

Aus dem Institut für Oralpathologie
des Zentrums für Klinisch-Theoretische Medizin I
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
- Univ.-Prof. Dr. med. Th. Löning -

Untersuchungen zur p16-Expression in Speichelgangkarzinomen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Natalie Albert
aus Afanasjewka

- Hamburg 2005 -

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 31.05.05
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. med. Th. Löning
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. med. M. Jaehne
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. U. Schumacher

INHALTSVERZEICHNIS:

1	ZIELE DER ARBEIT	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
3	EINLEITUNG	3
3.1	ENTITÄT DER SPEICHELGANGLKARZINOME	3
3.1.1	<i>Histologie der Speicheldrüsentumoren</i>	3
3.1.2	<i>Ätiologie</i>	5
3.1.3	<i>Histogenese der Speicheldrüsentumoren</i>	6
3.1.4	<i>Geschichte und Nomenklatur des SDC</i>	7
3.1.5	<i>Anatomische Lokalisation der Speichelgangkarzinome</i>	7
3.1.6	<i>Klinische Präsentation der Speichelgangkarzinome</i>	8
3.1.7	<i>Makroskopische und mikroskopische Charakteristika der Speichelgangkarzinome</i>	9
3.1.7.1	<i>Makroskopische Merkmale</i>	9
3.1.7.2	<i>Mikroskopisches Bild des Tumors</i>	9
3.1.7.3	<i>Zytologie der Tumorzellen</i>	11
3.1.8	<i>Histochemie des Tumorgewebes</i>	11
3.1.9	<i>Immunhistochemie des Tumorgewebes</i>	12
3.1.10	<i>TNM-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren</i>	13
3.1.11	<i>Prognose und Therapiemöglichkeiten</i>	15
3.2	<i>p16-TUMORSUPPRESSORGEN UND SEINE PRODUKTE</i>	16
3.2.1	<i>Lokalisation und Funktion des p16-Gens</i>	16
3.2.2	<i>p16-Expression im normalen Humangewebe</i>	18
3.2.3	<i>p16-Expression im Tumorgewebe</i>	19
4	MATERIAL UND METHODEN	21
4.1	MATERIAL	21
4.1.1	<i>Untersuchungsgut</i>	21
4.1.2	<i>Verwendetes Kontrollmaterial</i>	23
4.1.3	<i>Verwendete Oligonukleotide</i>	23
4.1.4	<i>Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	24
4.1.5	<i>Verwendete Chemikalien und Enzyme</i>	25
4.1.6	<i>Verwendete Lösungen und Puffer</i>	26
4.1.6.1	<i>Immunhistochemie zum Nachweis von p16</i>	26
4.1.6.2	<i>Immunhistochemie zum Nachweis von Ki67</i>	26
4.1.6.3	<i>Polymerase-Kettreaktion</i>	27
4.1.6.4	<i>p16-Mutationsanalyse (SSCP)</i>	27
4.2	METHODEN	28
4.2.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis der p16-Expression</i>	28
4.2.2	<i>Immunhistochemischer Nachweis der Ki67-Expression</i>	31
4.2.3	<i>DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial</i>	32
4.2.4	<i>PCR an DNA aus Paraffinmaterial</i>	33
4.2.5	<i>DNA-Agarosegelelektrophorese</i>	34
4.2.6	<i>Single strand conformation polymorphism-Analyse (SSCP)</i>	35
4.2.7	<i>Silbernitratfärbung der SSCP-Gele</i>	37
4.2.8	<i>Mikrodissektion der Tumorzellareale</i>	38
4.2.9	<i>PCR an DNA-Extrakten für die direkte Sequenzierungsreaktion</i>	39
4.2.10	<i>Vorbereitung der PCR-Produkte für die Sequenzierungsreaktion</i>	40

4.2.11	<i>Sequenzreaktion</i>	40
4.2.12	<i>Aufarbeitung nach der Sequenzierungsreaktion</i>	41
4.2.13	<i>Statistische Methoden</i>	41
5	ERGEBNISSE	42
5.1	IMMUNHISTOLOGIE	42
5.1.1	<i>p16-Expression</i>	42
5.1.2	<i>Ki67-Expression</i>	44
5.2	MUTATIONSANALYSE	46
5.2.1	SSCP-Analyse	46
5.2.1.1	Probenauswahl	46
5.2.1.2	<i>p16-Mutationen in Speicheldrangkarzinomen</i>	48
5.2.2	Sequenzanalyse	48
5.2.2.1	Probenauswahl für die Sequenzanalyse	48
5.2.2.2	<i>p16-Mutationen</i>	48
5.3	EPIDEMIOLOGISCHE DATEN DES PATIENTENKOLLEKTIVS	51
5.3.1	<i>Alter und Geschlecht</i>	51
5.3.2	<i>Tumorstaging</i>	52
5.3.3	<i>Risikofaktoren und Vorerkrankungen</i>	52
5.3.4	<i>Klinischer Verlauf</i>	52
5.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	54
5.4.1	<i>Assoziation der p16-Expression zu klinischen Daten und Proliferationsrate</i>	54
5.4.2	<i>p16-Expression und die Überlebenszeiten</i>	55
5.4.3	<i>p16-Expression und Lokalrezidive / Fernmetastasen</i>	55
5.4.4	<i>Assoziation der Proliferationsrate zu p16 und klinischen Daten</i>	56
5.4.5	<i>Proliferationsrate und Überlebenszeiten</i>	56
5.4.6	<i>p16-Mutationen in Speicheldrangkarzinomen</i>	56
6	DISKUSSION	57
6.1	KLINISCHE DATEN	57
6.2	IMMUNHISTOCHEMIE	58
6.2.1	<i>p16-Expression</i>	58
6.2.2	<i>p16-Expression und klinische Daten</i>	60
6.2.3	<i>Ki67-Immunhistochemie und p16-Expression</i>	62
6.3	<i>p16-MUTATIONSANALYSE</i>	63
6.3.1	SSCP	63
6.3.2	Sequenzanalyse	64
7	ZUSAMMENFASSUNG	66
8	LITERATURVERZEICHNIS	67
9	DANKSAGUNG	78
10	LEBENS LAUF	79
11	ERKLÄRUNG	80

1 Ziele der Arbeit

Mit einem Kollektiv von 38 Patienten ist diese Untersuchung zur Expression und Mutation des *p16*-Tumorsuppressorgens die zur Zeit größte unter Speichelgangkarzinom-Studien.

Ziele der Untersuchungen zur p16-Expression in Speichelgangkarzinomen waren:

- 1 Abklärung der Bedeutung von p16-Expression als ein Tumormarker für die Prognose des Speichelgangkarzinoms, durch:
 - a) den immunhistochemischen Nachweis der p16-Expression in Karzinomen versus korrespondierendem „Normalgewebe“

- 2 Erforschung der Ursachen für eine abweichende p16-Expression in den Tumorzellen, durch:
 - a) Mutationsanalysen mittels SSCP-Gelelektrophorese
 - b) Sequenzanalyse bei abweichendem Bandenmuster, um eine evtl. vorliegende Mutation belegen zu können

- 3 Evaluierung der prognostischen Relevanz der p16-Expression anhand der vorliegenden klinischen Daten, durch:
 - a) statistische Analyse der experimentellen Ergebnisse und klinischen Daten

2 Abkürzungsverzeichnis

µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
µm	-	Mikrometer
°C	-	Grad Celsius
Aqua dest.	-	destilliertes Wasser
BCA	-	Breast Carcinoma Associated
Bp	-	Basenpaar
bzw.	-	beziehungsweise
Ca	-	Karzinom
ca.	-	circa
CDK	-	Cyclin Dependent Kinase
CDKN2a	-	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
Cm	-	centimeter
DAB	-	Diaminobenzidin
EBV	-	Epstein-Barr-Virus
EGFR	-	Epidermal Growth Factor Receptor
ERG	-	Eppendorf-Reaktionsgefäß
GCDFP	-	Gross Cyclic Disease Fluid Protein
Gl.	-	Glandula
inkl.	-	inklusive
insb.	-	insbesondere
kDa	-	Kilodalton
LOH	-	Loss of Heterozygosity
MDM2	-	Mouse Double Minute 2 Homolog
min	-	Minute(n)
mM	-	Millimol
MSI	-	Microsatellite Instability
MTS1	-	Multiple Tumor Suppressor 1
o.g.	-	oben genannte
PCNA	-	Proliferating cell nuklear antigen
PCR	-	Polymerase Kettenreaktion
pM	-	Pikomol
pRb	-	Retinoblastom-Protein
PSA	-	Prostata-spezifisches Antigen
PSP	-	Prostata saure Phosphatase
PTAH	-	Phosphotungstic acid-hematoxylin
RT	-	Raumtemperatur
Rz	-	Rezeptor
SDC-	-	Salivary Duct Carcinoma
sec	-	Sekunde(n)
SSCP	-	Single Strand Conformation Polymorphism
Tab.	-	Tabelle
TGF	-	Transforming Growth Factor
UICC	-	Union International Contre le Cancer
UKE	-	Universitätsklinikum Eppendorf
Upm	-	Umdrehungen pro Minute
W	-	Watt
WHO	-	World Health Organisation

3 Einleitung

3.1 Entität der Speicheldrüsenkarzinome

3.1.1 Histologie der Speicheldrüsentumoren

Der pathohistologischen Klassifikation (WHO-Klassifikation, siehe Tab. 1.) liegt das Prinzip zu Grunde, dass die zelluläre Differenzierung und das Bauprinzip eines Tumors mit der entsprechenden normalen Gewebsstruktur verglichen werden. Aus diesem Vergleich folgt jedoch nicht automatisch die Erklärung des Ursprungs einer Tumorzelle oder eines Tumorgewebsverbandes (Seifert und Sobin 1991). Im geweblichen Aufbau berücksichtigt die WHO-Klassifikation folgende Formationen zur Subklassifikation: solid, trabekulär, papillär, tubulär (kanalikulär), zystisch, azinär, muzinös. Nach zellulärer Differenzierung, analog dem histologischen Aufbau der Speicheldrüsen, lassen sich in den Speicheldrüsentumoren drei zelluläre Grundmuster unterscheiden: azinäre Zellen, modifizierte myoepitheliale Zellen und unterschiedlich differenzierte duktale Zellen. Azinäre Zellen bilden die Hauptkomponente in den Azinuszellkarzinomen, werden aber auch vereinzelt in pleomorphen Adenomen und Basalzellenadenomen beobachtet (Dardick et al. 1983, Dardick et al. 1984, Suzuki 1982). Modifizierte Myoepithelzellen bilden ein Strukturelement sowohl bei Adenomen (insb. pleomorphes Adenom, Myoepitheliome) als auch Karzinomen (insb. adenoid-zystische Karzinome, epithelial-myoepitheliale Karzinome und polymorphe low-grade Adenokarzinome) (Seifert 1996 (b)). Die dukталen Zellen bilden das zelluläre Strukturelement zahlreicher Tumoren wie Adenome (pleomorphes Adenom, Warthin-Tumor, Onkozytom, kanalikuläres Adenom, duktales Papillom und Zystadenom) und unterschiedlich differenzierte Karzinome (insb. AzinuszellCa, MukoepidermoidCa, epithelial-myoepitheliales Ca, polymorphes low-grade Ca) (Seifert 1996 (b)). Die Basalzellen kommen hauptsächlich in Basalzellenadenomen, Basalzellen-Adenokarzinomen und im soliden Typ des adenoid-zystischen Karzinoms vor (Seifert 1996 (a)). Weitere Zellformen, die bereits im normalen Speicheldrüsen-system vorkommen, sind Talgdrüsenzellen, schleimbildende Zellen und modifizierte Plattenepithelien (Seifert 1996 (b)).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren (Seifert und Sobin 1991).

