten für den soliden Subtyp ein tendenziell kürzeres Überleben auf, als für den cribriformen und tubulären Subtyp, welches jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($P = 0,206$). Der cribriforme und tubuläre Subtyp wiesen kaum unterschiedliche Überlebenszeiträume auf ($P = 0,696$) (Abb. 4).

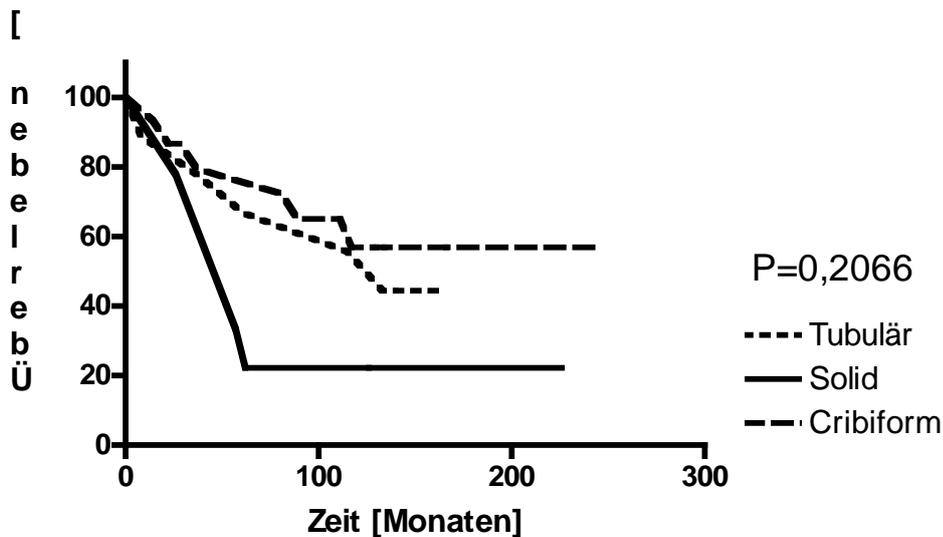


Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben bezogen auf die drei histologischen Subtypen des ACCs. Patienten, deren adenoid zystische Karzinome vom soliden Subtyp ist, hatten eine tendenziell kürzere Überlebenszeit ($P = 0,206$), als Patienten, deren Tumor cribriforme oder tubuläre Subtypen aufwiesen

Metastasenfreies Überleben

Die Kaplan-Meier Analysen für das metastasierungsfreie Intervall bezogen auf die beim adenoid zystischen Karzinom auftretenden drei Subtypen zeigten eine signifikant ($P = 0,0162$) schlechtere Prognose für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom einen soliden Subtyp hatten. Bei cribriformen und tubulärem Subtyp zeigten sich nur geringe Unterschiede ($P = 0,995$) bezogen auf die Metastasierungstendenz (Abb. 5).

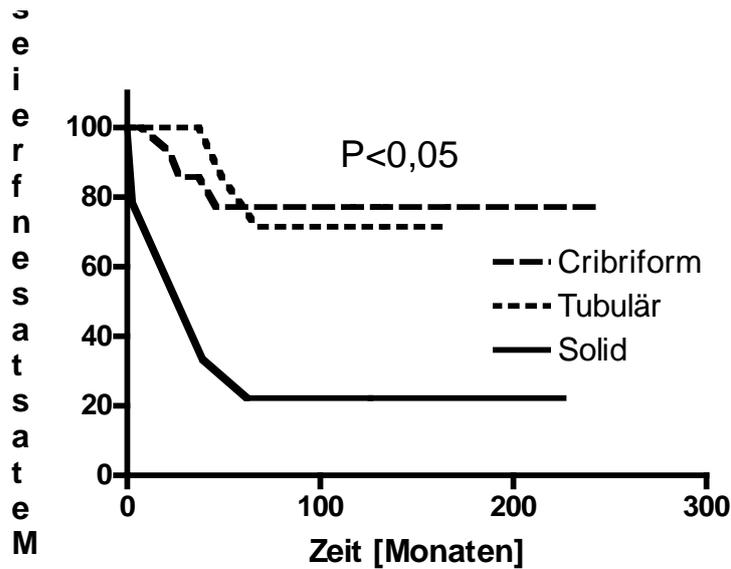


Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfremie Überleben bezogen auf die drei histologischen Subtypen des adenoid zystischen Karzinoms zeigten für Patienten mit soliden Subtypen des Tumors eine signifikant ($P = 0,0162$) kürzeres metastasenfremies Überleben auf.

Rezidivfreies Überleben

Die Kaplan-Meier Kurven zeigten, dass die Stratifizierung nach dem histologischen Subtyp keine Aussagekraft über die Länge des rezidivfreien Intervalls ($P = 0,507$; Abb. 6) hat.

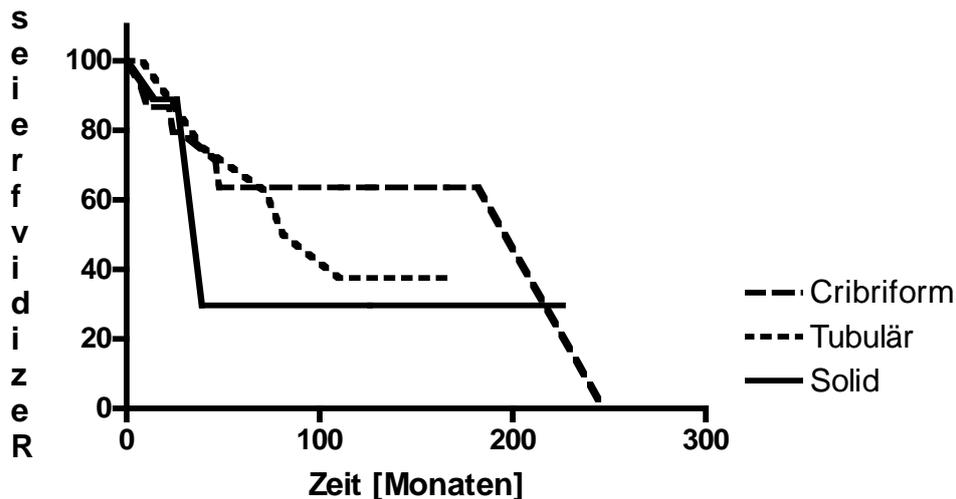


Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurve für das rezidivfreie Überlebensintervall bezogen auf die drei histologischen Subtypen des adenoid zystischen Karzinoms, zeigten, dass Patienten deren Tumoren den soliden Subtyp ausbildeten tendenziell ($P = 0,507$) häufiger Rezidive erlitten, als Patienten deren adenoid zystisches Karzinom den cribriformen oder tubulären Subtyp aufweisen.

4.2. Pseudozysten des cribriformen Subtyps

Von den 34 untersuchten adenoid zystischen Karzinomen waren 15 vom cribriformen histologischen Subtyp. Der cribriforme Subtyp kann Pseudozysten ausbilden. 12 der 15 Tumore des cribriformen Subtyps bildeten Pseudozysten aus, in denen mit lektin- und immunhistochemischen Färbungen unterschiedlich häufig und intensiv das darin befindliche Pseudozystensekret von den Antikörpern bzw. Lektinen gefärbt wurde (Abb. 7).

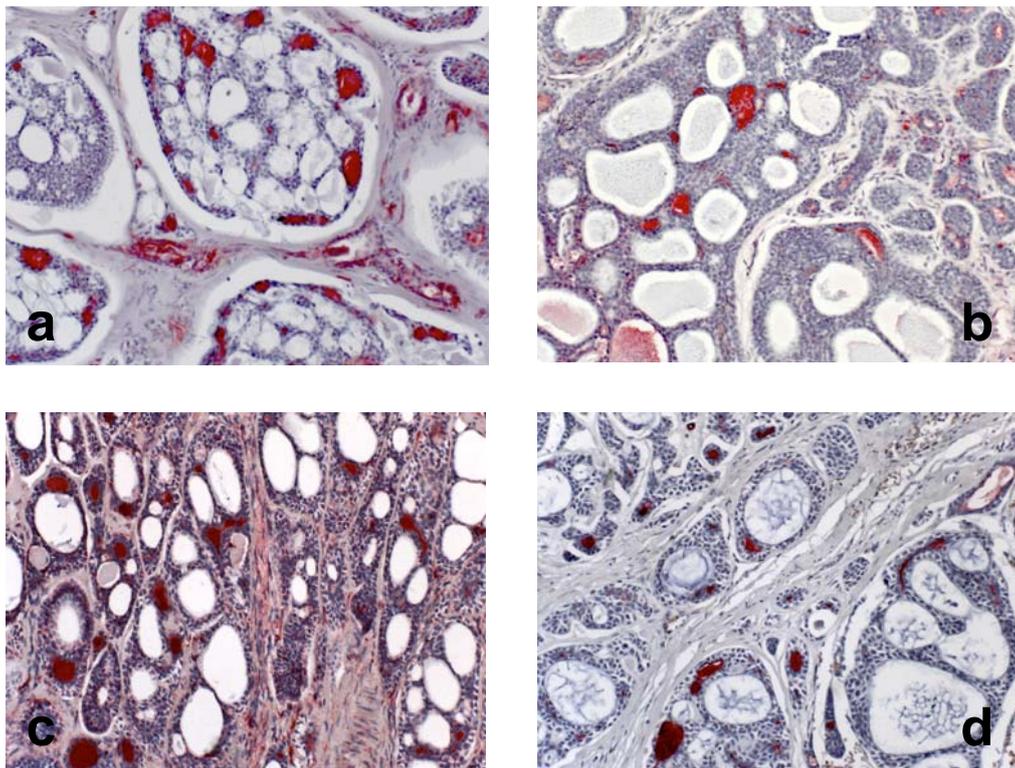


Abbildung 7: Anfärbung der Sekrete in den Pseudozysten beim adenoid zystischen Karzinom. Die Lektine HPA (a), MAA (b) und GNA (c) sowie das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1(d) stellten sich intensiv (+++) im Pseudozystensekret dar. Vergrößerung 100-fach.

4.4.1. Auftreten von Pseudozysten im cribriformen Subtyp

Spezielle Untersuchungen bezüglich der Prognose von Patienten, mit cribriformen Primärtumor (15) in Hinblick auf das Gesamtüberleben sowie der Ausbildung von Pseudozysten (12) zeigt eine signifikant gute Prognose für Patienten bei der Anwesenheit von Pseudozysten auf.

Patienten, deren Tumore Pseudozysten aufwiesen, zeigten ein signifikant geringeres Rezidivrisiko ($P = 0,003$) auf, als Patienten, deren cribriformer Tumor keine Pseudozysten ausbildete (Abb.8).

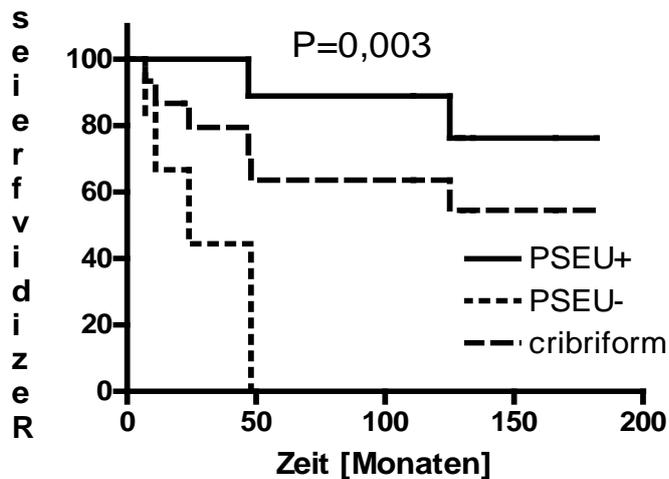


Abbildung 8: Kaplan- Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben in Bezug auf die Ausbildung von Pseudozysten beim cribriformen Subtyp des adenoid zystischen Karzinoms Patienten, deren Primärtumor vom cribriformen Subtyp Pseudozysten ausbildete (PSEU+), zeigte ein signifikant niedrigeres Rezidivrisiko ($P= 0,003$) auf, als Patienten, deren deren cribriformer Subtyp keine Pseudozysten ausbildete (PSEU-).

Patienten, mit Pseudozystenausbildung im cribriformen Tumor, zeigten ebenso signifikant eine längere Zeit der Metastasenfreiheit ($P = 0,009$). Patienten deren cribriformer Subtyp keinerlei Pseudozyten ausbildete, zeigten ein höhere Tendenz zur Metastasierung auf (Abb.9).