Tumortyp:
1 Adenome
1.1 Pleomorphes Adenom
1.2 Myoepitheliom (myoepitheliales Adenom)
1.3 Basalzelladenom
1.4 Warthin-Tumor (Zystadenolymphom)
1.5 Onkozytom (onkozytäres Adenom)
1.6 Kanalikuläres Adenom
1.7 Talgdrüsenadenom
1.8 Duktales Papillom
- Invertes duktales Papillom
- Intraduktales Papillom
- Sialadenoma papilliferum
1.9 Zystadenom
- Papilläres Zystadenom
- Muzinöses Zystadenom
2 Karzinome
2.1 Azinuszellkarzinom
2.2 Mukoepidermoidkarzinom
2.3 Adenoid-zystisches Karzinom
2.4 Polymorphes low-grade Adenokarzinom (Terminales Gangadenokarzinom)
2.5 Epithelial-myoeitheliales Karzinom
2.6 Basalzell-Adenokarzinom
2.7 Talgdrüsenkarzinom
2.8 papilläres Zystadenokarzinom
2.9 Muzinöses Adenokarzinom
2.10 Onkozytäres Karzinom
2.11 Speicheldrüsenkarzinom
2.12 Adenokarzinom
2.13 Malignes Myoepitheliom (myoepitheliales Karzinom)
2.14 Karzinom im pleomorphen Adenom (maligner Misch tumor)
2.15 Plattenepithelkarzinom
2.16 Kleinzelliges Karzinom
2.17 Undifferenziertes Karzinom
2.18 Andere Karzinome
3 Nichtepitheliale Tumoren
4 Maligne Lymphome
5 Sekundäre Tumoren
6 Unklassifizierbare Tumoren
7 Tumorähnliche Läsionen
7.1 Sialadenose
7.2 Onkozytose
7.3 Nekrotisierende Sialometaplasie (Speicheldrüseninfarkt)
7.4 Benigne lymphoepitheliale Läsion
7.5 Speicheldrüsenzysten
7.6 Chronische sklerosierende Sialadenitis der Submandibularis (Küttner-Tumor)
7.7 Zystische lymphoide Hyperplasie bei AIDS

3.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Speicheldrüsentumoren ist bisher nur unzureichend geklärt. Obwohl mehrere Risikofaktoren vermutet werden, existieren bisher nur wenige gesicherte Hinweise. In Industriezweigen mit Gummi- und Kautschukverarbeitung sind neben Gallenblasenkarzinomen auch Speicheldrüsenkarzinome vermehrt beobachtet worden (Mancuso und Brennan 1970). Eine Exposition mit Asbest oder Blei wurde als weiterer Risikofaktor erwähnt (Auclair et al. 1991). Ein statistisch erhöhtes Risiko für die Entstehung von Speicheldrüsentumoren besteht bei Alkoholabusus und Einwirkung von Haarspray, besonders bei Frauen, nicht dagegen bei Nikotinabusus (Spitz et al. 1984). Eine virusassoziierte Tumorentstehung von anaplastischen Parotiskarzinomen bei Eskimos (Saemundsen et al. 1982) und Warthin-Tumoren (Santucci et al 1993) bei einer EBV-Infektion wird diskutiert. Eine Studie mit japanischen Probanden, die infolge der Atombomben-Explosionen von Nagasaki und Hiroshima einer hohen Strahlendosis ausgesetzt waren, zeigte ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Karzinomen und pleomorphen Adenomen nach Strahlenbelastung (Belsky et al.1975, Saku et al. 1997, Takeichi et al. 1983). Das Risiko für die Entwicklung eines Speicheldrüsentumors nach einer vorausgegangenen Strahleneinwirkung auf die Kopf-Hals-Region mit Einschluss der Schilddrüse steht in direkter Relation zur Strahlendosis und ist um ein vielfaches erhöht gegenüber einer nichtbestrahlten Kontrollgruppe (Smith u. Levitt 1974, Spitz et al. 1984, Schneider et al. 1985). Unterschiedliche chromosomale Aberrationen wurden in einer Reihe von Speicheldrüsenkarzinomen wie Mukoepidermoidkarzinom (Nordkvist et al. 1992), polymorphes low-grade Karzinom (Mark et al. 1991), adenoid-zystisches Karzinom (Li et al. 1995) beobachtet. In der Literatur wurden Fälle des Speicheldrüsenkarzinoms bei einem präexistenten pleomorphen Adenom beschrieben (Delgado et al. 1993).

3.1.3 Histogenese der Speicheldrüsentumoren

Zur Histogenese der Speicheldrüsentumoren gibt es unterschiedliche Hypothesen.

Die Hypothese der bizellulären Reservezellen beruht auf der Annahme, dass für die Speicheldrüsentumoren verschiedene Zellstämme in Frage kommen, wobei der eine Zellstamm basal in den Schaltstücken und der andere in der Basalschicht exkretorischer Gänge vorkommt (Eversole 1971, Batsakis et al. 1989). Speicheldrüsen-Tumoren, die myoepitheliale Zellen als Bestandteil aufweisen, stammen nach Batsakis (1980) aus den Schaltstücken und sind low-grade Neoplasien. Dem gegenüber stammen Speicheldrüsentumoren, die keine Myoepithelzellen enthalten (SDC, Mukoepidermoidkarzinom, Plattenepithelkarzinom), aus den exkretorischen Gängen und sind high-grade Tumoren mit hoher Aggressivität (Batsakis 1980, Batsakis et al. 1989). Eine andere Theorie favorisiert die Transformation von ganzen dukto-azinären Einheiten, aus denen sich jede normale Speicheldrüsenzelle differenzieren kann (Dardick et al. 1987, Dardick et al. 1994).

Neuere Untersuchungen anhand von unterschiedlichen Metaplasien der Speichelgänge zeigten, dass alle fünf Zelltypen des Speicheldrüsenorgans grundsätzlich proliferative Kapazitäten besitzen (Ihrler et al. 2002). Luminale sekretorische Azinuszellen und Schaltstücke in peripheren Gangsegmenten regenerieren unabhängig von Myoepithelzellen. Die oxyphilen Zellen der Streifenstücke und exkretorischen Gänge regenerieren durch die Proliferation und Differenzierung der Basalzellen. Die Mehrzahl von Gangmetaplasien entwickelt sich aus undifferenzierten Bcl-2 positiven Basalzellen der Streifenstücke und exkretorischer Gänge, die eine enorme pluripotente morphogenetische Differenzierungskapazität aufweisen. Das verleitet zu der Annahme, dass die große Mannigfaltigkeit der Speicheldrüsentumoren auf eine komplexe zelluläre Zusammensetzung unterschiedlicher Gangsegmente mit divergenten Regenerations- und Metaplasieprinzipien zurückzuführen ist (Ihrler et al. 2002). Für Speichelgangkarzinome gilt nach den bisherigen elektronenmikroskopischen Befunden, dass sie ausschließlich aus Gangepithelien aufgebaut sind und keine neoplastischen Myoepithelzellen enthalten (Innes et al. 1982, Garland et al. 1984, de Araujo et al. 1987, Delgado et al. 1993).

3.1.4 Geschichte und Nomenklatur des SDC

Unter den Speicheldrüsentumoren sind Speicheldrüsenkarzinome eine seltene Entität epithelialer Genese. Das Speicheldrüsenkarzinom wurde zuerst von Kleinsasser et al. (1968) beschrieben. Wegen der Rarität der Speicheldrüsenkarzinome und der bis vor kurzem fehlenden Anerkennung dieses Tumors als eigenständige Entität wurde das Speicheldrüsenkarzinom bei Untersuchungen größerer Patientenkollektive nicht als solches identifiziert und zugeordnet. Als eine spezifische klinikopathologische Entität wurde der Tumor mit der Bezeichnung „Speicheldrüsenkarzinom der exokrinen Ausführungsgänge“ (Salivary Duct Carcinom, SDC) erst 1991 anerkannt und in die überarbeitete WHO-Klassifikation (Seifert und Sobin 1991) aufgenommen. In Studien mit dem Ziel einer Reklassifikation der Speicheldrüsentumoren entsprechend der revidierten WHO-Klassifikation stellte sich heraus, dass das Speicheldrüsenkarzinom u.a. früher als Adenokarzinom klassifiziert wurde (Cesinaro et al. 1995). In der Literatur ist insgesamt nur über etwa 100 Fälle berichtet worden (Anderson et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Colmenero Ruiz et al. 1993, de Araujo et al. 1987, Dee et al. 1993, Delgado et al. 1993, Fayemi und Toker 1974, Simpson et al. 1991). Im Armed Forces Insitut of Pathology in Washington D.C. (AFIP) sind seit 1985 nur neun Fälle des Speicheldrüsenkarzinoms registriert worden (Ellis und Auclair 1996). Diese neun Fälle repräsentieren nur 0,2% aller epithelialen Neoplasien der Speicheldrüsen, 0,5% aller Speicheldrüsenkarzinome und 1,1% aller Karzinome in der Parotis (Ellis und Auclair 1996). Es wurde eine Inzidenz des SDC zwischen 2% und 3,4% unter allen Speicheldrüsenmalignomen beschrieben (Colmenero Ruiz et al. 1993, Garland et al. 1984, Simpson et al. 1991).

3.1.5 Anatomische Lokalisation der Speicheldrüsenkarzinome

Speicheldrüsenkarzinome kommen überwiegend in der Gl. Parotis vor (über 90%) (Kleinsasser et al. 1968, Fayemi und Toker 1974, Garland et al. 1984, Afzelius et al. 1987, Lopez et al. 1990, Brandwein et al. 1990, Simpson et al. 1991, Anderson et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Delgado et al. 1993, Felix et al. 1996, Lopes et al. 2001), der Gl. Submandibularis (7%) (Hui et al. 1986, Luna et al. 1987, Zohar et al. 1988, Brandwein et al. 1990), selten aber auch in kleinen intraoralen Speicheldrüsen

(Chen 1983, Pesce et al. 1986) und in der Gl. Sublingualis bzw. im Stensen'schen Gang (ca. 1,2%) (Zohar et al. 1988). An diesem Tumor leiden überwiegend Männer (76%), das Alter der Patienten variiert von 22 bis 91 Jahren (Ellis and Auclair 1996). In der Literatur wurden zwei Fälle von Speicheldrüsentumoren bei Kindern aufgeführt, bei denen es sich wahrscheinlich um Speicheldrüsenkarzinome handelte (Lack and Upton 1988). Die Inzidenz der Erkrankung ist im 6-7. Dezennium am höchsten.

Auch im Kollektiv dieser Studie (n=38) war das Speicheldrüsenkarzinom überwiegend in der Gl. Parotis (78,9%) lokalisiert. Die Gl. Submandibularis und die kleinen intraoralen Speicheldrüsen (Mundboden, Zungengrund, Zunge) waren jeweils in 10,5% der Fälle betroffen. Von der Erkrankung waren überwiegend männliche Patienten (65,8%) im Alter von 29 bis 82 Jahren mit einem Gipfel im 7. Lebensjahrzehnt (bei Frauen im fünften Dezennium) betroffen.

3.1.6 Klinische Präsentation der Speicheldrüsenkarzinome

Der Tumor manifestiert sich häufig als eine schmerzlose Parotisschwellung (Delgado et al. 1993, Anderson et al. 1992). Es wurde aber auch über Fälle mit einer schmerzhaften Schwellung in der Parotisregion berichtet (Simpson et al. 1991, Brandwein et al. 1990). In über 25% der Fälle wurde eine manifeste Fazialisdysfunktion bzw. Fazialisparese beschrieben (Delgado et al. 1993, Simpson et al. 1991, Brandwein et al. 1990). In ca. 40% der Fälle wurden laut statistischer Daten aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister (1965-1994) Fazialiskomplikationen beschrieben (Seifert 1996 (b)). Viele Patienten bemerkten eine rapide Größenzunahme der Schwellung (Anderson et al. 1992, Simpson et al. 1991). Ein am harten Gaumen lokalisierter Tumor manifestierte sich als ein nicht abheilendes Ulkus (Delgado et al. 1993). In über einem Drittel der Fälle waren bei Diagnosestellung bereits zervikale Lymphadenopathien als Zeichen regionaler Metastasierung nachweisbar (Simpson et al. 1991, Brandwein et al. 1990).

Anhand klinischer Daten dieser Studie wiesen 15,8% der PatientInnen eine manifeste Fazialisparese zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf.

3.1.7 Makroskopische und mikroskopische Charakteristika der Speichelgangkarzinome

3.1.7.1 Makroskopische Merkmale

Das Speichelgangkarzinom ist ein unscharf begrenzter, grau-weißer bzw. gelblich-weißer knotiger Tumor ohne Kapsel. Mehrere Zysten und Nekrosezonen unterschiedlicher Größe können auf der Schnittfläche sichtbar sein. Die Größe des Tumors variiert zwischen 1 cm und 7 cm, im Durchschnitt beträgt der Durchmesser bei Diagnosestellung 3 cm (Ellis and Auclair 1996, Brandwein et al. 1990).

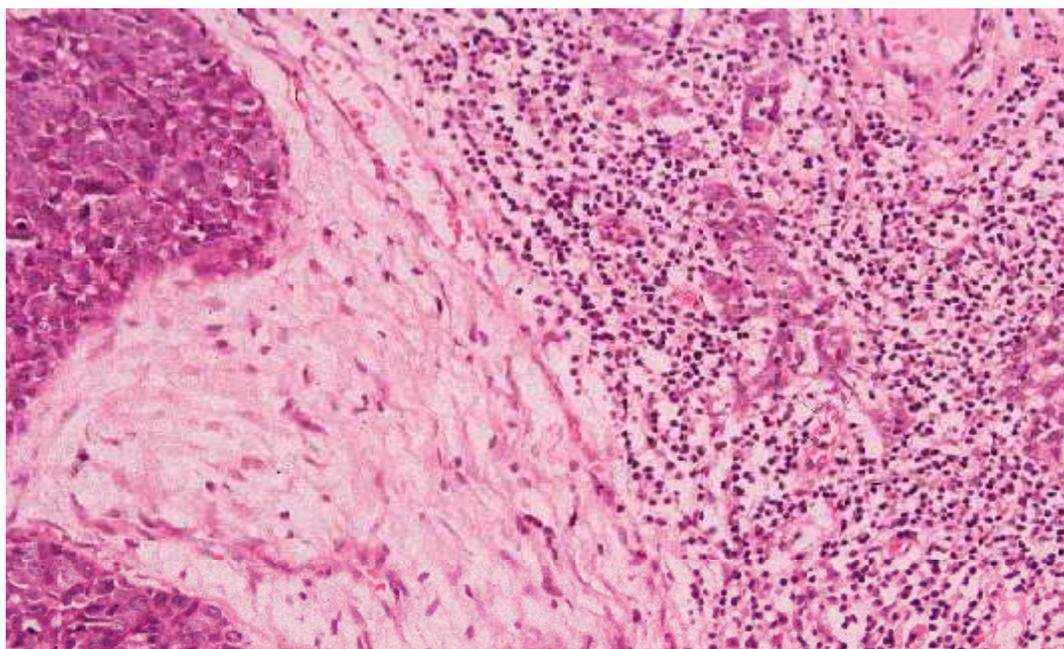
3.1.7.2 Mikroskopisches Bild des Tumors

Entsprechend dem oben beschriebenen makroskopischen Befund ist der Tumor unbekapselt. Er infiltriert Drüsenlobuli und periglanduläre Strukturen wie Fett-, Muskelgewebe, Knochen und Haut (Delgado et al. 1993, Ellis and Auclair 1996). Perineurale und intralymphatische Infiltration sind oft zu beobachten (Delgado et al. 1993, Simpson et al. 1991, Brandwein et al. 1990, Felix et al. 1996). Laut statistischer Daten aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister (1965-1994) sind perineurale Invasionen in 60% und vaskuläre Invasionen in 30% der Fälle nachweisbar (Seifert 1996 (b)).

In dieser Studie konnte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in sechs Fällen (15,8%) eine perineurale Infiltration, in vier Fällen (10,5%) zusätzlich eine perivaskuläre Infiltration durch den Tumor festgestellt werden.

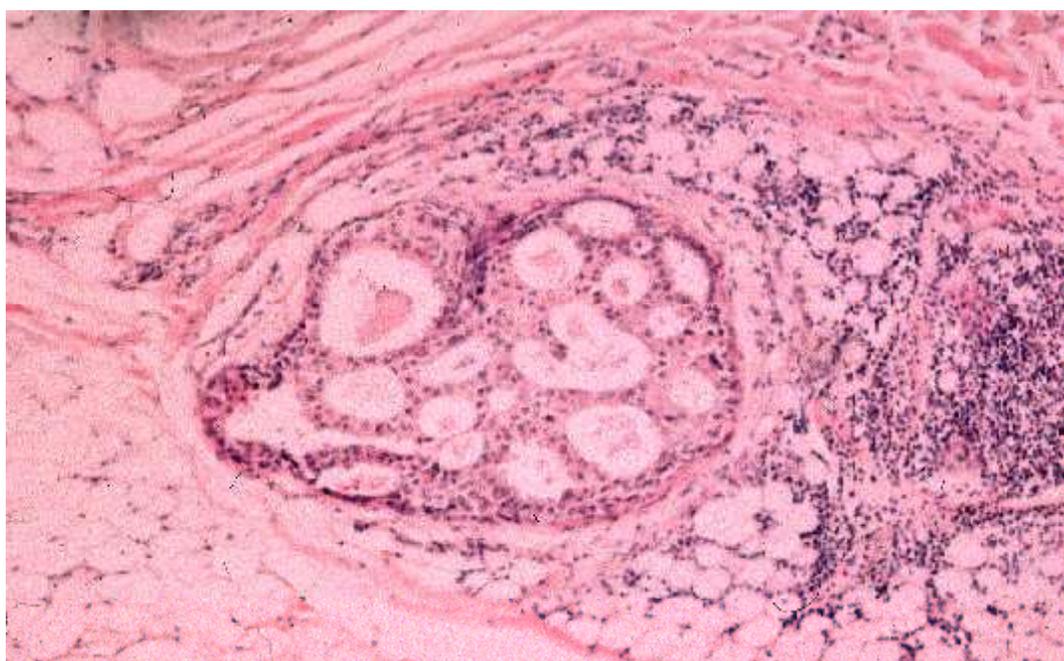
Das Speichelgangkarzinom weist pathohistologisch zwei gewebliche Muster auf: intraduktale Formationen mit kribriformen, papillären und bogenförmigen Strukturen unter Einschluss von unterschiedlich stark ausgeprägten Komedonekrosen, sowie invasive Bezirke, welche die o.g. Strukturen, überwiegend jedoch solide Zellkomplexe mit ausgeprägter desmoplastischer Hyalinisierung des Stroma enthalten (Chen u. Hafez 1981, Garland et al. 1984, Hui et al. 1986, Batsakis et al. 1989, Brandwein et al. 1990, Simpson et al. 1991, Anderson et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Delgado et al. 1993). Eine lymphoplasmazelluläre Infiltration des Stroma ist häufig (Abb.1) (Simpson et al. 1991, Anderson et al. 1992, Delgado et al. 1993).

Abbildung 1: Lymphoplasmazelluläre Begleitreaktion



Typisch sind unterschiedlich große runde Tumorzellknoten, die sowohl solid als auch zystisch aufgebaut sein können. Große zystische Knoten sind unregelmäßig geformt und weisen oft zentrale Komedonekrosen auf (Butterworth et al. 1992, Brandwein et al. 1990, Anderson et al. 1992, Delgado et al. 1993). Für Garland et al. (1984) waren Komedonekrosen erforderlich für die Diagnose. Die meisten Autoren nehmen aber an, dass diese zwar charakteristisch, aber nicht erforderlich für die Diagnose seien.

Abbildung 2: „Römische Brücken“ - Architektur der Speichelgangkarzinome



Eine histologische Ähnlichkeit des Tumors mit dem duktalem Mammakarzinom wurde von mehreren Autoren erwähnt (Afzelius et al. 1987, Garland et al. 1984, Hui et al. 1986, Kleinsasser et al. 1968, Simpson et al. 1991). Speziell auch das kribriforme Muster der Speichelgangkarzinome ist der Architektur duktales Mammakarzinome ähnlich (Abb.2) (Azzopardi 1979).

3.1.7.3 Zytologie der Tumorzellen

Die Tumorepithelzellen zeigen innerhalb der intraduktalen Strukturen, vor allem aber in den invasiven Bezirken eine erhebliche Pleomorphie mit atypischen großen Zellkernen und vermehrten pathologischen Mitosen (Seifert 1996 (a)). Die Zellen sind polymorph, von kuboidaler oder polygonaler Form. Die Zellen weisen lateral Membran-Interdigitationen, luminal gelegene Mikrovilli und gelegentlich interzelluläre Lumenformationen auf (Delgado et al. 1993). In der Feinnadel-Aspirationsbiopsie fällt eine starke Anisokaryose auf. Die Kerne sind exzentrisch gelagert, weisen Chromatinverklumpungen und mitunter intranukleäre Vakuolen auf. Die Nukleoli sind deutlich prominent (Dee et al. 1993, Delgado et al. 1993). Das Zytoplasma ist intensiv eosinophil und enthält gelegentlich PAS-positives granuläres Material (Dee et al. 1993, Moriki T 2001). Manchmal wurde auch ein apokrin-ähnliches Aussehen der die Zyste auskleidenden Zellen beobachtet, die apikal Kügelchen von eosinophilem Zytoplasma aufwiesen und in kleinen papillären Formationen angeordnet waren (Chen and Hafez 1981, Hui et al. 1986, Brandwein et al. 1990, Delgado et al. 1993, Simpson et al. 1991). In manchen Fällen wurde ein Übergang vom normalen Gangepithel zum intraduktalen Tumor beobachtet (Hui et al. 1986, Delgado et al. 1993).

3.1.8 Histochemie des Tumorgewebes

Histochemisch sind die Tumoren grundsätzlich negativ in den Muzikarmin- und Alzian-Blau-Färbungen, obwohl manchmal eine luminale oder interstitielle Positivität beobachtet wurde. Differentialdiagnostisch unterscheidet man Speichelgangkarzinome von Mukoepidermoidkarzinomen durch das Fehlen des intrazellulären Muzins (Delgado et al. 1993, Simpson et al. 1991, Hui et al. 1986).

Negativität der PTAH-Färbung nach Mallory hilft beim Ausschließen der onkozytischen Differenzierung (Delgado et al. 1993).

3.1.9 Immunhistochemie des Tumorgewebes

Immunhistochemisch enthält der Tumor analog zu anderen Adenokarzinomen epitheliale Marker wie Zytokeratin, epitheliales Membranantigen, Leu-M1 und CEA (Luna et al. 1987, Brandwein et al. 1990, Simpson et al. 1991, Butterworth et al. 1992, Delgado et al. 1993, Lopes et al. 2001). Zusätzlich wurden immunhistochemisch Laminin und Collagen IV nachgewiesen (Lopes et al. 2001). Viele Autoren weisen auf die fehlende Expression von Protein S-100, Myosin und Aktin der glatten Muskulatur hin (Luna et al. 1987, Simpson et al. 1991, Butterworth et al. 1992, Delgado et al. 1993), obwohl von Brandwein eine Protein S-100-Expression festgestellt wurde (Brandwein et al. 1990). Eine deutliche Positivität für BRST-3 (B72.3), einem tumorassoziierten Glykoprotein aus der Membranfraktion humaner Mammakarzinome, wurde von Brandwein et al. (1990) und Delgado et al. (1993), eine Positivität für BRST-1 (BCA-225) und BRST-2 (GCDFP-15) wurde von Delgado et al. (1993) beschrieben. Die meisten Speichelgangkarzinome zeigen keine Expression von Östrogen-Rz (Delgado et al. 1993), Progesteron-Rz (Barnes et al. 1994) und Markern des Prostatakarzinoms wie PSP und PSA (Simpson et al. 1991, Fan et al. 2000). Bei Speichelgangkarzinomen wurde dagegen in über 90% der Fälle eine Androgen-Rz-Expression festgestellt, im Gegensatz zu anderen Speicheldrüsentumoren und dem intraduktalen Mammakarzinom (Fan et al. 2000, Hoang et al. 2001, Moriki et al. 2001). Neben der Expression des Androgenrezeptors war eine Immunreaktivität auch für andere „Kettenglieder“ der autokrinen Wachstumsregulation (Androgenrezeptor-TGF- α -EGFR) wie TGF- α und EGFR auffällig (Fan et al. 2001).

Von mehreren Autoren wurde eine erhöhte immunhistochemische Reaktivität des Tumorgewebes für C-erbB-2 (HER-2/neu) Onkoprotein im Gegensatz zur Negativität der normalen Speicheldrüsen beobachtet (Barnes et al. 1994, Hellquist et al. 1994, Felix et al. 1996, Jaehne et al. 2001, Skalova et al. 2001).

3.1.10 TNM-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren

Die großen Kopfspeicheldrüsentumoren werden nach der international anerkannten TNM-Klassifikation der großen Speicheldrüsentumoren (UICC, Sobin LH, Wittekind Ch, Wiley-Liss et al., 5.-Auflage, 1997) beurteilt. Es wird dabei zwischen einem TNM-Stadium, das auf klinischer Untersuchung basiert und einem **pTNM**-Stadium, das erst nach einer histopathologischen Untersuchung festgelegt werden kann, unterschieden. Für die Einteilung der Tumoren ist Größe, Ausdehnung und der Metastasierungsstatus des Primärtumors von Bedeutung. Tumoren der kleinen intraoralen Speicheldrüsen werden analog zu anderen Tumoren des Mundraumes eingeordnet.

T- Primärtumor

- Tx- kein Primärtumor untersucht
- T0- Kein Anhalt für Primärtumor
- T1- < oder =2 cm im größten Durchmesser ohne extraparenchymale Ausdehnung*
- T2- > 2 cm aber < 4 cm im größten Durchmesser ohne extraparenchymale Ausdehnung*
- T3- Tumor weist extraparenchymale Ausdehnung* ohne Beteiligung des N.VII auf und/oder ist > 4 cm aber < 6 cm im größten Durchmesser
- T4- Tumor infiltriert die Schädelbasis und N. VII und/oder ist > 6 cm in größter Ausdehnung*

N- Regionäre Lymphknoten

- Nx- Regionäre Lymphknoten nicht untersucht
- N0- Keine Lymphknotenmetastasen
- N1- Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten \leq 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- N2- Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten > 3 cm, aber \leq 6 cm in größter Ausdehnung (N2a), oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine > 6 cm in größter Ausdehnung (N2b), oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keine > 6 cm (N2c) in größter Ausdehnung

* Extraparenchymale Ausdehnung ist durch einen klinischen oder makroskopischen Beweis einer Invasion in die Haut, Weichteile, Knochen oder Nerven festzustellen. Ein mikroskopischer Beweis alleine wird aus Klassifikationszwecken nicht als extraparenchymale Ausdehnung definiert.

N3- Metastase(n) in Lymphknoten, > 6 cm in größter Ausdehnung

M- Fernmetastasen

Mx- Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

M0- Keine Fernmetastasen

M1- Fernmetastasen

pTNM- pathologische Klassifikation

Die pT, pN und pM- Kategorien entsprechen den T, N und M- Kategorien**

Stadiengruppierung

Stage I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0

Stage II	T3	N0	M0
-----------------	----	----	----

Stage III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0

Stage IV	T4	N0	M0
	T3	N1	M0
	T4	N1	M0
	jedes T	N2, N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

Diese Gruppierung ist laut Studien von Spiro und Levitt prognostisch relevant, da eine enge Korrelation zwischen dieser Einteilung und der 10-Jahres Überlebensrate beobachtet wurde.

In den Stadiengruppen I-IV zeigten sich demnach Überlebensraten von 83%, 53%, 35% bzw. 24% (Spiro et al. 1975, Levitt et al. 1981).

** **pN0** Um dieses Stadium festzulegen sind 6 oder mehr Lymphknoten für eine histopathologische Überprüfung einer selektiven Neck Dissection erforderlich. Im Falle einer radikalen Neck Dissection sind dafür 10 oder mehr Lymphknoten erforderlich.

3.1.11 Prognose und Therapiemöglichkeiten

Das Speicheldrüsenkarzinom zeigt ein aggressives biologisches Verhalten (lokale Invasion, lymphogene und hämatogene Metastasierung) und hat eine sehr schlechte Prognose (Ellis and Auclair 1996, Seifert 1996 (b)). In der Literatur beschriebene Überlebensraten variieren allerdings stark zwischen 100 und 17% (Luna et al. 1987, Simpson et al. 1991, Anderson et al. 1992, Brandwein und Biller 1992, Butterworth et al. 1992, Colmenero Ruiz et al. 1993, Delgado et al. 1993). Eine statistische Auswertung der Fälle aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister (1965-1994) zeigt tumorbedingte Mortalität von ca. 70% innerhalb von 3-4 Jahren, besonders bei Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 3 cm (Seifert 1996 (b)). Die längste in der Literatur beschriebene Überlebenszeit beträgt 12 Jahre nach der Diagnosestellung (Delgado et al. 1993).