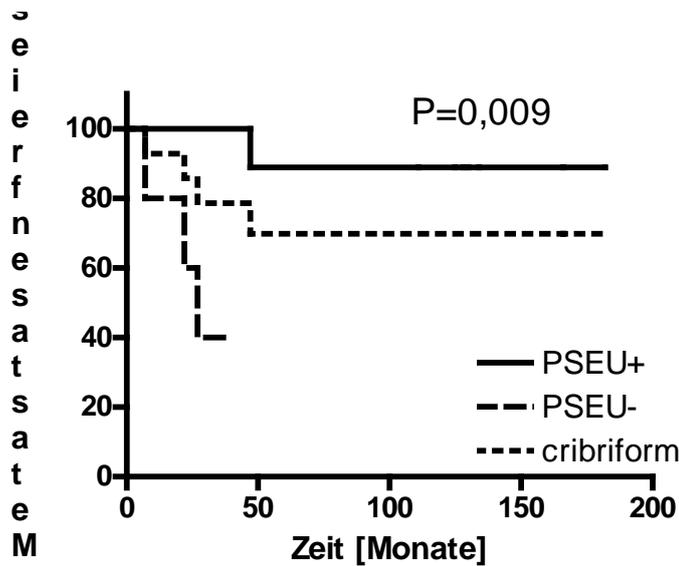


Abbildung 9: Kaplan-Meier Kurven für das metastasenfremie Überleben in Bezug auf die Ausbildung von Pseudozysten in Primärtumoren des adenoid zystischen Karzinoms mit cribriformen Subtyp (PSEU+), zeigten eine signifikant bessere Prognose für Patienten auf, deren Tumore Pseudozysten ausbildeten ($P = 0,009$). Patienten, deren Tumore keinerlei Pseudozysten (PSEU-) zeigten eine größere Metastasierungsrisiko auf.

Es zeigt sich bei Kaplan-Meier Analysen, das auch in Bezug auf das Gesamtüberleben, die Ausbildung von Pseudozysten im cribriformen Subtyp der Tumore eine signifikant bessere Prognose ($P = 0,004$) aufzeigt. Patienten, deren Tumore keine Pseudozysten in ihrem cribriformen Subtyp zeigten, wiesen eine bedeutend kürzeres Überleben auf (Abb.10).

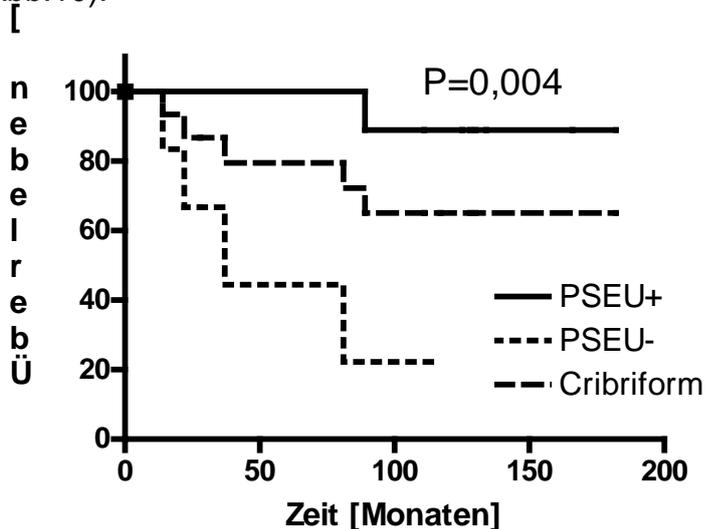


Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurven für das Gesamtüberleben in Bezug auf die Ausbildung von Pseudozysten im cribriformen Subtyp des adenoid zystischen Karzinoms (PSEU+). Patienten deren adenoid zystisches Karzinom Pseudozysten ausbildete zeigten ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($P = 0,004$) auf, als Patienten, deren cribriforme Tumore keinerlei Pseudozysten (PSEU-) aufwiesen.

4.2.2. Lektinbindungsverhalten

4.2.2.1. HPA

Bei lektin histochemischen Färbungen mit dem Lektin HPA in direkter Methode (bHPA) wurde HPA in dem Sekret der Pseudozysten von vier cribriformen adenoid zystischen Karzinomen gebunden (Abb. 11). Kaplan-Meier Analysen für das Bindungsverhalten des HPA im Pseudozystensekret bezogen auf das rezidivfreie Intervall, ergaben signifikant ($P = 0,048$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom HPA in ihren Pseudozystensekreten band. Patienten deren Tumor kein HPA im Sekret der Pseudozysten band, besitzen ein deutlich höheres Risiko für die Bildung von Rezidiven (Abb. 12).

Statistische Analysen ergaben keinerlei prognostische Relevanz des HPA-Bindungsstatus im Pseudozystensekret bezüglich einer Metastasierung oder der Gesamtüberlebenszeit.

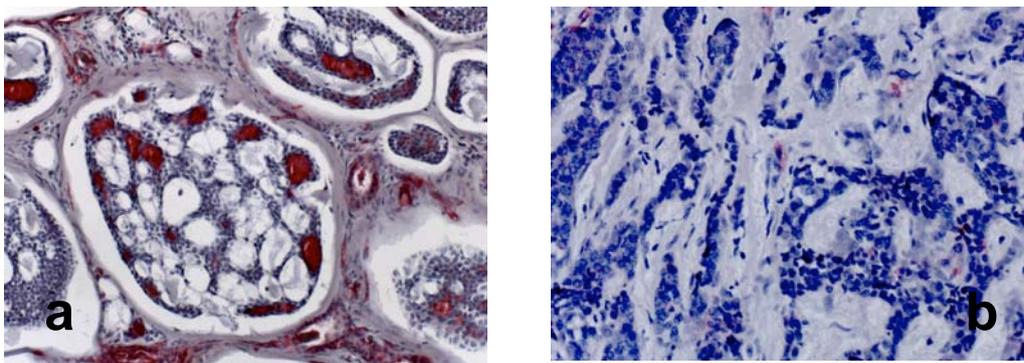


Abbildung 11: Lektin histochemische Färbungen mit dem Lektin HPA in biotinylierter Form an zwei verschiedenen Primärtumorschnitten des adenoid zystischen Karzinoms. Abbildung a zeigt eine intensive (+++) HPA-Bindung im Sekretes der Pseudozysten des Tumors, der Tumor an sich zeigt keine Expression. Der Tumor in Abbildung b zeigt keinerlei Expression. Vergrößerung 100-fach.

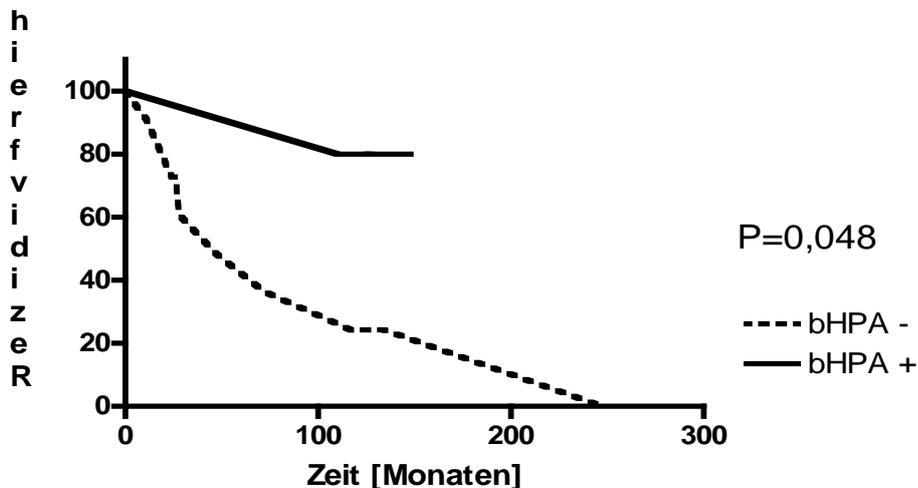


Abbildung 12: Kaplan-Meier Analysen für das Bindungsverhalten des HPA im Pseudozystensekret bezogen auf das rezidivfreie Intervall, ergaben signifikant ($P = 0,048$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom HPA in ihren Pseudozystensekreten band. Patienten deren Tumor kein HPA im Sekret der Pseudozysten band, besitzen ein deutlich höheres Rezidivierungsrisiko.

4.2.2.2. GNA

Von den untersuchten cribriformen Adenoid zystischen Karzinomen banden sechs Tumore GNA im Sekret ihrer Pseudozysten. Kaplan-Meier Analysen für das Bindungsverhalten von GNA bezogen auf das Überleben, zeigten eine signifikante Assoziation ($P = 0,039$) zwischen der GNA-Bindung und dem Überleben. Patienten, deren Tumorzellen GNA nicht banden, wiesen eine deutlich schlechtere Überlebensrate auf (Abb. 13).

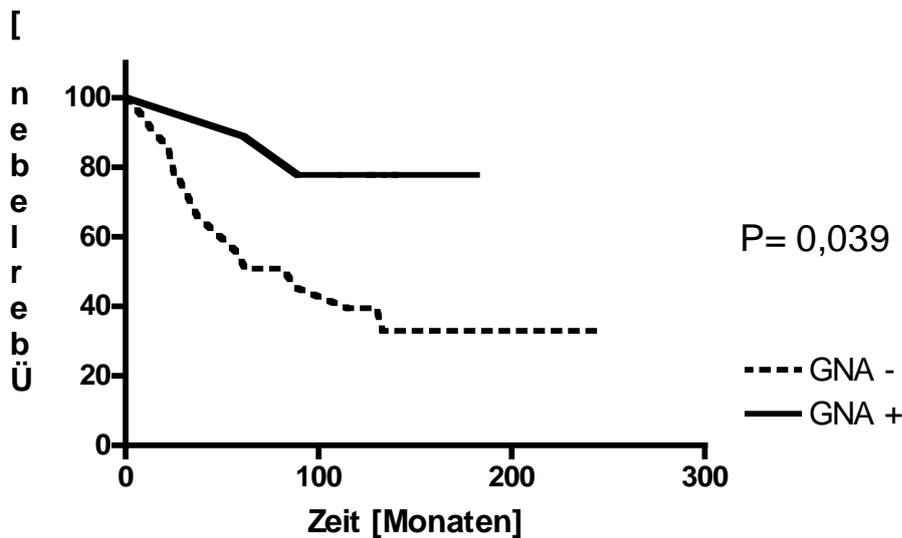


Abbildung 13: Die Kaplan-Meier Kurven für das Bindungsverhalten von GNA im Pseudozystensekret bezogen auf das Überlebensintervall, ergaben signifikant ($P = 0,039$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom GNA in ihren Pseudozystensekret banden. Patienten deren Tumor kein GNA im Sekret der Pseudozysten band, verstarben früher.

Kaplan-Meier Analysen für das Bindungsverhalten von GNA in Pseudozystensekret bezogen auf das metastasenfrem Intervall zeigten, dass wenn GNA im Sekret gebunden wurde, das metastasenfrem Intervall der Patienten größer war. Patienten deren Tumorzellen GNA nicht im Sekret ihrer Pseudozysten banden, wiesen häufiger Metastasen des adenoid zystischen Karzinoms auf (Abb. 13).

4.2.3. Immunhistochemische Auswertungen

4.2.3.1. CEACAM1

Von den untersuchten cribriformen adenoid zystische Karzinomen exprimierten neun der Tumore CEACAM1 im Sekret der Pseudozysten (Abb. 14). Kaplan-Meier Analysen für die Expression von CEACAM1 im Pseudozystensekret bezogen auf das Überleben zeigte eine prognostische Signifikanz zwischen CEACAM1-bindenden Tumoren und CEACAM1

nicht-bindenden Tumoren auf. Patienten, deren Sekret der Pseudozysten CEACAM1 exprimierte, zeigten ein signifikant ($P = 0,036$) besseres Überlebensintervall auf, Patienten, deren Sekret der Pseudozysten keinerlei CEACAM1 exprimierte, verstarben früher (Abb. 15).

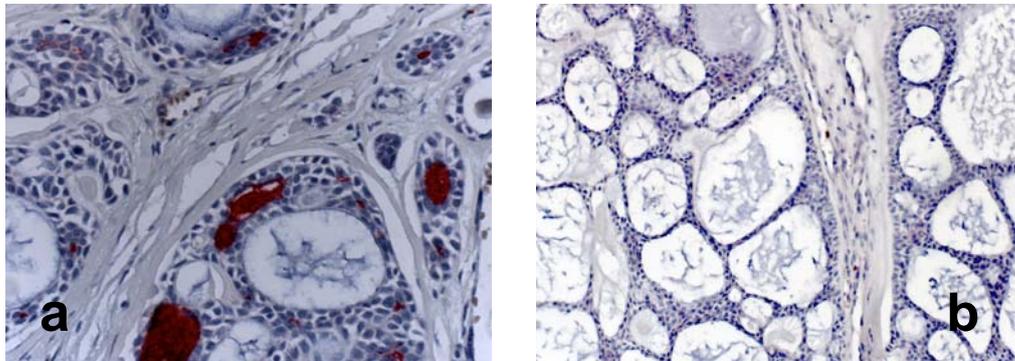


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 an zwei verschiedenen Tumorschnitten des Primärtumors vom adenoid zystischen Karzinom. Abbildung a weist eine intensive (+++) Expression des Tumorschleims in Pseudozysten auf, b hingegen zeigt einen Tumorschnitt, des cribriformen Subtypes welcher keinerlei Expression zeigt. Vergrößerung 50-fach.