Anhand von klinischen Daten dieser Studie betragen die 3-Jahres und 5-Jahres Überlebensraten 50% respektive 13,8%. In dieser Studie wurde ein Fall von einem 55-jährigen Patienten mit Überlebenszeit von 124 Monaten (krankheitsfreier Verlauf) untersucht.

Laut Seifert (1996 (b)) haben 60% bis 80% der Patienten regionale Lymphknotenmetastasen. Ca. 55% der Patienten weisen eine Fernmetastasierung in die Lungen, Knochen, Haut, Leber, Milz, Nebennieren, Nieren und das Gehirn auf (Brandwein et al. 1990, Delgado et al. 1993, Seifert 1996 (b)). Über eine Korrelation der Tumorgröße mit der Prognose wurden unterschiedliche Aussagen gemacht. Manche Autoren fanden, dass die Tumorgröße unter 3 cm mit einer besseren Prognose korreliert (Hui et al. 1986, Brandwein et al. 1990, Delgado et al. 1993, Hellquist et al. 1994, Felix et al. 1996). Im Gegensatz dazu fanden Colmenero Ruiz et al. (1993) keine Relation zwischen der Prognose und der Größe des Tumors. Die schlechte Prognose und hohe Aggressivität des Tumors erfordern eine Kombinationstherapie, die eine weite chirurgische Exzision, radikale Neck Dissection und Radiatio einschließt (Ellis and Auclair 1996).

Eine postoperative Strahlenbehandlung soll die lokoregionale Kontrolle verbessern (Fu et al. 1977, Harrison et al. 1990, Armstrong et al. 1990a, Simpson et al. 1991, Butterworth et al. 1992). Nur wenige Studien haben jedoch über eine Auswirkung

der Therapie auf die Überlebensraten berichtet (Tu et al. 1982, Armstrong et al. 1990a, North et al. 1990, Lopes et al. 2001, Felix et al. 1996).

Da die Tumoren sehr selten sind, liegen keine Daten aus prospektiven randomisierten Studien vor. Bisherige Indikationsvorschläge für eine postoperative Radiotherapie basieren nur auf Angaben aus retrospektiven Untersuchungen. Eine Radiotherapie war demnach indiziert bei positiven Resektionsrändern, einem fortgeschrittenen klinischen Stadium, bei Fazialisparese unabhängig vom Resektionsrandstatus und bei rezidivierenden Tumoren (Fu et al. 1977, Armstrong et al. 1990a, Armstrong et al. 1990b, Spiro et al. 1993, Teshima et al. 1993). Inoperable Tumoren bzw. Patienten mit hohem Operationsrisiko wurden nur mit Strahlentherapie behandelt.

Chemotherapeutisch wurden Patienten mit Rezidiven, Metastasen oder nicht resektablen Speicheldrüsentumoren behandelt. Die Studien setzten unterschiedliche Substanzen ein (z. B. Cisplatin, Adriamycin, 5-Fluorouracil, Doxorubicin und Cyclophosphamid) und lieferten schlechte Therapieergebnisse unabhängig davon, ob die Substanzen einzeln oder in Kombination verabreicht wurden (Kaplan et al. 1986, Licitra et al. 1996). Bei der beobachteten erhöhten HER-2/neu Onkoprotein-Expression wäre möglicherweise eine Anti-HER-2/neu Therapie mit Herceptin® in Erwägung zu ziehen (Skalova et al. 2001), obwohl es noch keine Studien über den Nutzen von dieser Therapie gibt.

3.2 *p16*-Tumorsuppressorgen und seine Produkte

3.2.1 Lokalisation und Funktion des *p16*-Gens

In einer Reihe von Arbeiten wird auf die bedeutende Rolle von *p16* in der Tumorphathogenese hingewiesen (Caldas et al. 1994, Goldstein et al. 1995, Hussussian et al. 1994, Kamb et al. 1994, Nobori et al. 1994, Mori et al. 1994, Burns et al. 1998). Das vor einigen Jahren klonierte Gen *CDKN2A* (bekannt als *MTS-1*, *INK4A*, *p16*) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 9 Locus 21. *CDKN2A* besteht aus drei kodierenden Exons: Exon 1 (E1) bestehend aus 340 bp, Exon 2 (E2) aus 585 bp und Exon 3 (E3) aus 422 bp (Serrano et al. 1993, Hussussian et al. 1994), die Sequenzen sind in der NCBI-Genbank unter den Nummern U12818, U12819 und U12829 zu finden. *CDKN2A* codiert durch unterschiedliche Promotoren für zwei Tumorsuppressorgene: Transkript E1-alpha (für $p16^{\text{INK4A}}$) bzw. Transkript

E1-beta (für p14^{ARF}) (Quelle et al. 1995). Als Produkt des *p16*-Gens ist das p16-Zellzyklusregulator-Protein (16 kDa) identifiziert worden (Serrano et al. 1993, Kamb et al. 1994, Hussussian et al. 1994).

Das Protein p16 bindet die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4 und CDK6) (Serrano et al. 1993, Tam et al. 1994). Durch diese Bindung wird die Interaktion der CDK4 und CDK6 mit Cyclin D1 beeinträchtigt (Abb. 16). Das löst eine Hemmung der Phosphorylierung des Rb-Proteins und der Rb-verwandten Proteine p107 und p130 aus (Serrano et al. 1993). Li et al. (1994) und Tam et al. (1994) beobachteten jedoch, dass pRb als Feedback limitierend auf den p16-Level wirken kann.

Der Eintritt der Zellen in die DNA-Synthese Phase (S) des Zellzyklus wird gesteuert, u.a. indem das Rb-Tumorsuppressorprotein die Aktivierung des E2F-Transkriptionsfaktors blockiert (Weinberg 1995). Andere negative Regulatoren des E2F-Promotors wie p130 (Johnson 1995) unterdrücken aktiv die Transkription des E2F (Dyson 1998, Nevins 1998).

Das aktivierte Rb-Protein wirkt antiproliferativ, indem es die Zellpassage von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Serrano et al. 1993, Lukas et al. 1995, Serrano et al. 1995). Da das Rb-Protein nur eine kleine Fraktion der E2F-Aktivität inhibiert, wird der Verlust der Rb-Kontrolle möglicherweise durch p107 und p130-Aktivität kompensiert (Sherr 2001). Außerdem ist Rb mit vielen Proteinen assoziiert; einige von diesen erlauben möglicherweise eine Genregulation durch Rb in E2F-unabhängiger Weise (Dyson 1998, Harbour und Dean 2000, Lipinski und Jacks 1999).

Eine funktionelle Störung der Tumorsuppressorgene *p16^{ink4a}* oder *Rb* und/oder eine Überexpression der protoonkogenen Produkte (Cyclin D1, CDK4, E2F) kommt in vielen menschlichen Tumoren vor (Lukas et al. 1995, Yeager et al. 1995, Khleif et al. 1996, Kitahara et al. 1996, Sherr 1996, Ueki et al. 1996, Emig et al. 1998, Shintani et al. 2000). Das lässt vermuten, dass die Störung des Rb-Regulationswegs ein essentielles Geschehen im Prozess der Kanzerogenese ist (Sherr 1996). Indem p16^{ink4a} in den Zellen mit Rb-Verlust keine effektive Tumorgenesesuppression bewirkt, wird die Assoziation zum Rb-Protein im Rb-Regulationsweg deutlich (Koh et al. 1995, Lukas et al. 1995, Medema et al. 1995).

Sherr weist allerdings darauf hin, dass die CDK2 auch andere Substrate phosphorylieren, die die DNA-Synthese fördern, woraus er folgert, dass p16 nicht

ausschließlich in linearer Beziehung zum Rb als Tumorsuppressor fungiert (Sherr 2001).

Die Inaktivierung des $p16^{ink4a}$ führt infolge der obengenannten Erkenntnisse zur Dysregulation der Zellzykluskontrolle und Zellproliferation (Hall und Peters 1996, Serrano et al. 1993, Sherr 2001). Voorhoeve und Agami (2003) stellten heraus, dass der Verlust von $p16^{ink4a}$ in Zellen mit bereits ausgeschaltetem $p53$ durchweg zu einer Zunahme des Zellwachstums führt, ebenso wie der Verlust von $p53$ in Zellen mit stark verminderter p16-Expression. Synergistisch mit $p53$ schützt $p16^{ink4a}$ Zellen vor ungehemmtem Zellwachstum und Zelltransformation. Das *INK4A* kodiert neben $p16^{ink4a}$ auch für das alternative $p14^{ARF}$ -Produkt, das ebenfalls zu den Zellzyklusregulatoren zählt, indem es die MDM2-vermittelte Inaktivierung des $p53$ verhindert (Quelle et al. 1995, Lowe and Sherr 2003). Bei einer Untersuchung der Funktion und Bedeutung der Gene der *INK4A*-Region ($p16^{ink4a}$ und $p14^{ARF}$) stellte sich heraus, dass $p16^{ink4a}$ in menschlichen Zellen als Tumorsuppressorgen eine größere Bedeutung als $p14^{ARF}$ hat. (Voorhoeve und Agami 2003). Die Prozesse der Kanzerogenese, bei denen diverse Tumorsuppressorgene und -Proteine ($p53$, pRb, $p16^{ink4a}$) sowie onkogenetische Faktoren (Ras, Myc, Jun, Fos, E2F) zusammenwirken (Abb.16), sind bis heute noch unzureichend erforscht (Hanahan und Weinberg 2000).

3.2.2 p16-Expression im normalen Humangewebe

Untersuchungen der $p16^{ink4a}$ -Expression in normalen Humangeweben zeigten einige Besonderheiten, die eine wichtige Rolle des $p16^{ink4a}$ im Prozess des zellulären Alterns annehmen lassen (Palmero et al. 1997, Zindy et al. 1997, Nielsen et al. 1999). Die p16-Expression in normalen menschlichen Geweben ist relativ selektiv (Tab.2). Innerhalb des Gewebes ist die p16-Expression jedoch unabhängig von zellulärer Proliferation bzw. dem Reifungsgrad (Nielsen et al. 1999).

Tabelle 2: p16-Expression im normalen Humangewebe (Nielsen et al. 1999, Shintani et al. 2000)

p16-Expression	
	Erwachsene
++	myoepitheliale und duktale Zellen, Speicheldrüsen azinäre und duktale Zellen, Antrum

p16-Expression	
+++	endokrine Drüsen Sertolizellen duktales Epithel, Brustdrüsen glanduläres Epithel, Zervix uteri proliferierendes Endometrium metaplastisches Epithel, Zervix uteri
selten	Azinuszellen, Speicheldrüsen
+	Urothelzellen Plattenepithel, Ösophagus
Neugeborene	
++	Hassal-Körperchen, Thymus
+	thymische Lymphozyten
selten	Epithelzellen, Pankreas

Die Restriktion der $p16^{ink4a}$ -Expression bei Kindern auf den Thymus als das Organ mit früher Involution und eine erhöhte p16-Expression in Geweben von Erwachsenen wie in Geweben von alten Mäusen könnte die vermutete Rolle des $p16^{ink4a}$ als Gens der zellulären Alterung reflektieren (Nielsen et al. 1999).

3.2.3 p16-Expression im Tumorgewebe

Eine Reihe von Aussagen weisen auf eine große Bedeutung des $p16^{ink4a}$ in der Tumorgenese hin. Viele Alterationsmechanismen, darunter homozygote Deletionen (Kamb et al. 1994, Cairns et al. 1995), Hypermethylierung des 5' CpG- Abschnittes innerhalb der Promotorregion (Merlo et al. 1995, Milde-Langosch et al. 1998, Song et al. 2000) und Punktmutationen des Gens (Cairns et al. 1994, Merlo et al. 1995) führen zur $p16^{ink4a}$ -Inaktivierung (Tab.3 und 4).

Tabelle 3: p16-Expression im Tumorgewebe

p16-Expression	
Verlust/Vermindert	OvarialCa (Milde-Langosch et al. 1998) AdenoCa, Magen (Song 2000)
Verlust	zentrale Chondrosarkome (van Beerendonk et al. 2004) Ovarialkarzinome G2 und G3 (Sui et al. 2000) PlattenepithelCa, Kopf-Hals-Region (Reed et al. 1996, Liggett et al. 1996, Merlo et al. 1995)
erhöht	hyperplastisches Endometrium (Milde-Langosch et al. 1999) Urothelzelllinien mit Rb-Alteration (Yeager et al. 1995) reaktive Fibroblasten und Endothelzellen (Burns et al. 1998) alternde Urothelzellen (Reznikoff et al. 1996, Palmero et al. 1997) MammaCa (Emig et al. 1998, Hui et al. 2000,) ProstataCa (Lee et al. 1999)

Tabelle 4: p16-Mutationen im Tumorgewebe

p16-Mutation	
somatische Mutation	OvarialCa (Milde-Langosch et al. 1998) PankreasCa (Caldas et al. 1994, Biankin et al. 2002, Fukushima et al. 2002)
LOH	zentrale Chondrosarkome (van Beerendonk et al. 2004) PlattenepithelCa der Haut (Quinn et al. 1994, Soufir et al. 1999) Speichelgangkarzinom (Cerilli et al. 1999)
Keimbahnmutation	familiäre Melanome (Hussussian et al. 1994)
homozygote Mutation	AdenoCa, Pankreas (Caldas et al. 1994) PlattenepithelCa, Ösophagus (Mori et al. 1994) PlattenepithelCa, Kopf-Hals-Region (Reed et al. 1996, Liggett et al. 1996) Melanom-, MammaCa-, LungenCa-Zelllinien (Kamb et al. 1994) BlasenCa, ProstataCa (Cairns et al. 1995)
aberrante Methylierung	PlattenepithelCa, Kopf-Hals-Region (Reed et al. 1996, Liggett et al. 1996, Merlo et al. 1995) duktales Pankreaskarzinom (Fukushima et al. 2002) oropharyngeales PlattenepithelCa (Motsch et al. 2004) OvarialCa (Milde-Langosch et al. 1998) AdenoCa, Magen (Song 2000) MammaCa (Hui et al. 2000)

Über die p16-Expression und Alterationen in Speicheldrüsentumoren gibt es in der Literatur wenige Angaben. Bei einer Untersuchung der Karzinome in pleomorphen Adenomen der Parotis wurde eine genetische Alteration des *p16/CDKN2* in Form von „Microsatellite Instability“ (MSI) sowohl im Adenom- als auch im Karzinomanteil beobachtet, was auf eine bedeutende Rolle des *p16* bei der malignen Transformation des Karzinoms im pleomorphen Adenom hinweisen könnte (Suzuki und Fujioka 1998). Bei einer Untersuchung an Speicheldrüsenangkarzinomen konnte in 7 von 9 Fällen mit einem bzw. mehreren polymorphen genetischen Markern ein LOH in Region 9p21 (Lokus für *p16/INK4a*) festgestellt werden (Cerilli et al. 1999).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Untersuchungsgut

Bei dem Untersuchungsgut handelte es sich ausschließlich um Archivmaterial aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister. Die Gewebeproben wurden zwischen 1977 und 2000 sowohl aus dem UKE als auch von auswärtigen Einsendern an das Institut für Oralpathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur konsiliarischen Beurteilung eingeschickt und anschließend in das Hamburger Speicheldrüsenregister aufgenommen.

Die klinischen Daten für das Untersuchungskollektiv wurden der Klinikkartei und den Akten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Direktor: Univ.-Prof. Dr. U. Koch) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen, bzw. bei den eingeschickten Proben wurden die Einsender kontaktiert.

Es wurden 43 Gewebeproben mit der Diagnose „Speicheldrüsenkarzinom vom Komedytyp“ von 38 PatientInnen untersucht, wobei drei Proben (zwei Fälle) ein Rezidiv des Tumors darstellten.

Die Tumorproben waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Auswahl für das Patienten-Kollektiv wurde anhand histologischer Schnitte (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, PAS- und ASTRA-Reaktion) getroffen. Ein Großteil der Tumoren war in der Gl. Parotis (30 Fälle; 78,9 %) lokalisiert. Jeweils in vier Fällen war der Tumor in der Gl. Submandibularis (10,5%) bzw. in kleinen intraoralen Speicheldrüsen (Mundboden, Zungengrund, Zunge) (10,5%) lokalisiert. Mikroskopisch wiesen die untersuchten Speicheldrüsenkarzinome typische, in der Literatur beschriebene, histologische Bilder mit kribriformen Wachstumsmustern, „Römische Brücken“-Architektur, Komedo-Nekrosen und häufig sehr ausgeprägten entzündlichen Begleitreaktionen auf (Brandwein et al. 1990, Anderson et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Delgado et al. 1993, Ellis and Auclair 1996).

Die Stadieneinteilung der Karzinome erfolgte entsprechend der TNM-Klassifikation (UICC, Sobin, et al. 1997) aufgrund der Operationsberichte sowie der histologischen

und klinischen Befunde. Die genaue Stadieneinordnung der untersuchten Proben ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5:

Fall	Alter	TNM-Stadium	Stage
I. Primärtumor: (n=38)			
1	78	pT1 N0 M0	I
2	47	pT2 N0 M0	I
3	55	pT2 N0 M0	I
4	63	pT2 N0 M0	I
7	68	pT2 N0 M0	I
8	66	pT2 N0 M0	I
9	70	pT2 N0 M0	I
21	47	pT3 N0 M0	II
22	29	pT3 N0 M0	II
23	41	pT3 N0 M0	II
5	55	pT2 N1 M0	III
10	76	pT2 N1 M0	III
11	82	pT2 N1 M0	III
12	58	pT2 N1 M0	III
18	73	pT2 pN1 M0	III
6	69	pT2 N2b M0	IV
13	56	pT2 N2a M0	IV
14	69	pT2 N2b M0	IV
15	45	pT2 N2b M0	IV
16	68	pT2 N2c M0	IV
17	61	pT2 N2 M0	IV
19	77	pT2 pN2a M0	IV
20	76	pT3 N2b M0	IV
24	69	pT3 N1 M0	IV
25	52	pT3 N1 M0	IV
26	73	pT3 N2b M0	IV
27	42	pT3 N2b M0	IV
28	53	pT3 N2b M0	IV
29	70	pT3 N2 M0	IV
30	61	pT4 N1 M0	IV
31	56	pT4 N2b M0	IV
32	68	pT4 N2b M0	IV
33	82	pT4 N2b M0	IV
34	50	T4 N0 M0	IV
35	49	T4 N2b M0	IV
36	54	-	-
37	45	-	-
38	78	-	-
II. Rezidive: (n=3)			
9	70	pT2 N0 M0	I
9	70	pT2 N0 M0	I
30	61	pT4 N1 M0	IV
III. Normalgewebe: (n=2)			
26	73	-	-
29	70	-	-

4.1.2 Verwendetes Kontrollmaterial

Bei der p16-Immunhistochemie wurde als Positivkontrolle ein serös-papilläres OvarialCa, Stadium 2b, Grad III und als Negativkontrolle ein muzinöses OvarialCa, Stadium 1a, Grad I verwendet.

Bei dem Kontrollmaterial für die Mutationsanalyse handelte es sich um aus Paraffinmaterial extrahierte DNA von Ovarialkarzinomen mit bekannter Mutation bzw. bekanntem Polymorphismus im *p16*-Gen (Tab. 6) (Milde-Langosch et al. 1998). Das Kontrollmaterial wurde freundlicherweise von Frau Dr. K. Milde-Langosch (Institut für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Kontrollmaterial für die Mutationsanalyse

Exon 1: Nr. 57 und 113

Exon 2b: Nr. 40

Nr.	M / P* ¹	H* ²	C* ³	<i>p16</i> -Mutation//AA-Change		Ho/he* ⁴	IHC**	Me/NM* ⁵
57	M	muzinös	27	ggg-agg	gly-arg	hetero	+	Me
113	P	endometrioid	16	cgg-cga	arg-arg	hetero	-	Me
40	P	endometrioid	140	gcg-acg	ala-thr	hetero	-	Me

4.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Die Sequenzen der benutzten Oligonukleotide sind in Tab. 7 aufgeführt.

Um die Laufgeschwindigkeit in der PAGE zu verringern und dadurch die Spezifität zu erhöhen, trägt je einer der beiden Exon-spezifischen Primer, die sich zu den jeweils angrenzenden Intronregionen komplementär verhalten, eine so genannte „GC-Klammer“ bzw. eine GC-reiche Region (Sheffield et al. 1989).

*¹ M-Mutation / P-Polymorphismus, *² histologischer Typ, *³ Nummerierung laut Serrano (Serrano et al. 1994), *⁴ homo/heterozygot, *⁵ Me (hypermythyliert)/NM(nicht methyliert)

** Immunhistochemie, --negativ, + fokal oder schwach positiv, ++ intermediär, +++ starke Färbung

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer für die SSCP-Analyse

Exon	Sense	Antisense
1	5'-(GC40)AAGAAAGAGGAGGGGGCTG-3'	5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-3'
2a	5'-(GC40)AGCTTCCTTTCGGTCATGC-3'	5'-CAAGGTCCACGGGCAGA-3'
2b	5'-(GC40)TGGACGTGCGCGATGC-3'	5'-TCTGAGCTTTGGAAGCTCTC-3'

Originalbezeichnung der Primer laut Literaturangaben:

Sense-Primer für Exon 2a - X2.62F,

Antisense-Primer für Exon 2a - 346R, 1 mismatch am 5'-Ende

Sense-Primer für Exon 2b - 305F.

Die Sequenzen der Primer wurden von Caldas et al. (1994) (Sense- und Antisense-Primer für Exon 1 und Antisense-Primer für Exon 2b) und Hussussian et al. (1994) (Sense- und Antisense-Primer für Exon 2a und Sense-Primer für Exon 2b) beschrieben. Die Primer für die SSCP-Analyse wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Die Sequenzen der Primer für die Sequenzanalyse wurden von Fr. Dr. Milde-Langosch (Institut für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) erarbeitet (Tab. 8).

Tabelle 8: Verwendete Primer für die Sequenzanalyse.

Exon	Sense	Antisense
1	5'-GTCACCAGAGGGTGGGGCGGA-3'	5'-CTGCAAACCTTCGTCCTCCAG-3'
2a	5'-CTGGCTCTGACCATTCTG-3'	5'-CCCAGGCATCGCGCACGTC-3'
2b	5'-TGCCTGGGGCCGTCTGCC-3'	5'-CAGGGTACAAATTCTCAG-3'

Die Primer für die Sequenzanalyse wurden ebenfalls von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

4.1.4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Ultrazentrifuge Biofuge 13

Heraeus sepatech, Osterode

Certomat TC 3

Braun Biotech GmbH, Melsungen

DNA Sub CellTM Electrophoresis System

Bio Rad, München

UVP- Transilluminator	Spectroline, Deutschland
Polaroid MP-4 Land Camera	Polaroid Corp., Offenbach
Polaroid 665 Instant Pack Film	Polaroid Corp., Offenbach
Thermocycler, Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
SSCP- Kammer	Qiagen, Hilden
Gel support films	Qiagen, Hilden
Centricon 100Einweg- Mikrokonzentrator	Amicon GmbH, Witten
Eppendorf Thermomixer 5436	Wilke&Witzel, Hamburg
Refrigerated Centrifuge Centrikon H-401	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen

4.1.5 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

Maus anti-Ki67 (Klon: MIB 1)	Dianova, Hamburg, Kat. dia 505
ABC-Kit anti-mouse Vectastain	Vector Lab. Inc., USA
DAB-Kit	Vector Lab. Inc., USA, Kat. SK-4100
Maus anti-Human p16	Pharmlingen, USA, Kat. 13251A
NucleoSpin Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Kat. 740952
Agarose (Nusieve 3:1)	Biozym, Hess. Oldendorf
Chelex 100	BioRAD Lab, Richmond USA
Taq Polymerase	Appligene, Heidelberg
Desoxynucleosid- triphosphat Set/dNTP's	Gibco BRL, Maryland, USA
Gene Ruler™	MBI Fermentas, Lithuania, Kat. SM0241
QLAquick PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden, Kat. 28104
QLAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Kat. 28704
MDE	FMC, Rockland, USA
“tissue adhesive”	Diagnostic Products Corp., Niederlande
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
AmpliWax	Perkin Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim
Abi Prism, Big Dye™, Terminator	Perkin Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim
Mineralöl	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Kat. M5904

4.1.6 Verwendete Lösungen und Puffer

4.1.6.1 Immunhistochemie zum Nachweis von p16

2% Pferdeserum		in 1 x PBS-Puffer
1 x PBS-Puffer	130 mM	NaCl
	3 mM	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O
	7 mM	Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O (pH 7,2)
Ethanol- H ₂ O ₂ -Lösung	9,65 dM	C ₂ H ₅ OH
	35 mM	H ₂ O ₂
Citratpuffer	8,2 mM	C ₆ H ₈ O ₇ • H ₂ O
	1,8 mM	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ • 2H ₂ O (pH 6,0)
Primärantikörper		Maus anti-Human p16 (Clon G175-405)
	1:80	in 1 x PBS
	2%	Pferdeserum
Sekundärantikörper		Anti-Mouse IgG (ABC- Kit anti-Maus Vectastain)
	1:200	in 1 x PBS
	2%	Pferdeserum
Detektionsreagenz		Lösung A (Avidin DH) Lösung B (biotinylated Horseradish Peroxidase H) (ABC- Kit anti-Maus Vectastain)
	1:100	in 1 x PBS
Farblösung	2 Tr.	Buffer Stock Solution
	4 Tr.	DAB Stock Solution
	2 Tr.	H ₂ O ₂ (DAB-Kit, Vector)
	5 ml	Aqua dest.

4.1.6.2 Immunhistochemie zum Nachweis von Ki67

2% BSA		in 1 x PBS
2% Pferdeserum	s.o.	
1 x PBS-Puffer	s.o.	
Methanol-H ₂ O ₂ -Lösung	9,756 mM	CH ₃ OH
	24,39 mM	H ₂ O ₂

Citratpuffer	s.o.	
Primärantikörper	1:50 2%	Maus anti-Ki67 (Klon: MIB 1) in 1 x PBS BSA
Sekundärantikörper	1:200	Anti-Mouse IgG (ABC- Kit anti-Maus Vectastain) in 1 x PBS
Detektionsreagenz	s.o.	
Farblösung	s.o.	