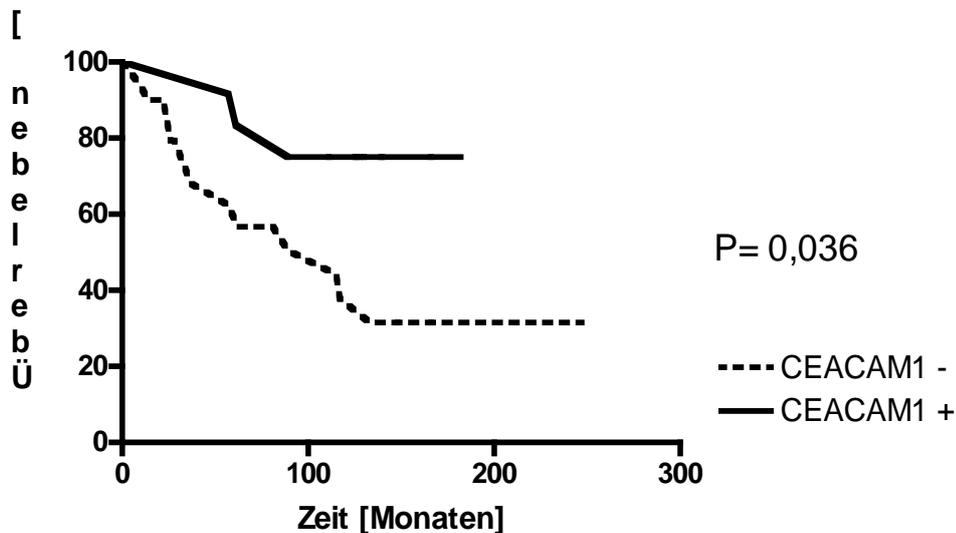


Abbildung 15: Kaplan-Meier Analysen für den Expressionsstatus des CAMs CEACAM1 im Pseudozystensekret bezogen auf das Überlebensintervall, ergaben signifikant ($P = 0,036$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom CEACAM1 exprimierte. Patienten, deren Tumor kein CEACAM1 im Sekret der Pseudozysten exprimierte, verstarben früher.

Kaplan-Meier Analysen für die CEACAM1 Expression im Sekret der Pseudozysten bezogen auf das Metastasierungsintervall, ergaben signifikante prognostische Übereinstimmungen ($P = 0,036$) von CEACAM1 Expression im Sekret und der Metastasierungsfreiheit des Patienten. Wurde CEACAM1 nicht in dem Pseudozystensekret der Tumore exprimiert, metastasierten die Patienten mit diesen

Tumoren deutlich häufiger als Patienten mit CEACAM1 exprimierten Pseudozystensekret (Abb. 16).

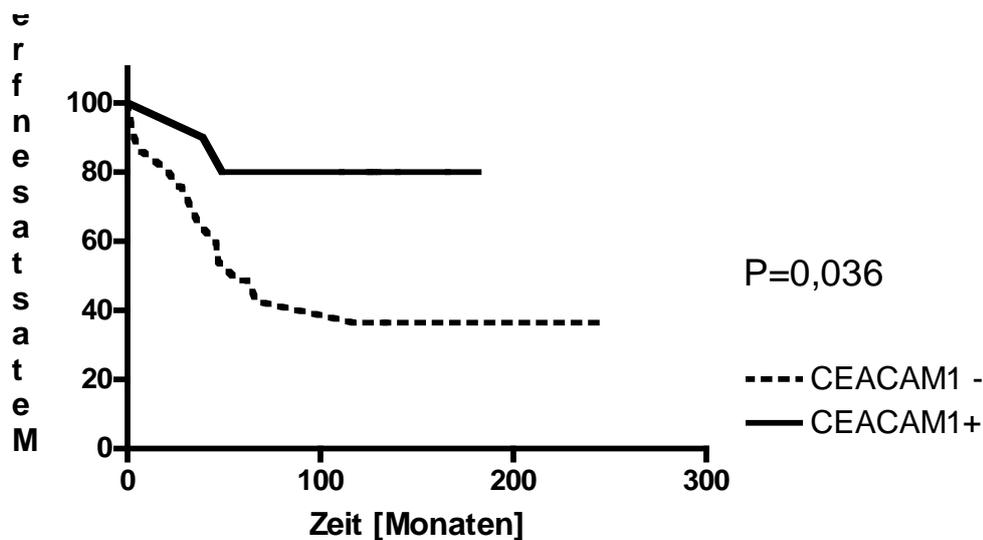


Abbildung 16: Kaplan-Meier Analysen für den Expressionsstatus von CEACAM1 im Pseudozystensekret bezogen auf das metastasenfreie Intervall, ergaben signifikant ($P = 0,036$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom CEACAM1 exprimiert. Patienten deren Tumor kein CEACAM1 im Pseudozystensekret exprimiert, besitzen ein deutlich höheres Metastasierungsrisiko.

Kaplan-Meier Analysen für die Expression von CEACAM1 in dem Sekret der Pseudozysten in Bezug auf rezidivfreies Überleben zeigte eine signifikante ($P = 0,015$) Assoziation zwischen der CEACAM1 Expression und einem rezidivfreiem Überleben. Wurde CEACAM1 in dem Sekret der Pseudozysten exprimiert, so wiesen diese Patienten ein signifikant geringeres Rezidivierungsintervall auf, als Patienten, deren Tumore keinerlei CEACAM1 Expression im Sekret ihrer Pseudozysten vorwiesen (Abb. 17).

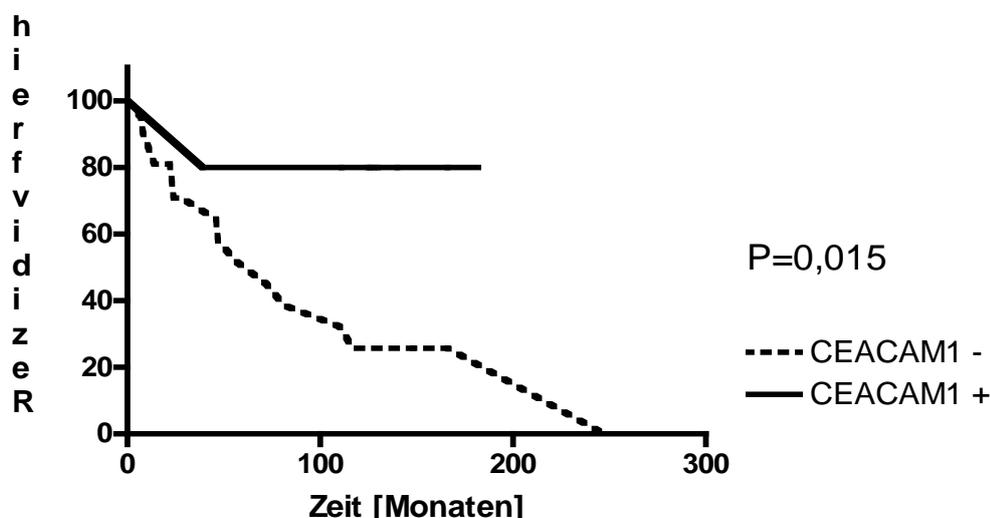


Abbildung 17 Die Kaplan-Meier Analysen für den Expressionsstatus von CEACAM1 im Pseudozystensekret bezogen auf das rezidivfreie Intervall, ergaben signifikant ($P = 0,015$) bessere Prognosen für Patienten, deren adenoid zystisches Karzinom CEACAM1 exprimiert. Patienten, deren ACC kein CEACAM1 im Pseudozystensekret exprimiert, besitzen ein deutlich höheres Rezidivierungsrisiko.

4.2.3.2. Brachyury

Von den untersuchten cribriformen Subtypen exprimierten fünf Brachyury. Kaplan-Meier Analysen für die Expression von Brachyury im Sekret der Pseudozysten, bezogen auf das Überleben ergaben keinerlei prognostisch signifikante Ergebnisse. Kaplan Meier Analysen in Bezug auf die Metastasierungsfreiheit zeigten prognostische Tendenzen ($P = 0,235$) für Brachyury-bindende Tumore auf. Wurde Brachyury im Sekret der Pseudozysten gefunden, so war das metastasenfremde Intervall der Patienten größer, als bei Patienten deren Tumorzellen Brachyury nicht im Sekret ihrer Pseudozysten exprimierten.

4.3. Lektinbindungsverhalten

4.3.1. HPA

Bei der direkten Färbemethode mit dem Lektin HPA (bHPA) wiesen sieben Tumore eine membranöse und zytoplasmatische Bindung auf. Davon waren fünf intensiv (+++) HPA-positiv und ein Fall wies eine HPA-Bindung bei über 80% der Tumorzellen auf (Abb. 18).

Bei der indirekten Färbemethode mit unkonjugiertem HPA (iHPA) wiesen 16 Tumore eine HPA-Bindung auf, wobei acht dieser Tumore eine intensive (+++) Bindung und sieben eine HPA-Bindung in über 80% ihrer Tumorzellen zeigten.

Kaplan-Meier Analysen für iHPA und bHPA zeigten keinerlei signifikante Assoziation zwischen der HPA-Bindung und der Überlebensrate (iHPA $P = 0,388$; bHPA $P = 0,992$), dem Auftreten von Metastasen (iHPA $P = 0,741$; bHPA $P = 0,675$) oder einem Rezidiv (iHPA $P = 0,768$; bHPA $P = 0,513$). Analysen bezogen auf die prozentuale Ausdehnung der Lektinbindungen innerhalb des Gesamttumors, ergaben ebenfalls keinerlei Unterschiede, bezüglich der Prognose der Patienten.

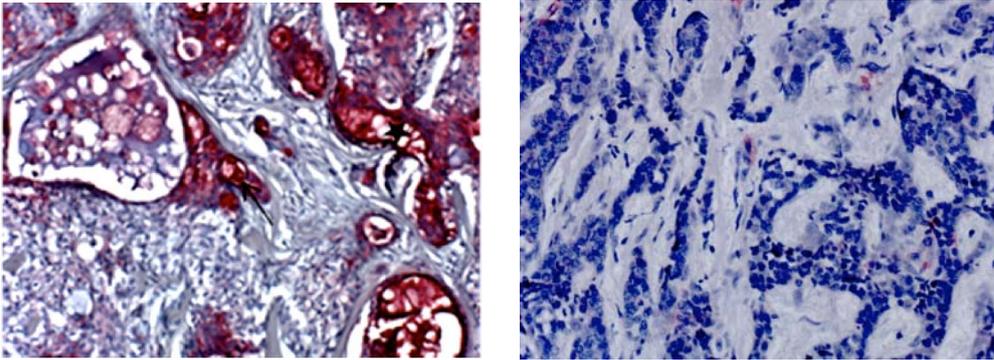


Abbildung 18: Lektin histochemische Färbungen mit dem Lektin HPA an zwei verschiedenen Primärtumoren des adenoid zystischen Karzinoms. Abbildung (a) zeigt eine starke (+++) HPA-Bindung an das Sekretes in den Pseudozysten des Tumors (*), einzelne Tumorzellklone zeigen ebenfalls eine intensive (+++) HPA- Bindung (Pfeile). Abbildung (b) zeigt einen HPA negativen Primärtumor. Vergrößerung 100-fach.

Zuckerhemmung der Lektinfärbung HPA

Zwei Tumore des adenoid zystischen Karzinoms banden das Lektin HPA, nachdem zuvor HPA in N-Azetylglukosamin-Lösung (GlucNac, Lösung I) inkubiert wurde (Abb.19 a, b). Bei Färbungen, mit zuvor in Lösung II (GalNac) (Abb. 19 c) beziehungsweise mit Lösung III (GalNac/GlucNac) inkubiertem HPA, zeigten sich keinerlei Bindung von HPA an Tumorzellen des adenoid zystischen Karzinoms (Abb.19 d).

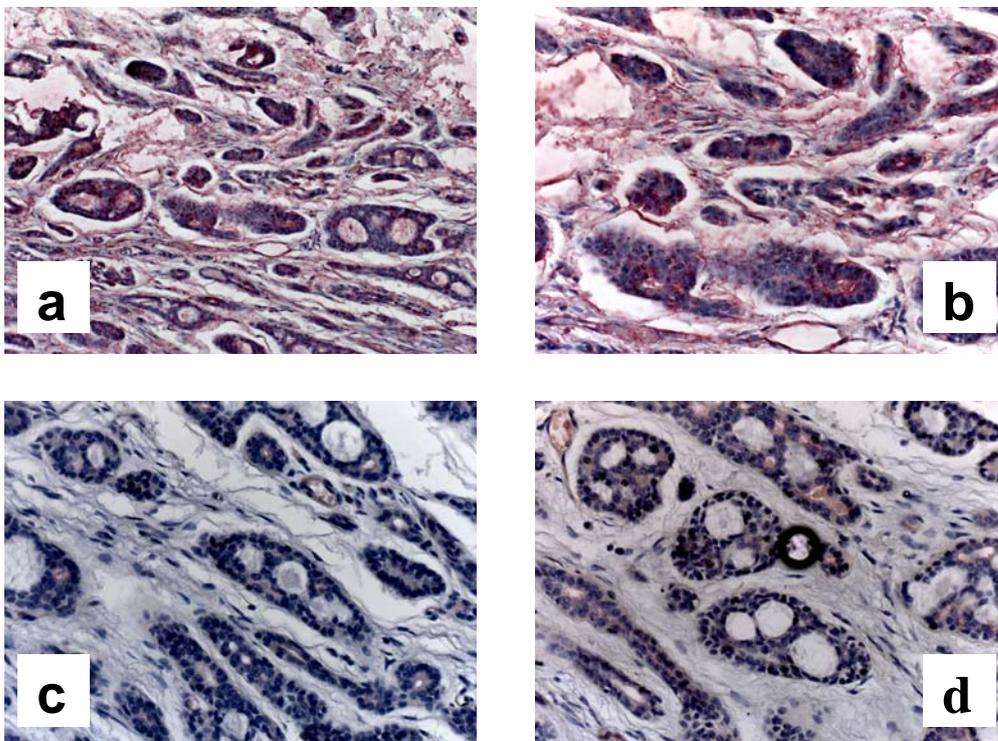


Abbildung 19: Nach Inkubation des HPA mit GlucNac, zeigte sich, in 2 von 34 Fällen eine mittlere bis intensive (++/+++) HPA-Bindung in den Tumorzellen (a,b). Durch die Präinkubation des HPA mit GalNac (c), sowie mit GalNac/GlucNac (d) wurde die HPA-Bindung spezifisch gehemmt. Der leicht rötliche Schleier ist auf Schleimpartikel zurückzuführen. Vergrößerungen 100-fach, (a) 50-fach.