4.1.6.3 Polymerase-Kettreaktion

10 x Puffer J	600 mM	Tris- HCl (pH 9,5)
	150 mM	(NH ₄)SO ₄
	20 mM	MgCl ₂
		Aqua dest. (pH 9.5)

Agarosegel-Elektrophorese:

Ethidiumbromid	10 mg/ml	Arbeitskonzentration
1 x Tris-Acetat-Puffer (= TAE- Puffer)	40 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	1,6 mM	C ₂ H ₄ O ₂ (pH 7,8)

4.1.6.4 p16-Mutationsanalyse (SSCP)

MDE- Gel	0,5 x	MDE
	0,6 x	TBE
	0,04 %	APS
	0,04 %	TEMED
	5 %	Glycerol (für E1)
SSCP- Stop-Lösung	95 %	Formamid
	20 mM	EDTA
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylen-Cyanol
1 x TBE- Puffer	53,5 mM	Tris- Base
	53,37 mM	H ₃ BO ₃
	1,2 mM	Titriplex III
	1,2 mM	NaOH (pH 8,43)

Silbernitratfärbung des SSCP-Gels:

Puffer A	1 dM	C ₂ H ₅ OH
	1 dM	C ₂ H ₄ O ₂
Puffer B (im Dunkeln aufzubewahren)	5,9 mM	AgNO ₃
Puffer C	37,5 mM	NaOH
	2,64 mM	NaBH ₄
	4 mM	CH ₂ O
Puffer D	70,76 mM	NaCO ₃

4.2 Methoden

4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der p16-Expression

Von den für die Untersuchung vorgesehenen Paraffinblöcken wurden für den immunhistologischen Nachweis der p16- und Ki67-Expression 4µm-Schnitte angefertigt.

Immunhistochemisch lässt sich das Protein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachweisen (Yeager et al. 1995) Als Positivkontrolle wurde ein serös-papilläres OvarialCa, Stadium 2b, Grad III und als Negativkontrolle ein muzinöses OvarialCa, Stadium 1a, Grad I bei jeder Reaktion mitgeführt.

Herstellung der Paraffinschnitte:

Am Mikrotom wurden 4-6 µm dicke Schnitte hergestellt. In einem handwarmen Wasserbad wurden die Schnitte gestreckt und auf APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)-beschichtete Objektträger (Super-FrostPlus; Menzel Braunschweig) aufgezogen. Danach wurden sie 20 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet.

Entparaffinierung:

Die Schnitte wurden in Xylol (2 x 10 min) entparaffiniert und anschließend rehydriert über eine absteigende Ethanolreihe bis zum 96%-igen Ethanol und anschließend in Puffer überführt.

Ethanolblockade:

Die endogene Peroxydase wurde durch Inkubation der Schnitte für 30 min mit frisch angesetzter Ethanol-H₂O₂ -Lösung gehemmt. Anschließend wurden die Präparate 2 mal kurz im Leitungswasser und nachfolgend 2 mal mit Aqua dest. gespült.

Demaskierung der Epitope (Mikrowellenvorbehandlung):

Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte in eine mikrowellengeeignete Küvette mit Citratpuffer (pH 6,0) überführt und 10 min mit 750W Mikrowellenleistung sprudelnd gekocht. Damit die Schnitte während des Kochvorgangs nicht austrocknen, wurde der Flüssigkeitsverlust durch Nachfüllen von Aqua dest. ausgeglichen. Die Schnitte wurden auf RT (ca. 30 min) abgekühlt. Dann wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. und anschließend 3 x 3 min in 1 x PBS gespült.

Absättigung unspezifischer Bindungen:

Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer überführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden auf jeden Objektträger 100µl 2%-iges Pferdeserum pipettiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 15 min in der feuchten Kammer bei RT.

Primärantikörperbehandlung:

Nachdem das Pferdeserum dekantiert war, wurden jeweils 100µl Primärantikörper (Maus anti-Human p16) auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper wurde in einer Endverdünnung von 1:80 eingesetzt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 3 min in 1 x PBS gewaschen.

Inkubation mit Sekundärantikörper:

Die Schnitte wurden mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG-biot.) in der Endverdünnung 1:200 (jeweils 100µl pro Schnitt) für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Inkubation mit Detektionsreagenz:

Die Herstellung des Avidin-Biotin Komplexes erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Schnitte wurden 3 x 3 min mit 1 x PBS gewaschen.

Der Avidin-Biotin Komplex wurde auf die Objektträger pipettiert (100µl pro Schnitt). Inkubiert wurde 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 3 min in 1 x PBS gespült.

Farbreaktion:

Als Reagenz wurde DAB verwendet. Die DAB-Gebrauchslösung wurde nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer für 15 min bei RT mit jeweils 200µl DAB-Gebrauchslösung inkubiert, danach in einer Küvette mit 1x PBS gesammelt und anschließend mit Leitungswasser gespült.

Gegenfärbung:

Vor dem Gegenfärben wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült und dann für 1 min in eine Hämatoxylin-Lösung gestellt. Das Bläuen erfolgte durch Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser (ca. 10 min).

Dehydrierung:

Vor dem Eindecken wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (jeweils 2 x 10 sec 80%-Ethanol, 95%-Ethanol, 100%-Ethanol). Danach wurden die Schnitte in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckelt.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparaten erfolgte semiquantitativ. Es ergaben sich vier Gruppen:

- keine positive Färbung sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma
- + schwache positive Färbung im Zytoplasma
- ++ deutlich positive Färbung im Zytoplasma und ggf. auch im Zellkern
- +++ starke positive Färbung im Zytoplasma und ggf. auch im Zellkern

Angesichts der Funktion von p16 bei der Zellzykluskontrolle und angesichts des beobachteten Verlusts der p16-Expression bei zahlreichen Tumoren (z.B. infolge von Genmutationen) waren bei Proben mit inhomogener p16-Reaktivität (13 Fälle) die Anteile mit der schwächeren Immunreaktivität ausschlaggebend für die Zuordnung.* Dementsprechend wurden die Proben mit überwiegend ++-Reaktivität sowie einem Anteil an Tumorzellen mit +++-Reaktivität einer ++-Immunreaktivität zugeordnet.

* Diskussion siehe Kapitel 5.

4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der Ki67-Expression

Das nukleäre zellproliferationsassoziierte Antigen Ki67 wurde mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 nachgewiesen.

Entparaffinierung: siehe oben

Methanolblockade:

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase im Gewebe wurden die Schnitte für 30 min in einer frisch angesetzten Methanol-H₂O₂-Lösung inkubiert, anschließend wurden die Präparate 2 mal kurz im Leitungswasser und nachfolgend 2 mal mit Aqua dest. gespült.

Demaskierung der Epitope (Mikrowellenvorbehandlung): siehe oben

Wie oben beschrieben wurde eine Mikrowellenvorbehandlung in Citratpuffer (pH 6,0) für 4 x 5 min bei 750 W durchgeführt.

Absättigung unspezifischer Bindungen: siehe oben

Wie oben beschrieben erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 2% Pferde-Normalserum für 20 min in der feuchten Kammer bei RT.

Primärantikörperbehandlung:

Der Primärantikörper (Maus anti-Ki67) wurde in einer Endverdünnung von 1:50 eingesetzt. Nachdem das Pferdeserum dekantiert war, wurden jeweils 100µl Primärantikörper auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 3 min in 1x PBS gewaschen.

Inkubation mit Sekundärantikörper: siehe oben

Inkubation mit Detektionsreagenz: siehe oben

Farbreaktion: siehe oben

Gegenfärbung: siehe oben

Dehydrierung: siehe oben

Bei der mikroskopischen Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte wurde die Zellproliferationsrate bestimmt, indem die Anzahl Ki-67-positiver Kerne pro 100 Zellkerne berechnet wurde.

4.2.3 DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial

Vorbereitung zur DNA-Isolierung:

Für die Isolierung des Gewebes aus dem Paraffin wurde zunächst eine Entparaffinierung durchgeführt. Aus dem Paraffinmaterial wurden semisteril drei ca. 8µm-dicke Schnitte in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG) überführt.

Dazu wurden 2 mal 600µl Xylol pipettiert. Der Inhalt wurde in 5 min-Intervallen insgesamt für 30 min auf dem Schüttler gemischt. Der Gewebeanteil wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm (Biofuge 13; Heraeus sepatech) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und zum Pellet wurden erneut 2 mal 600µl Xylol pipettiert, der Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und verworfen. In jedes ERG wurden 2 mal 600µl 100%-iges Ethanol zugefügt und das Gewebe 5 min lang inkubiert. Das Gefäß wurde während der Inkubation mehrmals invertiert. Anschließend wurde 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert und die Flüssigkeit aus den ERG's entfernt. Der Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach dem Abpipettieren von Ethanol aus den ERG's wurden die Gewebeproben 5 min bei 13000 Upm „trocken“ zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit sorgfältig abpipettieren zu können. Mit offenen Deckeln wurden die Reaktionsgefäße über ca. eine Std. (bis das Gewebe getrocknet war) bei 37°C im Inkubationsschrank inkubiert.

Isolierung genomischer DNA:

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Das getrocknete Pellet wurde mit Proteinase K-Lösung (weitere Angaben in der Herstelleranleitung) lysiert und über Nacht bei 56°C aufgeschlossen. An Proben, bei denen die DNA-Isolierung mit dieser Methode nicht erfolgreich war, wurde folgende Behandlung durchgeführt:

Zum getrockneten Pellet wurde zunächst ein Chelatbildner (etwa 5µg Chelex (BioRAD Lab, Richmond USA) und 150µl Aqua dest.) gegeben. Danach wurden die Reaktionsgefäße 20 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Reaktionsgefäßen auf die Säulen des Nucleo SpinTissue Kits (Macherey-Nagel) überführt und die weitere Behandlung ab Schritt 4 der Herstelleranweisung fortgeführt.

Alternativ wurde eine DNA-Extraktion nach Kiene et. al. 1992 durchgeführt:

Das getrocknete Pellet wurde mit etwa 5µg- Chelex (BioRAD Lab, Richmond USA) in 150µl - 200µl sterilem Aqua dest. in ERG's aufgemischt. Das Gemisch wurde 20 min im Wasserbad bei 100°C in der Mikrowelle bei 750 W gekocht. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf die Säulen des Nucleo Spin Tissue Kits (Macherey-Nagel) pipettiert und ab Schritt 4 nach der Herstelleranweisung weiter behandelt. Durch Anwendung einer der beschriebenen Methoden gelang es, aus allen zu untersuchenden Gewebeproben erfolgreich genomische DNA zu extrahieren.

4.2.4 PCR an DNA aus Paraffinmaterial

Zur Vorbereitung der SSCP-Analyse wurden die Exons 1, 2a und 2b des *p16*-Gens getrennt amplifiziert.

Zur Herstellung der gewünschten DNA-Amplifikate wurden für einen 50µl Gesamtansatz folgende Substanzen in ein Safe-lock-ERG pipettiert (Tab. 9 & 10):

Tabelle 9: Zusammensetzung der Unterphase

Unterphase			
10 µl	DNA-Lösung		
5 µl	10 x Puffer J	60 mM 15 mM 2 mM	Tris- HCl (pH 9,5) (NH ₄)SO ₄ MgCl ₂
2,5 µl	<i>p16</i> -Primer sense	50 pM	
2,5 µl	<i>p16</i> -Primer antisense	50 pM	
2,5 µl	steriles H ₂ O		
2,5 µl	DMSO	5%	

Unterphase + 1 Ampliwax- K ugelchen →

Inkubation im Thermocycler: 5' 80°C, 2' 20°C, ∞ 18°C.

Als Oberphase Zugabe von:

Tabelle 10: Zusammensetzung der Oberphase

Oberphase		
4 µl	dNTP's	100 µM
0,2 µl	Taq Polymerase	0,5 U
20,8 µl	steriles H ₂ O	

Es wurden bei jeder Amplifikation neben der Proben-DNA jeweils eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (Aqua sterile) mitgeführt.

Die Reaktion lief im Thermocycler (Biometra Trio Thermoblock) mit dem in Tab. 11 aufgeführten „touch down“-Programm ab. Nach Programm-Ende wurden die Proben im Thermocycler auf 20°C abgekühlt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Tabelle 11: Temperaturprogramm für die PCR (→ SSCP)

Exon 1, 2a und 2b	Phase I.	Phase II.	Phase III.
<u>Vorbehandlung:</u>	95°C 4,0 min		
<u>Denaturierung:</u>	95°C 1,0 min	95°C 1,0 min	95°C 1,0 min
<u>Annealing der Primer:</u>	65°C 1,0 min	60°C 1,0 min	55°C 1,0 min
<u>Kettenverlängerung:</u>	72°C 1,5 min für 4 Zyklen	72°C 1,5 min für 4 Zyklen	72°C 1,5 min für 34 Zyklen
<u>Nachbehandlung:</u>			72°C 6 min

4.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde ein 3%-iges Agarosegel in 1x Tris-Ac-Puffer mit 0,05µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Zum Vorbereiten der Proben für die Elektrophorese wurden 1µl einer 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, Gene Ruler™) und 10µl PCR-Produkt zusammenpipettiert.

Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurde die Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) in folgender Zusammensetzung verwendet:

- 1µl Gene Ruler™ 100bp DNA
- 1µl 6x Loading Dye Solution
- 9µl Aqua dest.

Nach Einbringen der Proben in die Geltaschen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 80 Volt in 1x Tris-Ac-Puffer über 35 min. Ausgewertet wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator, wobei die Dicke der mit Ethidiumbromid sichtbar gemachten Banden direkt mit der DNA-Menge korrelierte. War für eine Probe die Bande nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen, musste die entsprechende PCR wiederholt werden. Jedes Kontrollgel wurde zur Dokumentation fotografiert.