4.3.2. PHA-L

Von den 34 Tumoren des adenoid zystischen Karzinoms banden 22 das Lektin PHA-L. Davon wiesen 10 der Tumoren eine intensive (+++) Bindung auf und 14 der Tumore banden PHA-L an über 80% ihrer Tumorzellen. Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des PHA-L-Bindungsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,962$), einer Metastasierung ($P = 0,228$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,935$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der PHA-L-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Lektinbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die PHA-L-Bindung keine prognostische Wertigkeit.

4.3.3. DBA

Sechs der untersuchten Tumore des adenoid zystischen Karzinoms banden das Lektin DBA, wovon fünf intensiv (+++) DBA positiv waren. Keiner der Tumore band DBA in mehr als 80% seiner Tumorzellen. Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des DBA-Bindungsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,462$), einer Metastasierung ($P = 0,685$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,484$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der DBA-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Lektinbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die DBA-Bindung keine prognostische Wertigkeit.

4.3.4. GNA

Das Lektin GNA wurde in den malignen Zellen von 31 der untersuchten Fälle gebunden. Davon zeigten 30 eine intensive (+++) GNA-Bindung auf, 20 der Tumore band GNA in über 80% seiner Tumorzellen.

Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des GNA-Bindungsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,503$), einer Metastasierung ($P = 0,484$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,426$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der GNA-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Lektinbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die GNA-Bindung keine prognostische Wertigkeit.

4.3.5. SNA-I

Von den untersuchten adenoid zystischen Karzinomen banden 14 der Tumore SNA-I. Hiervon wiesen 9 eine intensive (+++) SNA-I-Bindung auf, sieben der Tumore band SNA-I in über 80% ihrer Tumorzellen. Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des SNA-I-Bindungsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,682$), einer Metastasierung ($P = 0,291$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,488$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der SNA-I-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Lektinbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die SNA-I-Bindung keine prognostische Wertigkeit.

4.3.6. MAA

14 der untersuchten Tumore banden das Lektin MAA (Abb. 20). Davon wiesen drei eine intensive (+++) MAA-Bindung in ihren Tumorzellen auf, ebenfalls drei banden MAA in über 80% ihrer Tumorzellen. Kaplan-Meier Analysen bezogen auf die prozentuale Ausdehnung der MAA-positiven Tumorzellen an den Tumorzellen zeigten für Patienten mit MAA-positiven (MAA+) adenoid zystischen Karzinomen eine tendenziell schlechtere Überlebensrate ($P = 0,0556$) auf, als Patienten, deren Tumorzellen kein MAA (MAA-) banden (Abb. 21).

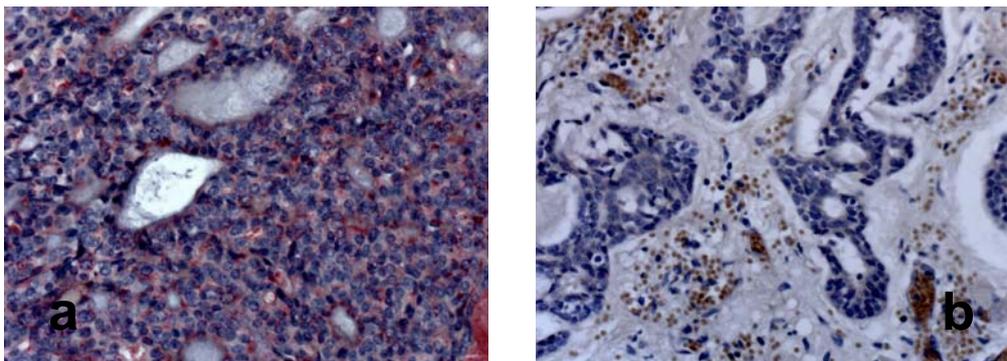


Abbildung 20: Lektin histochemische Färbungen an Primärtumorschnitten des adenoid zystischen Karzinoms mit dem Lektin MAA. Abbildung a zeigt eine mittlere bis intensive (+++/+++) zytoplasmatische und membranöse MAA-Bindung. Abbildung b zeigt ein MAA-negatives adenoid zystisches Karzinom. Vergrößerung 100-fach.

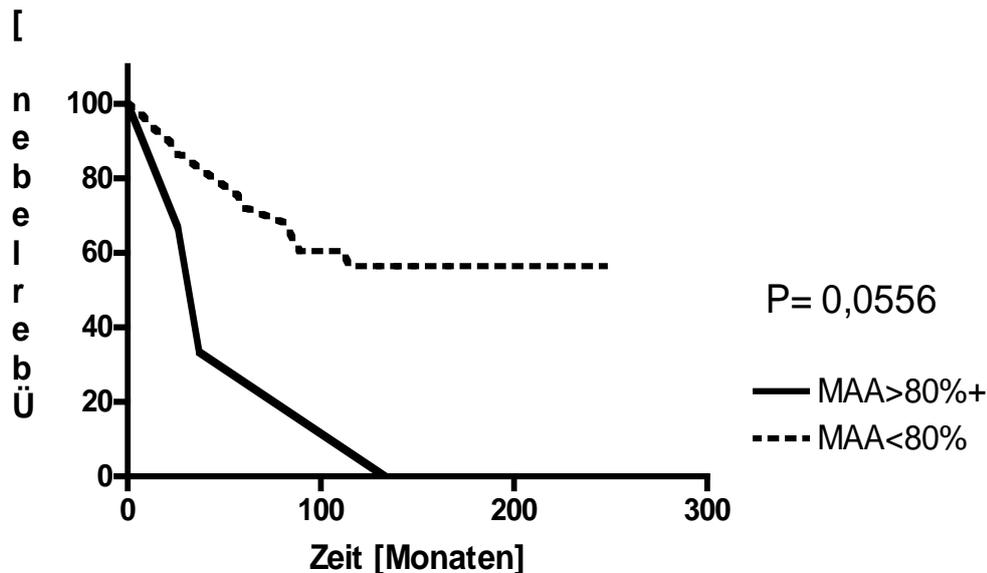


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurven für das Überlebensintervall von Patienten mit MAA positiven (MAA+) und MAA negativen (MAA-) adenoid zystischen Karzinomen bezogen auf den prozentualen Anteil der MAA-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen. Patienten, deren Tumorzellen das Lektin MAA in 80% ihren Tumorzellen banden, wiesen eine tendenziell schlechtere Überlebensrate auf ($P = 0,0556$), als Patienten mit Karzinomen, deren Tumorzellen MAA in weniger als 80% der Gesamttumormasse banden.

Keinerlei prognostische Relevanz des MAA-Bindungsstatus ergaben die statistischen Analysen bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,802$), einer Metastasierung ($P = 0,312$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,208$). Bei statistischen Analysen bezogen auf die Intensität (+++) der MAA-Lektinbindung zeigte sich keinerlei prognostische Wertigkeit.

4.4. Immunhistochemische Auswertungen

4.4.1. CD44

Von den untersuchten adenoid zystischen Karzinomen exprimierten 32 der Tumore CD44. Davon wiesen 12 Tumore eine intensive (+++) Expression der Tumorzellen auf, 12 Tumore exprimierten CD44 in über 80% ihrer Tumorzellen. Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des CD44-Expressionsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,752$), einer Metastasierung ($P = 0,513$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,529$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der CD44-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Zelladhäsionsbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die CD44-Expression keine prognostische Wertigkeit.

4.4.2. E-Selektinbindungsstellen

14 der untersuchten adenoid zystischen Karzinomen wiesen Bindungsstellen für E-Selektin auf. Hierbei wiesen 10 der Tumore eine intensive (+++) Expression auf und zwei der Tumore exprimierten E-Selektinbindungsstellen in mehr als 80% ihrer Tumorzellen. Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz der E-Selektinbindungsstellen bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,846$), einer Metastasierung ($P = 0,354$) oder der Gesamtüberlebenszeit ($P = 0,925$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der E-Selektinbindungsstellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Zelladhäsionsbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die E-Selektinbindungsstellen keine prognostische Wertigkeit.

4.4.3. P-Selektin - Bindungsstellen

Die Färbungen mit P-Selektin fielen negativ aus.

4.4.4. CEACAM1

Von den untersuchten Tumoren wurde CEACAM1 in den Tumorzellen von 25 adenoid zystischen Karzinomen exprimiert. Davon wiesen neun adenoid zystische Karzinome eine intensive (+++) Expression auf und sieben Tumore exprimierten CEACAM1 in über 80% ihrer Tumorzellen (Abb. 22). Die Analyse der CEACAM1 Expression bezogen auf das Überleben zeigte eine nicht signifikant schlechtere ($P = 0,1701$) Überlebensrate für Patienten auf, deren Tumore CEACAM1 exprimierten, als Patienten, deren Tumoren kein CEACAM1 exprimierten (Abb. 23).

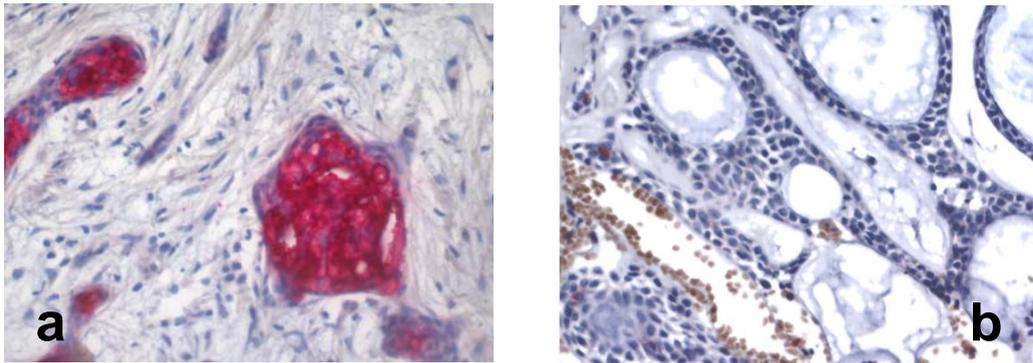


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbungen an Tumorschnitten primärer adenoid zystischer Karzinome. Abbildung a zeigt ein adenoid zystisches Karzinom, dessen Zellen CEACAM1 intensiv (+++) zytoplasmatisch als auch membranös exprimierten (Abb. a). Abbildung b zeigt ein adenoid zystisches Karzinom in dessen Zellen keinerlei CEACAM1 exprimiert wird. Vergrößerung 100-fach.

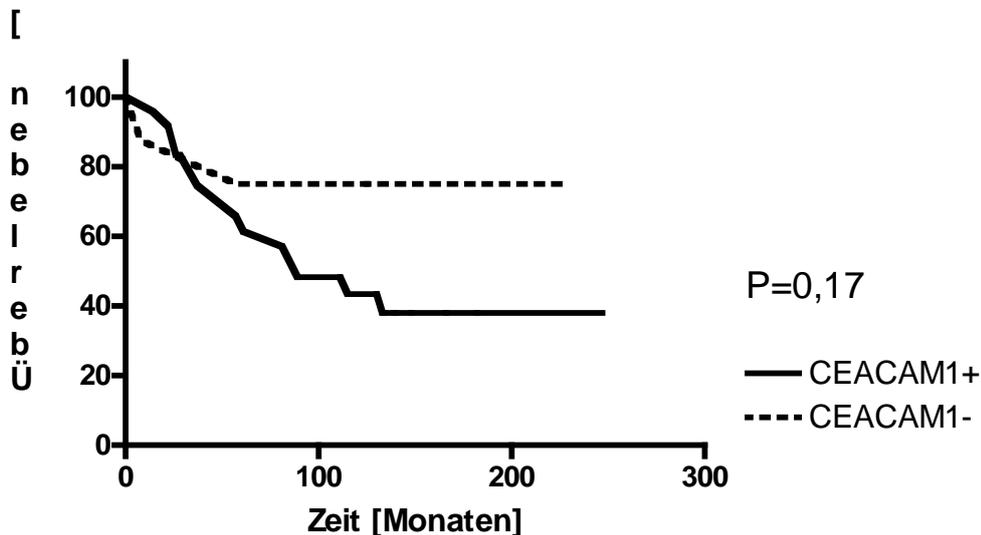


Abbildung 23: Kaplan-Meier Kurven für das Überlebensintervall von Patienten mit CEACAM1 positiven (CEACAM1+) und CEACAM1 negativen (CEACAM1-) adenoid zystischen Karzinomen. Patienten deren Tumore CEACAM1 exprimierten zeigten tendenziell ($P = 0,1701$) schlechtere Überlebensraten auf, als Patienten, deren Tumore CEACAM1 nicht exprimierten.

Analysen der CEACAM1 Expression bezogen auf das Metastasierungsintervall zeigten für Patienten, deren Tumorzellen CEACAM1 positiv waren ein tendenziell ($P = 0,0897$) höheres Metastasierungsrisiko auf, als Patienten, deren Tumore CEACAM1 nicht in ihren Zellen exprimierten (Abb. 24).

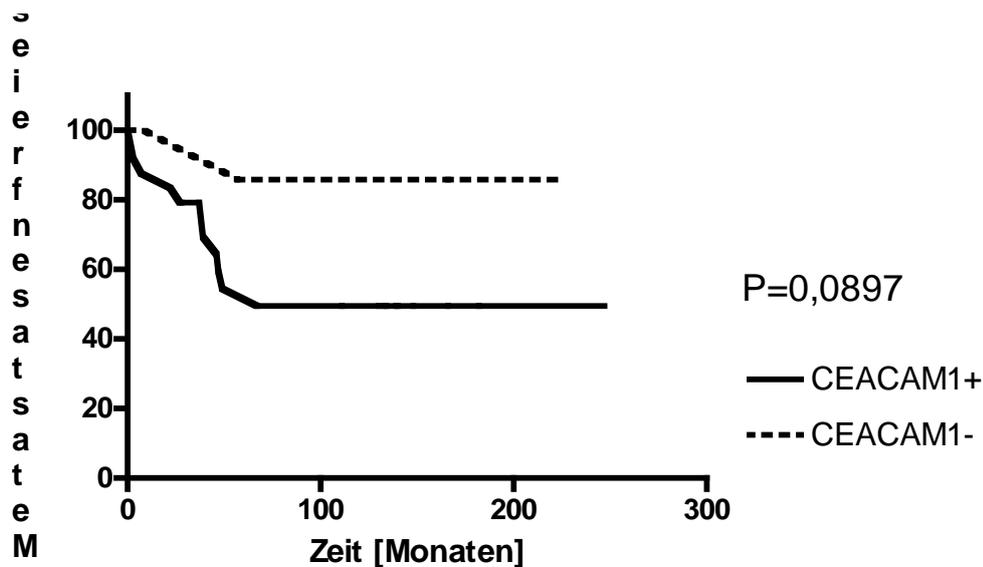


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für das metastasenfreie Überleben von Patienten mit adenoid zystischem Karzinom mit CEACAM1 positiven (CEACAM1+) und CEACAM1 negativen (CEACAM1-) Karzinomen. Tendenziell wiesen Patienten mit CEACAM1 exprimierenden Tumorzellen ein höheres Metastasierungsrisiko ($P = 0,0897$) auf, als Patienten, deren Karzinomzellen dieses Molekül nicht exprimierten.

Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des CEACAM1-Expressionsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,383$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der CEACAM1-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen oder die Intensität (+++) der Zelladhäsionsbindung in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die CEACAM1-Expression keine prognostische Wertigkeit.

4.4.5. L1

Von den untersuchten adenoid zystischen Karzinomen zeigten 30 eine L1 Expression auf. Davon wiesen drei Tumore eine intensive (+++) Expression auf und 16 Tumore exprimierten L1 in über 80% ihrer Tumorzellen (Abb. 25). Kaplan-Meier Analysen bezogen auf das Überleben zeigten signifikant ($P = 0,0217$) schlechtere Prognosen für Patienten, deren Tumore eine hohe (+++) Intensität der Zelladhäsionsbindung der L1-positiven Tumorzellen aufwiesen (Abb.26).

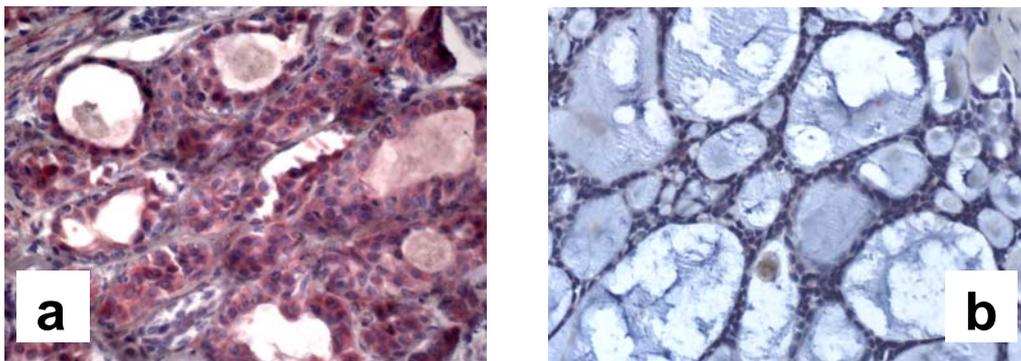


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbungen an Tumorschnitten des adenoid zystischen Karzinoms mit dem Zelladhäsionsmolekül L1. Einige Karzinome wiesen eine mittlere bis intensive (++/+++) Expression des Moleküls in ihren Tumorzellen auf (Abb. a), andere zeigten keine Expression (Abb. b). Vergrößerung 100-fach.

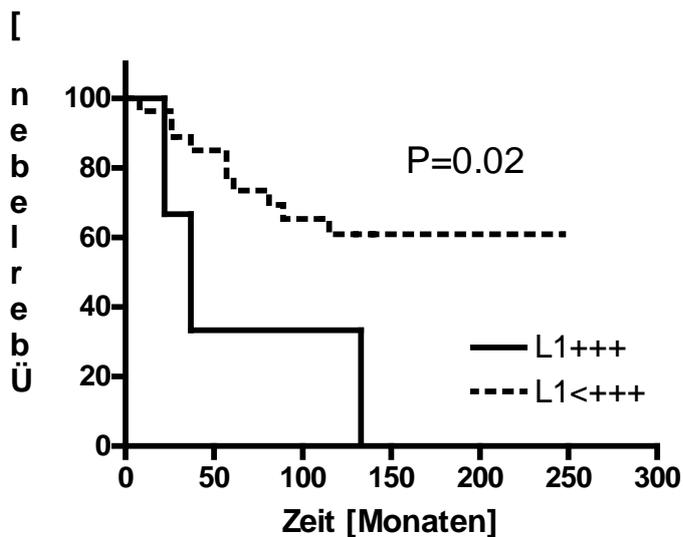


Abbildung 26: Kaplan-Meier Analyse für das Überlebensintervall des adenoid zystischen Karzinomes mit Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 (L1+) und nicht exprimiertem L1 (L1-). Patienten deren Tumore L1 exprimierten, zeigten tendenziell ($P = 0,02$) eine schlechtere Überlebensrate auf, als Patienten, deren Tumorzellen L1 nicht exprimierten.

Die statistische Analyse ergab keinerlei prognostische Relevanz des L1-Expressionsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs ($P = 0,286$), oder einer Metastasierung ($P = 0,147$). Auch wenn die prozentuale Ausdehnung der L1-positiven Tumorzellen an den Gesamttumorzellen in die Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich keinerlei prognostische Wertigkeit bezüglich Rezidivbildung und Metastasierung.

4.4.6. Brachyury

Alle adenoid zystischen Karzinome exprimierten Brachyury, wobei 24 der Tumore Brachyury intensiv (+++) und 19 Tumore Brachyury in mehr als 80% ihrer Tumorzellen exprimierten (Abb. 27). Kaplan-Meier Analysen bezogen auf das Auftreten eines Rezidivs zeigten signifikant ($P = 0,033$) schlechtere Prognosen für Patienten auf, deren Tumore eine prozentuale Ausdehnung der Brachyury-positiven Tumorzellen ($> 80\%$) aufwiesen (Abb. 28).

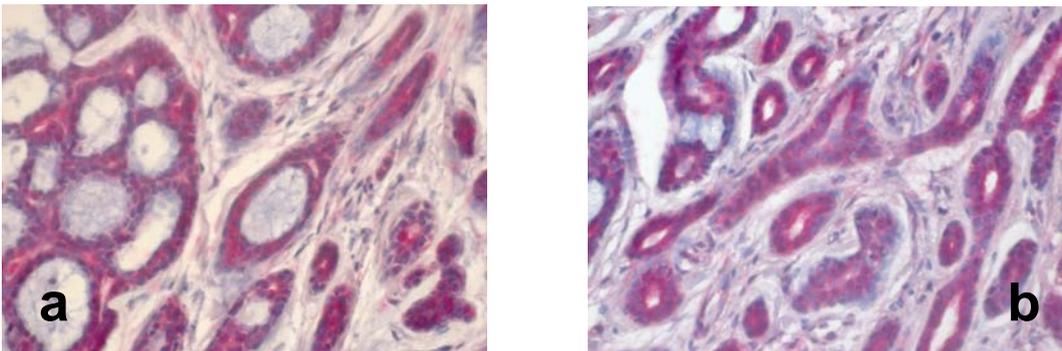


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbungen an Tumorschnitten des adenoid zystischen Karzinoms mit Brachyury. Abbildung A zeigt eine intensive (+++) Expression des Moleküls in den Tumorzellen auf (Originalvergrößerung 50-fach). In Abbildung B ist ebenfalls eine intensive (+++) Expression des Brachyury-Moleküls zu sehen. Vergrößerung 100-fach.

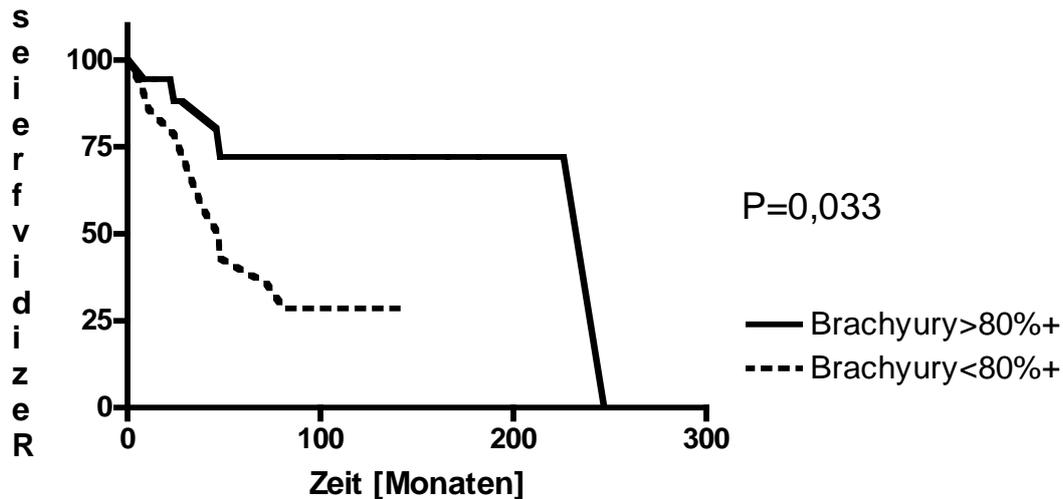


Abbildung 28: Kaplan-Meier Analyse für das rezidivfreie Überlebensintervall des adenoid zystischen Karzinoms bezogen auf die prozentuale Ausdehnung der Brachyury-positiven Tumorzellen (Brachyury+) zeigten eine signifikant ($P = 0,033$) schlechtere Prognose für Patienten, deren Tumore in über 80% der Tumorzellen der Gesamttumormasse Brachyury-positiv aufwiesen. Patienten deren Tumorzellen Brachyury in weniger als 80% der Tumorzellen exprimierten, zeigten eine bessere Prognose auf.

Statistische Analysen ergaben keinerlei prognostische Relevanz des Brachyury-Expressionsstatus bezüglich des Auftretens eines Rezidivs, einer Metastase oder der Gesamtüberlebenszeit. Analysen über die prozentuale Ausdehnung der Brachyury-positiven Tumorzellen ergaben bezogen auf das Auftreten einer Metastase oder der Gesamtüberlebenszeit, keinerlei prognostische Wertigkeit.

Wenn die Intensität (+++) der Zelladhäsionsbindung der Brachyury-positiven Tumorzellen in die statistischen Analysen mit einbezogen wurden, ergab sich für die Brachyury-Expression keinerlei prognostische Wertigkeit.

4.4. Korrelation der gefundenen Marker

Von 30 L1-positiven Tumoren, waren 14 gleichzeitig MAA-positiv. Die MAA-Bindung zeigte keine signifikante Korrelation ($P = 0,179$; $r = 0,174$) mit der L1-Expression (siehe Diskussion). Auch die weiteren Untersuchungen der Korrelationen der angewandten Marker, zeigten keine signifikanten Korrelationen auf.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, für das adenoid zystische Karzinom der großen Speicheldrüsen neue Marker zu identifizieren, die zum einen eine präzisere Abschätzung des Rezidiv- und Metastasierungsrisikos, unabhängig vom TNM-Stadium oder dem histologischen Subtyp, ermöglichen und zum anderen funktionell Aufschluss über die Mechanismen der Metastasierung geben könnten (sogenannte funktionelle Marker).