4.2.6 Single strand conformation polymorphism-Analyse (SSCP)

Vor der SSCP-Analyse wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kits (Qiagen, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die SSCP-Analyse wurde in einer TGGE-Apparatur (Qiagen, Hilden) in horizontalen MDE-Gelen (FMC, Rockland, USA) durchgeführt.

Herstellung des MDE-Gels:

Für die Herstellung eines 0,5x MDE-Gels wurden 10ml 2x MDE-Lösung, 2,4ml 10x TBE-Lösung, 27,6ml steriles Aqua dest. in einem Messzylinder gemischt. Für das Gel mit Glycerol für *p16* Exon 1 wurden entsprechend 22,6ml steriles Aqua dest. und 5ml Glycerol eingesetzt. Dann wurden 400µl 4% APS und 16µl TEMED dazu pipettiert. Nach abschließendem Mischen wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer Glaspipette in die vorbereitete Gelkammer möglichst luftblasenfrei eingebracht. Zum Auspolymerisieren wurde das noch flüssige Gel mindestens 40 min bei RT inkubiert.

Vorbereitung der Gelkammer:

Zur kompletten Gelkammer gehören zwei Glasplatten, ein Spacer, eine Gelträgerfolie und einige Klammern zum Fixieren. Beim Aufbau der Gelkammer wurde darauf geachtet, dass das Gel der hydrophilen Seite der Gelfolie anhaftet.

Vorbereitung der TGGE-Kammer:

Zur Vorbereitung der TGGE-Kammer wurden die Puffertanks mit jeweils 1l 0,6x TBE Puffer (60ml 1x TBE-Puffer auf 1l Aqua dest.) gefüllt. Das polymerisierte Gel wurde aus der Gelkammer entnommen und mit der Trägerfolie möglichst luftblasenfrei auf die mit etwas Aqua dest. befeuchtete Heizplatte gelegt. Dabei waren die Probenaschen zur Kathodenseite gerichtet. Überschüssige Flüssigkeit an den Rändern wurde vorsichtig entfernt. Das Gel wurde durch eine Abdeckfolie, die bis an die Taschen reichte, vor Austrocknung geschützt. In sterilem Wasser ausgekochte Puffertücher stellten den Kontakt zwischen Pufferreservoir und Gel her. Sie wurden beidseitig in 0,6x TBE-Puffer getaucht, gut durchtränkt und an der Kathodenseite des Gels bis auf etwa 5 mm an die Slots angenähert, an der Anodenseite des Gels wurden die Puffertücher etwa 3-4 cm auf das Gel gelegt. Auf die Weise wurde eine vollständige Pufferbrücke zwischen Anode und Kathode hergestellt. Gel und Puffertücher wurden anschließend mit einer Glasplatte abgedeckt, um einen besseren Kontakt zwischen den Puffertüchern und dem Gel zu gewährleisten.

Prä-Elektrophorese:

Die TGGE-Kammer wurde vorläufig geschlossen und der Heizblock mittels zweier Thermostaten auf 20°C eingestellt. Die Präelektrophorese erfolgte mindestens 30 min bei 6W bei dieser Temperatur.

Probenvorbereitung:

PCR-Produkte, die im Agarosegel nur schwach gefärbte Banden zeigten, wurden mit Isopropanol gefällt und anschließend in 6µl sterilem Aqua dest. gelöst.

Für die Fällung der PCR-Produkte wurden die „Samples“ bei 13000 Upm 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben aus den ERG's in neue 1,5ml große Gefäße übertragen. Zu jeder Probe wurden 80µl 75%-iges Isopropanol pipettiert. Die Proben wurden auf dem Schüttler gemischt.

Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zum Pellet wurden 250µl 75%-iges Isopropanol hinzugefügt, die Proben erneut aufgemischt und anschließend bei 13000 Upm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Proben wurden noch einmal 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der

verbleibende Überstand wurde abpipettiert. Die Pellets wurden genau 1 min bei 90°C im Eppendorf Thermomixer 5436 getrocknet. Die PCR-Produkte wurden dann in 6µl sterilem Aqua dest. aufgelöst.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:

Zur Denaturierung wurden 3µl PCR-Produkt mit 3µl Stop-Lösung zusammen pipettiert und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min im Wasserbad bei 90°C inkubiert. Zum Beenden der Denaturierung wurden die Proben für 2 min auf Eis gestellt und dann 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und erneut auf Eis gestellt.

Probeneinlauf:

Nach Ende der Präelektrophorese wurden der TGGE-Kammerdeckel und die beschwerende Glasplatte entfernt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert, das System wurde wieder geschlossen. Die Laufbedingungen für die jeweiligen Exons sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tabelle 12: Übersicht über SSCP-Laufbedingungen

Exon	Vorlauf (ohne Proben)	Probeneinlauf
1 (Gel mit Glycerol)	Temp.: 20° C Zeit: 30 min Spannung: 6 Watt	Temp.: 20° C
2a		Zeit: 3,5h
2b		Spannung: 6 Watt
		Zeit: 5,5h
		Spannung: 6 Watt

4.2.7 Silbernitratfärbung der SSCP-Gele

Das Prinzip der Silberfärbung von Nukleinsäuren beruht auf einer Komplexbildung der DNA mit Silberionen und anschließender Reduktion der Silberionen durch alkalisches Formaldehyd. Als Ergebnis färben sich die Banden im Gel schwarz an und werden dadurch sichtbar.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die Gelfolie aus der TGGE-Kammer entfernt und mit der Folienseite nach unten in eine Färbeschale gelegt. Es wurden für jeden Schritt der Farbreaktion etwa 200-300ml einer Lösung eingesetzt. Die Schale mit der Gelfolie wurde 2 x 3 min mit Puffer A zum Fixieren auf einem Schwenkgerät (Certomat TC 3, Braun) bewegt. Die Flüssigkeit wurde abgegossen. Anschließend wurde das Gel 10 min in Puffer B zur Komplexbildung bei leichtem Schwenken inkubiert. Puffer B wurde abgegossen und die Folie kurz in Aqua dest. gespült. Danach wurden die Silberionen-DNA-Komplexe im Gel mittels 20-minütiger Inkubation mit dem frisch angesetzten Puffer C entwickelt. Dann wurde die Pufferlösung entfernt, in die Schale Lösung D zum Abstoppen der Reaktion gegeben und für 10 min inkubiert. Abschließend wurde die Folie kurz mit Aqua dest. abgespült und in eine PE-Folie eingeschweißt.

4.2.8 Mikrodissektion der Tumorzellareale

Bei Proben, die in der SSCP-Analyse ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster aufwiesen, wurde an den Paraffinschnitten eine Mikrodissektion der Tumoreareale durchgeführt, damit *p16*-Aberrationen den Neoplasien zugeordnet werden konnten und nicht durch umgebendes Gewebe „verfälscht“ wurden.

Gewebevorbereitung:

Die Objektträger für die Mikrodissektion (beschichtet mit einer hydrophoben PEN-Folie und Poly-L-Lysin zur besseren Haftung der Paraffinschnitte) wurden freundlicherweise vom Herrn PD. Dr. med. Erbersdobler (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde nach entsprechender Anleitung des PALM-ServiceLABs vorbereitet.

2µm dicke Paraffinschnitte wurden in einem handwarmen Wasserbad gestreckt und auf die vorbereiteten Objektträger aufgezogen.

Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (2 min Xylol, 2 min Ethanol abs., 2 min 96% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, kurz in Aqua dest. spülen). Die Präparate wurden kurz (ca. 30 sec) in Methylgrün gefärbt und dann mit Aqua dest. abgespült. Nach dem Färben wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt (2 x 1 min 96% Ethanol, 2 x 1min Ethanol abs.) Da die Schnitte für die Mikrodissektion absolut

trocken sein müssen (der Laserstrahl kann den Flüssigkeitsfilm nicht durchdringen), wurden die Objektträger über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C getrocknet.

Mikrodissektion:

Mittels Laserenergie wurden Tumorareale unter optischer Kontrolle aus dem Gewebeverband herausgeschnitten und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß katapultiert (PALM System, P.A.L.M., Bernried).

DNA-Extraktion:

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte mittels NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Da es sich um geringe Materialmengen handelte, wurde das Gewebe in 60µl der Puffer-Lösung T1 gelöst und mit 8,4µl Proteinase K-Lösung inkubiert (Punkt 2 der Macherey-Nagel-Anleitung). Weitere Schritte der Isolation wurden nach der Anleitung durchgeführt. Beim letzten Schritt (Punkt 10) wurde die DNA lediglich mit 70µl des BE-Puffers aus der Säule eluiert, um die Konzentration des Isolates zu erhöhen.

DNA-Vorbereitung:

Die aus den mikrodissezierten Tumorarealen extrahierte DNA wurde amplifiziert (siehe Punkt 4.2.4). Zur Kontrolle wurde eine Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt (siehe Punkt 4.2.5). Anschließend wurde die SSCP-Analyse (siehe Punkte 4.2.6 und 4.2.7) durchgeführt. Die aberranten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) wurde die DNA entsprechend der Anleitung des Herstellers aus dem Gel herausgelöst.

4.2.9 PCR an DNA-Extrakten für die direkte Sequenzierungsreaktion

Zur Vorbereitung der DNA-Sequenzanalyse wurde eine PCR an DNA-Extrakten durchgeführt (siehe Punkt 4.2.4).

4.2.10 Vorbereitung der PCR-Produkte für die Sequenzierungsreaktion

Die PCR Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

Zur Entfernung von überschüssigen Primern, Pufferresten und anderen niedermolekularen Salzen wurden ein Centricon 100-Mikrofilter benutzt.

Das Amplifikat (ca. 50µl) wurde in Centricon 100-Röhrchen (Centricon YM-100, Amicon Bioseparations) überführt, mit 2ml sterilem Aqua dest. überschichtet und für 10 min in der Zentrifuge (Refrigerated Centrifuge Centricon H-401, HermleLabortechnik GmbH, Wehingen) bei 2900 Upm und 15°C (Rotor A 8.24) durch die ins Röhrchen integrierte Membran zentrifugiert. Dabei konnten die hochmolekularen DNA-Fragmente die Filtermembran nicht passieren, so dass das Filtrat, das die niedermolekularen membrangängigen Bestandteile enthält, verworfen werden konnte. Anschließend wurden 2ml steriles Aqua dest. auf die Säule gegeben und über 20 min bei 2900 Upm und 15°C zentrifugiert, das Filtrat wurde verworfen. Der sog. Mikrokonzentrat mit der Membran wurde dann auf ein kleines Hütchen umgedreht und 3-5 min bei 1500 Upm bei 15°C zentrifugiert, um die gewünschte DNA aus der Membran herauszulösen. Als Ausbeute erhielt man ungefähr 50µl einer gereinigten DNA-Lösung. Danach wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.5) mit 3µl DNA-Ansatz durchgeführt.

4.2.11 Sequenzreaktion

Für die Sequenzreaktion wurde ein Abi Prism[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet. Von jeder Probe wurden 2 Ansätze vorbereitet, entsprechend für die Sense- und Antisense-DNA-Stränge.

Für die Sequenzreaktion wurden für einen 20µl Gesamtansatz folgende Substanzen in ein 50µl-Safe-lock ERG pipettiert:

11,2 µl	PCR - Produkt (ca. 30ng DNA- Amplifikat)
3,2 µl	1µM Primer (Sense bzw. Antisense entsprechend)
8 µl	Reaktionsmix
1 Tr.	Mineralöl

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Biometra Trio Thermoblock) mit folgendem Zyklusprogramm ab: 30" 96°C, 15" 50°C, 4' 60°C, 25 Zyklen. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben im Thermocycler auf 4°C abgekühlt.

4.2.12 Aufarbeitung nach der Sequenzierungsreaktion

Das Mineralöl wurde von der Oberfläche vorsichtig abpipettiert. Zur Abtrennung der nicht aufgebrauchten Terminatoren wurde die DNA mit 75%-igem Isopropanol gefällt. Dabei wurden die „Samples“ bei 13000 Upm 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben aus den ERG's in neue 1,5ml große Eppendorf-Gefäße übertragen. Zu jeder Probe wurden 80µl 75%-iges Isopropanol pipettiert. Die Proben wurden auf dem Schüttler gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zum Pellet wurden 250µl 75%-Isopropanol hinzugefügt, die Proben erneut aufgemischt und anschließend bei 13000 Upm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Proben wurden anschließend 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Rest wurde abpipettiert. Die Pellets wurden genau 1 min bei 90°C im Heizblock getrocknet. Für die weitere Aufarbeitung und Auswertung der Daten wurden die Proben an das Servicelabor des Institutes für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Richter) weitergeleitet. Die zurückerhaltenen Daten wurden kritisch ausgewertet und sind im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellt.

4.2.13 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung von experimentellen Ergebnissen sowie klinischen Daten wurden mehrere statistische Methoden eingesetzt. Zur Analyse von kategorialen Merkmalen wie p16-Expression, Proliferationsraten und epidemiologischen Daten des Patientenkollektivs wurden rxc-Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Test benutzt. Die Analyse von Überlebenszeiten, Dauer des Überlebens ohne Lokalrezidiv bzw. Fernmetastasen erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Vergleich der Überlebenskurven mehrerer Grundgesamtheiten in Abhängigkeit von p16-Expression bzw. Proliferationsraten wurden mit Hilfe des Logrank-Tests durchgeführt (Trampisch et al. 2000).