Histopathologisch wird das adenoid zystische Karzinom in drei unterschiedliche Subtypen unterteilt, da klinische Untersuchungen zeigten, dass der histologische Subtyp prognostische Aussagen zur Rezidivneigung und der Metastasierungstendenz des entsprechenden Tumors und darüber hinaus für das Gesamtüberleben des Patienten zulässt (Nakashima et al., 2006). Auch das klinische Vorgehen, die Radikalität der Operation, die Wahl einer Chemo- oder Strahlentherapie stützt sich weitgehend auf die histopathologische Klassifizierung des adenoid zystische Karzinoms (Brackrock et al., 2005). Der solide Typ weist die höchsten Rezidiv- und Metastasierungsraten auf, gefolgt vom cribriformen und tubulären Subtyp (Ellis und Auclair, 1996; Darling et al., 2002; Brackrock et al., 2005), wobei weltweit cribriforme adenoid zystische Karzinome am häufigsten vorkommen, solide adenoid zystische Karzinome am seltensten (Ellis und Auclair, 1996). Die hier untersuchten Fälle des adenoid zystische Karzinom spiegeln diesen Anteil der unterschiedlichen Subtypen mit 45,6% cribriformer 27,9% tubulärer und 26,5% solider Subtypen wider. Die Ergebnisse der Kaplan Meier Analysen für das Rezidivfreie Intervall, die Zeit bis zur Metastasierung und das Gesamtüberleben der Patienten für jeden der drei Subtypen ergaben, in Kongruenz zu den oben genannten Studien, dass der solide Subtyp die höchste Rezidiv- und Metastasierungsrate sowie das kürzeste Gesamtüberleben aufwies, gefolgt vom cribriformen - und tubulärem Subtyp. Somit wurde in der hier vorgelegten Untersuchung ein klinisch repräsentatives Patienten- und Untersuchungsgut analysiert.

5.1. Prognostische und funktionelle Relevanz von Glykokonjugaten

Um die Abschätzung des Rezidiv- und Metastasierungsrisikos des adenoid zystischen Karzinoms zu verbessern und Marker zu ermitteln, die zudem auch funktionell Aufschluss über die Mechanismen der Metastasierung des adenoid zystischen Karzinoms geben können, wurden immun- und lektin histochemische Färbungen mit bei anderen

Tumorentitäten klinisch etablierten Markern für eine Metastasierung durchgeführt (Thies et al., 2001, 2006, 2007; Laak et al., 2002; Kosanovic et al.; Nash et al., 2007; Allory et al., 2005; Kaifi et al., 2006; Kosma und Kosunen, 2007; Vujovic et al.; 2006). Der Expressionsstatus dieser Marker wurde anschließend anhand klinischer Daten auf eine Assoziation mit der Rezidivbildung und der Metastasierungsrate der entsprechenden Tumore und auf eine Assoziation mit der Länge des Gesamtüberlebens der Patienten analysiert.

5.2. Pseudozysten

Von 15 cribriformen adenoid zystischen Karzinomen bildeten 12 Pseudozysten aus, wie sie auch schon von Toida et al., (1985) und Gustafsson et al., (1986) beschrieben wurden. Cribriforme Tumoren, die Pseudozysten ausbildeten, wiesen eine bedeutend bessere Prognose bezüglich der Ausbildung von Rezidiven ($P = 0,003$), einer Metastasierung ($P = 0,009$) und längerem Überleben der betroffenen Patienten ($P = 0,004$) auf. Demnach scheint allein das Vorhandensein von Pseudozysten mit einer besseren Prognose einherzugehen. Betrachtet man dies aus tumorbiologischer Sicht, ist dies dadurch begründbar, dass diese Tumore aufgrund ihres höheren Differenzierungsgrades eine geringere Malignität aufweisen (Coyne et al., 2004).

Einige Pseudozysten produzierten Sekret, welches innerhalb des Lumens sichtbar war. Immun- und lektin histochemische Färbungen zeigten eine Expressionen von CEACAM1 und Brachyury, sowie Bindungen der Lektine HPA, GNA und MAA im Sekret dieser Pseudozysten, wobei in diesen Fällen die umgebenden Epithelzellen nicht angefärbt waren. Da nicht alle Pseudozysten die CEACAM1 und Brachyury exprimierten und die Lektine banden, lässt dies weitere Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumors zu. Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass das CEACAM1 im Pseudozystensekret exprimiert wurde. Dies ist besonders, da es sich bei CEACAM1 um ein glykosyliertes Membranmolekül handelt, welches bisher nur in der Zellmembran beschrieben wurde. Eine Ausschleusung von CEACAM1 aus der Zellmembran heraus bedarf daher vermutlich einer weiteren Differenzierung des Tumors und geht somit mit einer bedeutend geringeren Malignität einher. Die Kaplan Meier Analysen für die Expression von CEACAM1 bzw. das Bindungsverhalten der Lektine in dem Sekret der Pseudozysten wiesen eine signifikant geringere Rezidivrate (CEACAM1: $P = 0,02$; GNA: $P = 0,048$), ein längeres metastasenfreies Intervall (CEACAM1: $P = 0,04$; GNA: $P = 0,04$) und ein längeres Gesamtüberleben (CEACAM1: $P = 0,04$; GNA: $P = 0,04$) auf und

belegen somit die vorangegangenen Thesen.

Man könnte hierbei die Spezifität der Anfärbungen anzweifeln, so könnte es sich bei den Färbungen des Sekretes der Pseudozysten des adenoid zystischen Karzinoms um unspezifische Anfärbungen handeln, wie sie bei Nekrosen zu beobachten sind. Die Homogenität der Anfärbungen des Sekrets in den Pseudozysten spricht hierbei für eine spezifische Bindung, ebenso die strikte Lokalisation in den Lumina der Pseudozysten. Desweiteren spricht die gute Prognose der Patienten bezüglich längerer rezidiv- und metastasenfreier Intervalle und längerem Überleben bei Anfärbbarkeit des Sekrets gegen die These der unspezifischen Anfärbungen, da sonst alle Tumoren angefärbtes Sekret aufweisen würden. Da die cribriformen Tumore aufgrund höherer Differenzierung die jeweiligen Glykokonjugate selbst sezernieren kann man sie als Differenzierungsmerkmal ansehen.

Desweiteren kann die intensive Färbung des Sekrets der Pseudozysten dem Pathologen das Auffinden von Pseudozysten erleichtern und ihm nachfolgend in der Prognose spezifischere Abstufungen ermöglichen, welche für die Therapie des jeweiligen Patienten berücksichtigt werden kann.

5.3. Das Zelladhäsionsmolekül L1

Kaplan Meier Analysen zeigten, dass die intensivere (+++) Expression von L1 mit einem kürzeren Überleben assoziiert war. Hervorzuheben ist hierbei, dass in die Analysen Tumore aller drei histologischen Subtypen eingingen, was darauf hinweist, dass L1 ein unabhängiger vom histologischen Subtyp molekularer prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der Patienten mit einem adenoid zystischen Karzinom ist. Die L1 Expression war jedoch nicht, wie man erwarten würde, ebenfalls mit Metastasierung oder einer Rezidivbildung assoziiert. Dies mag anfangs widersprüchlich erscheinen, versterben doch bei vielen malignen Tumoren die Patienten an den Folgen einer Metastasierung und nicht an dem ursprünglichen Primärtumor (Laak et al., 2002; Thies et al., 2002 a, b). Das adenoid zystische Karzinom hingegen zeigt ein enorm aggressives Größenwachstum und wächst häufig entlang präformierter Strukturen wie Nerven und Blutgefäßen (Friedrich et al., 2003; Garden et al., 1995). Dieses aggressive Tumorstadium kann so zum Beispiel zu einer kompletten Ummauerung der Vena jugularis führen, welches zu Abflussstörungen im Drainagegebiet der Vena jugularis und nachfolgend zu dem Tod des Patienten führen kann. In diesem Zusammenhang sind ebenfalls sogenannte Sinus cavernosus Syndrome beschrieben worden, die nachfolgend

zu einer Schädigung von Hirnnerven führen, die durch den Sinus cavernosus hindurchziehen, wie zum Beispiel dem Nervus oculomotorius (Yamamoto et al., 1989). Häufig kann der Primärtumor des adenoid zystischen Karzinoms auch nicht komplett chirurgisch entfernt werden (R1), da das adenoid zystische Karzinom entlang von Nervenfasern (zum Beispiel entlang des durch die Glandula parotidea ziehenden, Nervus facialis) wächst (Friedrich et al., 2003; Garden et al., 1995) und eine radikale Exzision dieses Tumors zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität des Patienten führt, oder technisch kaum durchführbar ist. Dies erklärt, warum eine L1 Expression mit dem Versterben an den Folgen des adenoid zystischen Karzinoms assoziiert sein kann, ohne jedoch mit einer Metastasierung oder einer verstärkten Rezidivneigung assoziiert sein muss. Patienten, deren adenoid zystische Karzinome eine intensive L1 Expression aufweisen, haben demnach, unabhängig der Zuordnung zu einem bestimmten histologischen Subtyp, einen extrem aggressiv und destruktiv wachsenden Tumor, welches in der Therapieplanung berücksichtigt werden sollte.

Ein weiterer Grund dafür, dass keine Assoziation zwischen der L1 Expression und einer Metastasierung und/ oder Rezidivbildung gefunden wurde, könnte auch in der geringen Fallzahl liegen. Betrachtet man die Fallzahl der untersuchten adenoid zystischen Karzinome, mag 34 gering erscheinen. Beachten sollte man hierbei aber, dass adenoid zystische Karzinome selten vorkommen und in diese Arbeit nur Fälle einbezogen wurden, für die eine lückenlose Dokumentation der Krankenblätter vorlag. Verglichen mit internationalen Studien erweist sich die untersuchte Zahl von 34 Fällen als durchaus repräsentativ für die internationale Literatur; so reichen Studien über adenoid zystische Karzinome von einer Fallzahl von vier (Perez et al., 2005) bis hin zu 80 Patienten (Zhang et al., 2005). Durchschnittlich sind allerdings Patientenzahlen unter 30 die Regel (Triantafillidou et al., 2006; Vékony et al., 2007).

Um L1 allerdings zukünftig als Standardmarker zu etablieren, müssten prospektive Multicenterstudien mit größeren Kohorten durchgeführt werden. Neben seiner prognostischen Relevanz, könnte dem Zelladhäsionsmolekül L1 aber auch eine wichtige funktionelle Bedeutung für das Wachstum und die Ausbreitung des adenoid zystischen Karzinoms zukommen. Neben seiner Funktion als zellmembrangebundenes Adhäsionsmolekül kann L1 auch von der Zellmembran sezerniert und in der extrazellulären Matrix deponiert werden (Beer et al., 1999; Martini und Schachner, 1988). Das sezernierte L1 ist funktionsfähig und unterstützt die Migration (Beer et al. 1999). Hieraus lässt sich eine weitere mögliche Rolle von L1 als Matrix-Bestandteil ableiten.

Durch die Sekretion von L1 könnten die adenoid zystischen Karzinomzellen ihre extrazelluläre Umgebung modifizieren, was für eine L1- vermittelte Tumorzellmotilität von Bedeutung im Sinne einer destruktiven Ausbreitung des Primärtumors sein könnte.

Aufschluss darüber, dass Patienten am adenoid zystischen Karzinom verstarben ohne, wie man erwarten würde, Metastasen ausgebildet zu haben, vermag auch die besondere Art des Wachstums des adenoid zystischen Karzinoms entlang peripherer Nervfasern geben (Friedrich et al., 2003; Triantafillidou et al., 2006). Da periphere Nerven L1 exprimieren (Miyahara et al., 2001; Gast et al., 2005) könnte man postulieren, dass das perineurale Wachstum des adenoid zystischen Karzinoms über homophile Zell-zu-Zell Interaktionen zwischen L1-Molekülen der Tumorzellen und L1-Molekülen der Nervenfaser stattfindet. Somit dienen die peripheren Nervenbahnen den Tumorzellen als Leitschiene für ihr perineural fortschreitendes Wachstum, das durch homophile L1-L1-Kontakte entlang der präformierten Strukturen zu erklären ist. Starke L1- Expression ist demnach nicht nur ein Marker, der aggressiv-invasives Tumorstadium im adenoid zystischen Karzinom aufzeigt, sondern auch ein Indikator für perineurales Wachstum. Somit könnten mit Hilfe von L1-Färbungen Rückschlüsse auf die Malignität und die Ausbreitungsaktivität des adenoid zystischen Karzinoms gezogen werden, was die Radikalität einer Operation mitbestimmen könnte. Weiterführende Studien, in denen diese L1 Interaktionen weiter aufgeklärt werden, könnten möglicherweise L1 als Ansatzpunkt in der Therapie des adenoid zystischen Karzinoms etablieren. Da diese intensive L1 Expression ein im Sinne eines „gain of function“ zu verstehen ist, bietet dies attraktive Ansätze für neue Therapien.

L1 könnte zudem das Einwachsen von Tumorblutgefäßen in den Tumor fördern, indem weitere heterophile Kontakte zu L1 geknüpft werden, womit L1 Einfluss auf die Strukturierung und Versorgung des Tumors hätte. Da die enorme Größenzunahme des Tumors eine verstärkte Blutversorgung benötigt und auch das aggressiv-destruktive und invasive Wachstum des adenoid zystischen Karzinoms entlang präformierter Strukturen vermehrte Versorgung der Tumorzellen benötigt, könnte L1 auch hier eine wichtige Rolle spielen.

Das von L1 geförderte Einwachsen von Tumorblutgefäßen könnte außerdem in späteren Schritten des Metastasierungsprozesses Einfluss haben. Da für L1 zudem eine entscheidende funktionelle Beteiligung bei der Extravasation aus Gefäßen beschrieben wurde (Thies et al., 2002, 2007), könnte L1 eventuell auch in der Metastasierung des adenoid zystischen Karzinoms Einfluss haben. Die Ergebnisse zeigten zwar keine

Assoziation zwischen einer vermehrten L1-Expression und einer Metastasierung des adenoid zystischen Karzinoms, dies könnte allerdings auch an der Zahl von 35 Fällen liegen. Um zu überprüfen, ob die L1 Expression auch mit der Metastasierung assoziiert ist, müssten Studien mit größeren Kohorten durchgeführt werden.

L1 besitzt eine Siglec-Domäne, welche spezifisch α -2,3 Sialinsäuren bindet. Da das Lektin MAA ebenfalls spezifisch an diesen Zuckerrest bindet, wurde die MAA-Bindung in den adenoid zystischen Karzinomen analysiert, um zu überprüfen, ob die α -2,3 Sialinsäurereste als Bindungspartner für L1 fungieren könnten (Kleene et al., 2001). Da sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen MAA-Bindung und der L1-Expression zeigte, kann eine Adhäsion von L1 über die Siglecdomäne in den Primärtumoren ausgeschlossen werden.

Die Bindung von HPA an Zellen des adenoid zystischen Karzinoms wies keinerlei prognostische Signifikanz auf. Die HPA-Positivität (Bindung) war weder mit einer erhöhten Rezidivneigung, noch mit einer Metastasierung, noch mit dem Versterben assoziiert, wohingegen die HPA Positivität beim malignen Melanom, dem Kolonkarzinom und dem Mammakarzinom mit einer nachfolgenden Metastasierung oder dem Versterben der Patienten an den Folgen einer Metastasierung hochsignifikant assoziiert war (Thies et al., 2001, 2006; Schumacher et al., 1994; Leathem und Brooks et al., 1996). Auch die Auswertungen des Bindungsverhaltens der Lektine PHA-L, DBA, GNA, SNA-I und MAA und die der Expression der Zelladhäsionsmoleküle Brachyury, CD44, P- und E-Selektinbindungsstellen ergaben keinerlei prognostische Relevanz in Bezug auf Rezidivbildung, Metastasierung und dem Überleben. Auch die Expression von CEACAM1 war weder mit Metastasierung, noch mit Rezidivbildung noch mit Versterben assoziiert. Wohingegen bei anderen epithelialen Tumoren, wie beim Kolonkarzinom oder dem Ovarialkarzinom eine Herab- oder Dysregulation des CEACAM1 den metastatischen Phänotyp charakterisierte (Neumaier et al., 1993; Gast et al., 2005). Diese Befunde zeigen, dass die Kohlenhydratzusammensetzung der Glykokalix des metastatischen oder des rezidivierenden Phänotyps des adenoid zystischen Karzinoms sich von denen anderer Karzinome deutlich unterscheidet.

Umso erfreulicher ist die Tatsache, dass mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 ein spezifischer und vom Subtyp des adenoid zystischen Karzinoms unabhängiger, prognostischer Marker gefunden wurde, der in weiterführenden Studien neue Erkenntnisse über die Mechanismen des Wachstums, der Metastasierung und der Rezidivbildung des adenoid zystischen Karzinoms bringen könnte. L1 könnte zudem, da es funktionell am Wachstum

des adenoid zystischen Karzinoms beteiligt zu sein scheint, einen Ansatzpunkt in der zukünftigen Tumorthherapie darstellen.

6 Zusammenfassung

Das Adenoidzystische Karzinom (ACC) zeichnet sich durch ein stark invasives Wachstum, eine ausgeprägte Rezidivneigung und eine hohe Metastasierungsrate aus. Die histologische Unterteilung in drei Subtypen ist derzeit der einzige Indikator für den Malignitätsgrad des ACCs. Veränderungen in der Glykosylierung von Zellmembranproteinen und in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) spielen bei anderen Tumoren eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung. Ziel dieser Arbeit war es, neue prognostische Marker für das ACC zu identifizieren, die gleichzeitig Aufschluss über die molekularen Mechanismen des Tumorwachstums und der Metastasierung des ACCs geben könnten.

An 35 primären ACCs unterschiedlichen histologischen Subtyps (tubulär, cribriform, solide) wurden terminale Kohlenhydrate anhand der Bindung von sechs Lektinen mit unterschiedlicher Kohlenhydratspezifität (DBA, GNA, HPA, MAA, PHA-L, SNA-I) und das Expressionsprofil der CAMs CEACAM1, L1, CD44, sowie Brachyury, P- und E-Selektin analysiert. Diese Parameter wurden mittels klinischer Daten (Nachbeobachtungszeitraum bis zu 11 Jahre) mit dem rezidivfreien Intervall, dem metastasenfreien Intervall, sowie dem Gesamtüberleben korreliert.

Kaplan-Meier Analysen ergaben eine signifikant positive Assoziation zwischen einer starken (+++) L1 Expression ($P = 0,02$), sowie einer ausgeprägten MAA-Bindung ($>80\%$ der Tumorzellen; $P = 0,05$) und dem Versterben am ACC, unabhängig vom histologischen Subtyp. Prognostische Marker für eine Metastasierung oder eine Rezidivbildung wurden nicht gefunden. Zwölf der 16 cribriformen ACCs bildeten Pseudozysten aus, deren Sekret, im Gegensatz zu normalem Drüsensekret, eine intensive (+++) CEACAM1 Expression, sowie intensive (+++) HPA und GNA-Bindungen aufzeigte. Tumore, die Pseudozysten ausbildeten, wiesen eine signifikant geringere Rezidivneigung ($P = 0,0003$) und eine geringere Metastasierungsrate ($P = 0,009$) auf und die betroffenen Patienten überlebten signifikant länger ($P = 0,004$). Die CEACAM1 Expression oder die GNA-Bindung im Sekret der Pseudozysten war darüber hinaus mit einer geringeren Rezidivrate (CEACAM1: $P = 0,02$; GNA: $P = 0,048$), einem längeren metastasenfreien Intervall ($P = 0,04$ bzw. $P = 0,04$) und Gesamtüberleben ($P = 0,04$ bzw. $P = 0,04$) assoziiert.

Zusammenfassend ist die sehr starke L1 Expression ein unabhängiger Marker für aggressives Wachstum des ACCs, welches eine fatale Prognose bedingt. L1 scheint funktionell am Wachstum des ACCs beteiligt zu sein und könnte somit einen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien darstellen.

7 Literaturverzeichnis

Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005) The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11: 1190-1197

Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C, Löning T (1998) Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol* 152: 1401-1406

Bamberger AM, Sudahl S, Löhning T, Wagener C, Bamberger C, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A (1999) The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 156: 1165-1170

Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112:2667-2675

Blaess S, Kammerer RA, Hall H (1998) Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5 beta1 integrins. *J Neurochem* 71: 2615-2625

Boyd WC, Shapleigh E (1954) Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of plant agglutinin (lectin). *Blood* 9: 1195-1198

Brackrock S, Krüll A, Röser K, Schwarz R, Riethdorf L, Alberti W (2005) Neutron therapy, prognostic factors, and differentiation of adenoid cystic carcinomas (ACC) of salivary glands. *Anticancer Res* 25: 1321-1326

Brooks SA, Lymboura M, Schumacher U, Leathem AJ (1996) Histochemistry to detect Helix pomatia lectin binding in breast cancer: Methodology makes a difference. *J Histochem Cytochem* 44: 519-524

Brooks SA, Carter TM, Royle L, Harvey DJ, Fry SA, Kinch C, Dwek RA, Rudd PM (2008) Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumor strategies. *Anticancer Agents Med Chem* 8: 2-21

Busch C, Wagener C, Öbrink B (2002) The downregulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with malignancy grade in the Gleason 3 to 4 transition. *Hum Pathol* 33: 290-298

Chen S, Mantei N, Dong L, Schachner M (1999) Prevention of neural cell death by neural cell adhesion molecule L1 and CHL 1. *J Neurobiol* 38:428-439

Chen AM, Bucci MK, Weinberg V, Garcia J, Quivey JM, Schechter NR, Phillips TL, Fu KK, Eisele DW (2006) Adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated by surgery with or without postoperative radiation therapy: Prognostic features of recurrence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66: 152-159

Chovanec M, Plzak J, Betka J, Brabec J, Kodet R, Smetana K Jr. (2004) Comparative analysis of alpha 2,3/2,6-linked N-acetylneuraminic acid and cytokeratin expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 12: 297-301

Coyne JD, Dervan PA, Barr L (2004) High-grade carcinomas of the breast showing patterns of mixed ductal and myoepithelial differentiation (including myoepithelial cell-rich carcinoma of the breast). *Histopathol* 44: 580-584

Da Cruz Perez DE, Pires FR, Lopes MA, de Almeida OP, Kowalski LP (2006) Adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of the maxillary sinus: report of a 44-year experience of 25 cases from a single institution. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 1592-1597

D'Alessandro JS, Yetz-Aldape J, Wang EA (1994) Bone morphogenetic proteins induce differentiation in astrocyte lineage cells. *Growth Fact* 11: 53-69

Darling MR, Schneider JW, Phillips VM (2002) Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: a review and comparison of immunohistochemical markers. *Oral Oncol* 38: 641-645

Douglas JG, Laramore GE, Austin-Symour M, Koh W, Stelzer K, Griffin TW (2000) Treatment of locally advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck with neutron radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Phys* 46: 551-557

Dwek MV, Ross HA, Streets AJ, Brooks SA, Adam E, Titcomb A, Woodside JV, Schumacher U, Leathem AJ (2001) Helix pomatia agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int J Cancer* 95: 79-85

Ebrahimnejad A, Flayeh R, Unteregger G, Wagener C, Brümmer J (2000) Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 260: 365-373

Ellis GL, Anclair PL (1996) Malignant epithelial tumors. In: Ellis GL (ed) *Tumors of the salivary glands*. In: Ellis GL (ed), Fascicle 17, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology (Atlas of tumor pathology pp 204-216)

Engers R, Gabbert HE (1998) Basic mechanisms of metastasizing. *Fundamental of tumor biology and clinical implications*. *Onkologe* 4: 682-688

Ergün S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach J-H, Horst A, Weil J, Fernando F, Wagener C (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5: 311-320

Fernandes B, Sagman U, Auger M, Demitrio M, Dennis JW (1991) β 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res* 51: 718-723

Ferrazzo KL, Alves SM Jr, Santos E, Martins MT, de Sousa SM (2007) Galectin-3 immunoprofile in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands. *Oral Oncol* 43: 580-585

Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A (1999) Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 149-152

Friedrich RE, Bleckmann (2003) Adenoid cystic carcinoma of salivary and lacrimal gland origin: localisation, classification, clinical pathological correlation, treatment results and long term follow-up control in 84 patients. *Anticancer Res* 23: 931-940

Garden AS, Weber RS, Morrison WH, Ang KK, Peters LJ (1995) The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 619-626

Gast D, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, Issa Y, Stoeck A, Fogel M, Jaumaa S, Wenger T, Herr I, Gutwein P, Altevogt P (2005) L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 115: 658-665

Grumet M, Edelman GM (1988) Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J Cell Biol* 106: 487-503

Grumet M, Friedlander DR, Edelman GM (1993) Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun* 1: 177-190

Gurney TA, Eisele DW, Weinberg V, Shin E, Lee N (2005) Adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands treated with surgery and radiation. *Laryngoscope* 115: 1278-1282

Gustafsson H, Carlsoo B, Kjorell U, Thornell LE (1986) Immunohistochemical and ultrastructural observations on adenoid cystic carcinoma of salivary glands. With special reference to intermediate filaments and proteoglycan particles. *Acta Otolaryngol* 102: 152-160

Hanenberg H, Baumann M, Quentin I, Nagel G, Grosse-Wilde H, von Kleist S, Göbel U, Burdach S, Grunert F (1994) Expression of the CEA gene family members NCA50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cells of the B-cell origin. *Leukemia* 8: 2127-2133

Hart IR, Goode T, Wilson GR (1989) Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochem Biophys Acta* 989: 65-84

Hart IR, Saini A (1992) Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339: 1453-1461

Haspel J, Friedlander DR, Ivgy-May N, Chickramane S, Roonprapunt C, Chen S, Schachner M, Grumet M (2000) Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM. *J Neurobiol* 42: 287-302

Hill A, Mc Farlane S, Mulligan K, Gillespie H, Draffin JE, Trimble A, Ouhtit A, Johnston PG, Harkin DP, McCormick D, Waugh DJ (2006) Cortactin unpins CD44-promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene* 25: 6079-6091

Hrdlickova-Cela E, Plzak J, Holikova Z, Dvorankova B, Smenana K Jr. (2001) Postmitotic basal cells in squamous cell epithelia are identified with Dolichios biflorus agglutinin-functional consequences. *APMIS* 109: 714-720

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1980) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 5: 734-738

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580

Huber PE, Debus J, Latz D, Zierhut D, Bischof M, Wannemacher M, Engenhardt-Cabillic R (2001) Radiotherapy for advanced adenoid cystic carcinoma: neutrons, photons or mixed beam? *Radiother Oncol* 59: 161-167

Ikeda Y, Mori M, Adachi Y, Matsushima T, Sugimachi K (1994) Prognostic value of the histochemical expression of Helix pomatia agglutinin in advanced colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 37: 181-184

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N (1999) *Cis*-determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18: 5563-5572

Kaifi JT, Zinnkann U, Yekebas EF, Schurr PG, Reichelt U, Wachowiak R, Fiegel HC, Petri S, Schachner M, Izbicki JR (2006) L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma. *World J Gastroenterol* 12: 94-98

Takeji Y, Tsujitani S, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K (1991) Helix pomatia binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. *Cancer* 68: 2438-2442

Kammerer R, Hahn S, Singer B, Luo JS, von Kleist S (1998) Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur J Immunol* 28: 3664-3674

Kaplan EL, Meier P (1958) A non-parametric estimate from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-480

Kawano T, Yanoma S, Nakumara Y, Ozeke A, Kokatsu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M (2005) Soluble CD44 standard, CD44 variant 5, and CD44 variant 6 and their relation to staging in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 125: 392-397

Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, Shiono O, Kokatu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M (2005) Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 26: 308-313

Khafif A, Anavi Y, Haviv J, Fienmesser R, Calderon S, Marshak G (2005) Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a 20-year review with long term follow up. *Ear Nose Throat J* 84: 664-667

Kispert A, Hermann BG (1993) The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12: 4898-4899

Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001) The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276: 21656-21663

Ko YH, Lee MA, Hong YS, Lee KS, Jung CK, Kim YS, Sun DI, Kim BS, Kim MS, Kang JH (2007) Prognostic factors affecting the clinical outcome of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Jpn J Clin Oncol* 37: 805-811

Kokemueller H, Eckhart A, Brachvogel P, Hausamen JE (2004) Adenoid cystic carcinoma of the head and neck - a 20years experience. *Int J Oral Maxofac Surg* 33: 25-31

Kosanovic MM, Jankovic MM (2005) Sialylation and fucosylation of cancer-associated prostate specific antigen. *J BUON* 10: 247-250

Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K, Pukkila M, Kellokoski J, Virtanieme J, Sironen R, Juhola M, Kumpulainen E, Johansson R, Nuutinen J, Kosma VM (2007) CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 43: 51-59

Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992) Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22: 1199-1205

Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirrmacher V, Altevogt P (1993) Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 11: 419-429

Kujat R, Miragall F, Krause D, Dermietzel R, Wrobel KH (1995) Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. *Histochem Cell Biol* 103: 311-321

Kulamarva G, Wilbourn M, Anand R, Mourouzis C, Spedding AV, Brennan PA (2007) Metastasising chordoma to the mandible from a rare vertebral site: the first reported case. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104: 240-242

Kumamoto M, Kuratomi Y, Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Inokuchi A (2006) Expression of laminin 5 basement membrane components in invading and recurring adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 33: 167-172

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Hossfeld DK, Schumacher U (2002) - a Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung. Helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. *Am J Pathol* 160: 1001-1008

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Brümmer J, Schumacher U, Hossfeld DK (2002) - b Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: A factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 20: 4279-4284

Leathem AJ, Brooks SA (1987) Predictive value of lectin binding on breast cancer recurrence and survival. *Lancet* 1: 1054-1056

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

Liu J, Jiang G (2006) CD44 and hematologic malignancies. *Cell Mol Immunol* 3: 359-365

Locati LD, Guzzo M, Bossi P, Massone PP, Conti B, Fumagalli E, Bareggi C, Cantu G, Licitra L (2005) Lung metastasectomy in adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary gland. *Oral Oncol* 41: 890-894

Luo W, Tapolsky M, Earley K, Wood CG, Wilson DR, Logothetis CJ, Lin SH (1999) Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 6: 313-321

Martini R (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23: 1-28

Martini R, Schachner, M (1988) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106: 1735-1746

Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T (2002) Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer* 86: 161-167

Miyake H, Hara I, Okamoto I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Saya H, Kamidono S (1998) Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates prostate cancer development. *J Urol* 160: 1562-1566

Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresh DA, Hancock, JD, Zhao X, Reisfeld RA (1996) Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132: 475-485

Moos M, Tacke R, Scheerer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703

Murayama T, Zuber C, Seelentag WK, Li WP, Kemmer W, Heitz PU, Roth J (1997) Colon carcinoma glycoproteins carrying alpha 2,6-linked sialic acid reactive with Sambucus nigra agglutinin are not consecutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen. *Int J Cancer* 70: 575-581

Nakashima D, Uzawa K, Kasamatsu A, Koike H, Endo Y, Saito K, Hashitani S, Numata T, Urade M, Tanzawa H (2006) Protein expression profiling identifies maspin and stathmin as potential biomarkers of adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Int J Cancer* 118: 704-713

Nash R, Neves L, Faast R, Pierce M, Dalton S (2007) The lectin DBA recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells* 25: 974-982

Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C. (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10744-10748

Ohyama C, Hosono M, Nitta K, Oh-eda M, Yoshikawa K, Habuchi T, Arai Y, Fukuda M (2004) Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy. *Glycobiology* 14: 671-679

Pamir MN, Ozduman K (2006) Analysis of radiological features relative to histopathology in 42 skull-base chordomas and chondrosarcomas. *Eur J Radiol* 58: 461-470

Perez DE, Pires FR, Alves Fde A, Almeida PO, Kowalski LP (2005) Sublingual salivary gland tumors: clinicopathologic study of six cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Pral Radiol Endod* 100: 449-453

Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T, Wagener C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44: 35-41

Preisegger KH, Beham A, Kopp S, Jessernigg G, Gugl A, Strammberger H (2001) Prognostic impact of molecular analyses in adenoid cystic carcinomas of the salivary gland. *Onkologie* 24: 273-277

Prokopakis EP, Snyderman CH, Hanna EY (1999) Risk factors for local recurrence of adenoid cystic carcinoma: The role of postoperative radiotherapy. *Am J Otolaryngol* 20: 281-286

Pusztai A (1991) *Plant lectins*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 105-199

Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J* 3: 1-10

Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C, Löning T (1997) Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland. *J Histochem Cytochem* 45: 957-963

Sadekova S, Lamarche-Vane N, Li X, Beauchemin N (2000) The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol Biol Cell* 11: 65-77

Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, Haberer T, Jakel O, Karger C, Scholz M, Kraft G, Wannemacher M, Debus J (2003) Carbon ion radiotherapy for chordomas and low-grade chondrosarcomas of the skull base. Results in 67 patients. *Strahlenther Onkol* 179: 598-605

Schumacher U, Higgs D, Loizidou M, Pickering R, Leathem A, Taylor I (1994) Helix pomatia agglutinin binding is a useful prognostic indicator in colorectal carcinoma. *Cancer* 74: 3104-3107

Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leathem AJ (1995) Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *J Histochem Cytochem* 43: 275-281

Schumacher U, Mohamed M, Mitchell BS. (1996) Differential expression of carbohydrate residues in human breast and colon cancer cell lines grown in vitro and in vivo in SCID mice. *Cancer* 9: 47-253

Schumacher U, Adam E (1997) Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J* 29: 677-684

Seifert G (1997) Diagnosis and prognosis of salivary gland tumors. An interpretation of new revised WHO classification. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1: 252-267

Sequeiros Santiago G, Rodrigo Tapia JP, Llorente Pendas JL, Suarez Nieto C (2005) Prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Acta Orthorinolaringol Esp* 56: 361-367

Shirashi T, Atsumi S, Yatani R (1992) Comparative study of prostatic carcinoma bone metastasis among Japanese in Japan and Japanese Americans and Whites in Hawaii. *Adv Exp Med Biol* 324: 7-16

Silbernagel S, Despopoulos A (2003) Grundlagen, Zellphysiologie In: Silbernagel, S, Despopoulos, A (Hrsg) Taschenatlas der Physiologie. Thieme, Stuttgart New York (6. korrigierte Auflage S 14)

Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U (2001) Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J Cancer* 84: 819-823

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002) – a Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38: 1708-1716

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brummer J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002) - b CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 20: 2530-2536

Thies A, Berlin A, Brunner G, Schulze HJ, Moll I, Pfüller U, Wagener C, Schachner M, Altevogt P, Schumacher U (2007) Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: Implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett* 248: 68-80

Thompson JA, Grunert, F, Zimmermann, W (1991) Carcinoembryonic gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5: 344-366

Thor G, Probstmeier R, Schachner M (1987) Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J* 6: 2581-2586

Tincani AJ, Del Negro A, Araujo PP, Akashi HK, Martins AS, Altemani AM, Barreto G (2006) Management of salivary gland adenoid cystic carcinoma: institutional experience of a case series. *Sao Paulo Med J* 124: 26-30

Toida M, Takeuchi J, Sobue M, Tsukidate K, Akao S, Fukatsu T, Nakashima N (1985) Histochemical studies on pseudocysts in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *Histochem J* 17: 913-924

Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D (2006) Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *Oral Maxillofac Surg* 64: 1114-1120

Teymoortash A, Pientka A, Schrader C, Tiemann M, Werner JA (2006) Expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck and its relationship with distant metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 51-56

Umeda M, Nishimatsu N, Yokoo S (2000) The role of radiotherapy for patients with adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Oral Med Oral Surg Pathol Oral Radiol Endod* 89: 724-729

Vékony H, Ylstra B, Wilting SM, Meijer GA, van de Wiel MA, Leemans CR, van der Waal I, Bloemena E (2007) DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 3133-3139

Vujovic S, Henderson S, Presneau N, Odell E, Jaques TS, Tirabosco R, Boshoff C, Flanagan AM (2006) Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *J Pathol* 209: 157-165

Wagener C (1999) Maligne Progression. In: Wagener,C (Hrsg) *Molekulare Onkologie*. Thieme, Stuttgart New York (2. Auflage S 220-241)

Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F (2005) a – Einleitung, b - Kopf und Halstumoren In: Wittekind, Ch , Meyer, HJ, Bootz, F (Hrsg) *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Springer, Berlin Heidelberg New York (6. Auflage a, S 9-15, b, S 45-48)

Yamaguchi H, Niimi T, Kitagawa Y, Miki K (1999) Brachyury T expression in embryonal carcinoma P19 cells resembles its expression in primitive streak and tail-bud but not that in notochord. *Develop Growth Diff* 41: 253-264

Yamamoto T, Imai T (1989) Adenoid cystic carcinoma presenting as cavernous sinus syndrome: a clinico-pathological study of two cases. *No to Shinkei* 41: 519-525

Yamashita K, Totani K, Iwaki Y, Kuroki M, Matsuoka Y, Endo T, Kobata A (1989) Carbohydrate structures of non-specific cross-reacting antigen 2 – a glycoprotein purified from meconium as an antigen cross-reacting with anti-carcinoembryonic antigen antibody. *J Biol Chem* 264: 17873-17881

Zhang J, Peng B, Chen X (2005) Expression of nuclear factor kappaB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11: 7334-7343

8 Danksagung

Frau Dr. Anka Thies danke ich für Ihre kompetente und sehr freundliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, ebenso für Ihre Hilfestellung bei der mikroskopischen Auswertung, sowie der statistischen Auswertung und der Bereitschaft mir immer jede Art von Frage geduldig zu beantworten.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. U. Schumacher für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen, sowie seine Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. K. Röser danke ich für Ihre Mühe und unerbittlichen Nachforschungen betreffend der fehlenden Paraffinblöcke.

Herrn Dr. F. Fehlauer danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der strahlentherapeutischen Krankenakten und seine Hartnäckigkeit, bei der Organisation von Archivdaten.

Herrn Professor Dr. Dr. U. Mangold gilt mein Dank, für die anregenden Gespräche und die humorige Unterstützung.

Meinen Eltern Marion und Rainer Teegen, danke ich für ihre Unterstützung und ihre Geduld und das so häufige Daumendrücken, was immer geholfen hat. Danke!

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung, die Hilfestellung bei der Durchführung von Laborarbeiten und die Einführung in lektin- und immunhistochemische Techniken danke ich Frau Maike Märker, Frau Tjandra Coellen, Frau Kristine Knies, Frau Susanne Feldhaus, Frau Renate Gehrcke und Herrn Klaus Siebert.

9 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Janina Teegen
Geburtsdaten: 04.07.1983 in Hamburg
Mutter: Marion Teegen
Vater: Rainer Teegen

■ Schulbildung

1989-1993 Grundschule „In der alten Forst“ in Hamburg
1993-2002 Friedrich-Ebert-Gymnasium in Hamburg
2002-2007 Allgemeine Hochschulreife

■ Studium der Zahnmedizin

WS02/03 – SS 03 Universität Hamburg
14.10.2003 naturwissenschaftliche Vorprüfung
WS03/04 – WS 04/05 Universität Hamburg
16.03.2005 1. Staatsexamen
Seit SS 05 Promotion im Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf
20.12.2007 2. Staatsexamen
Seit 02.01.2008 Assistenz Zahnärztin bei Dres. Thomsen, Hinz und Partner
Am Markt 17-21, 25436 Uetersen

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.