5 Ergebnisse

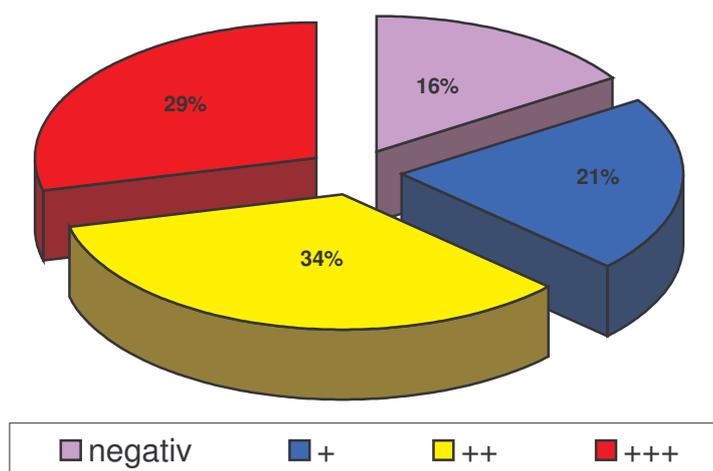
Unter Verwendung der im Methodenteil beschriebenen Methoden wie der Immunhistologie, der PCR, der SSCP-Analyse und der direkten Sequenzierung wurde das Gewebematerial von Speichelgangkarzinomen (n=41) von insgesamt 38 Patienten hinsichtlich Mutationen im *p16*-Gen untersucht.

5.1 Immunhistologie

5.1.1 p16-Expression

Alle Gewebeproben wurden unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers immunhistochemisch auf Verlust bzw. verminderte Expression oder Überexpression des p16-Proteins untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1). Der Nachweis wurde als positiv gewertet, wenn mikroskopisch eine zytoplasmatische sowie nukleäre Färbung der Tumorzellen erkennbar war (Nielsen et al. 1999, Saito et al. 1999, Shintani et al. 2000). Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

Abbildung 3: Immunhistochemie. p16-Expression in SDC



Von den 38 untersuchten Fällen zeigten 32 eine positive Reaktion (mit unterschiedlichen Ausprägungen der Farbintensität), 6 Fälle zeigten keine p16-Expression. (Siehe Abb. 4 und Abb. 5). Im Fall 26 überwog im Normalgewebe eine zytoplasmatische Färbung (++-positive), das Tumorgewebe (T) zeigte weder zytoplasmatische noch nukleäre p16-Reaktivität.

Abbildung 4: p16-Immunhistochemie. +++-p16-Expression in SDC (starke nukleäre und zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen)

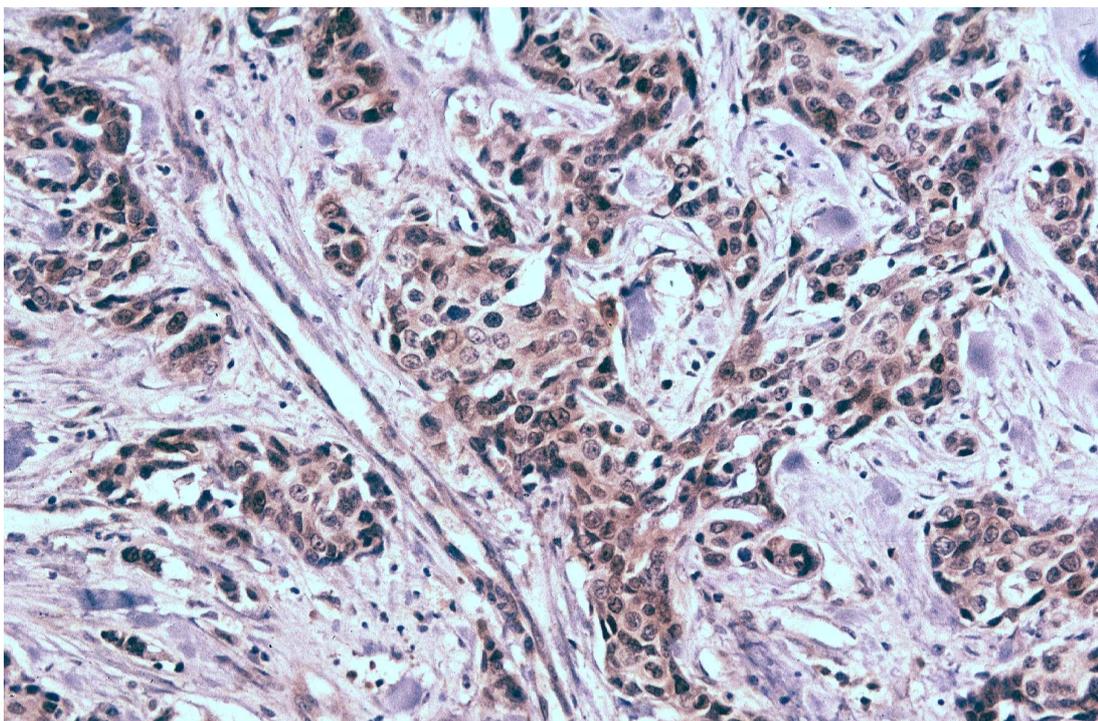
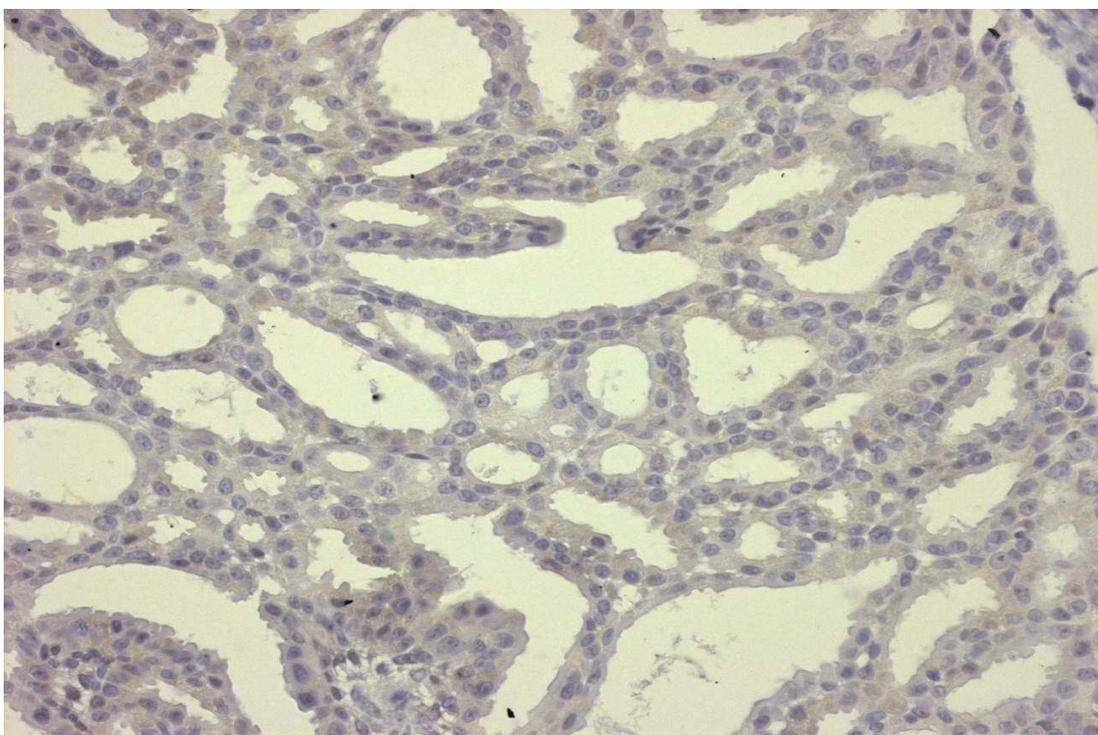


Abbildung 5: p16-Immunhistochemie. Fehlende p16-Expression in SDC



Anschließend wurde mittels statistischer Analysen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der p16-Expression und Proliferationsraten sowie epidemiologischen Daten hinsichtlich prognostischer Aussagen besteht (siehe 5.4.1-3).

5.1.2 Ki67-Expression

Eine erhöhte Proliferationsaktivität der Tumorzellen, gekennzeichnet durch auffällig hohe Mitosenzahl sowie pathologische Mitosen und kräftige Basophilie der Kerne, zeichnete sich bereits konventionell-mikroskopisch ab. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MIB-1 wurden die Proliferationsraten im Tumorgewebe immunhistochemisch bestimmt.

Über die Anzahl der Ki67-positiven Kerne wurde die Proliferationsrate in den Tumorgeweben quantifiziert (Abb.6). Insgesamt zeigten 68% der Fälle eine hohe (mehr als 25% Tumorzellen Ki67-positiv) Wachstumsfraktion (Abb.7 & 8).

Abbildung 6: Ki67-Expression im Tumorgewebe von SDC (ca. 45% der Zellkerne positiv, braun gefärbt)

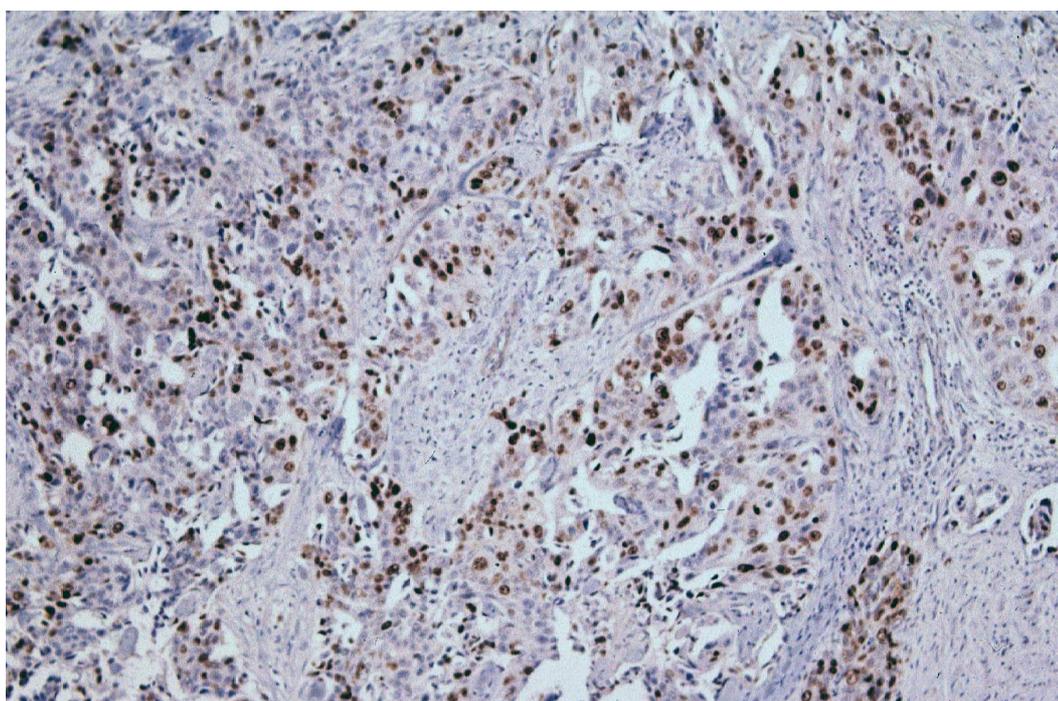
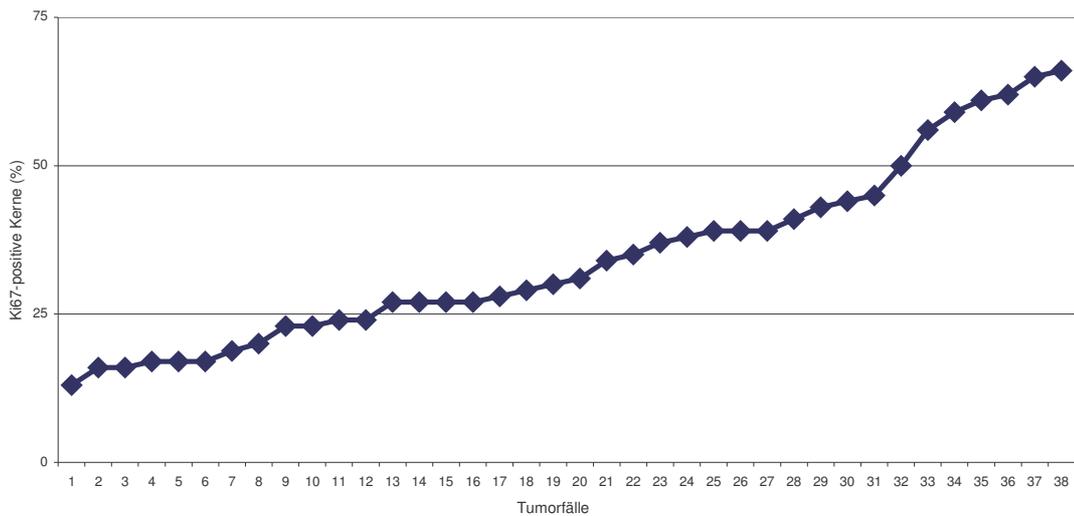
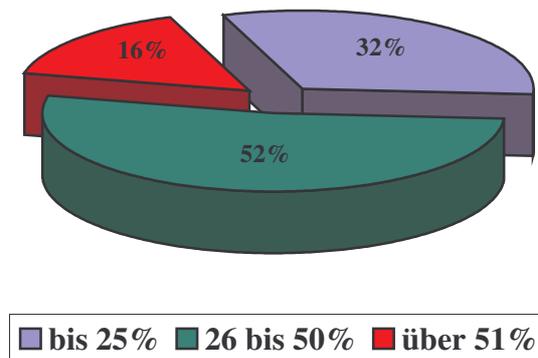


Abbildung 7: Ki67-Expression in SDC



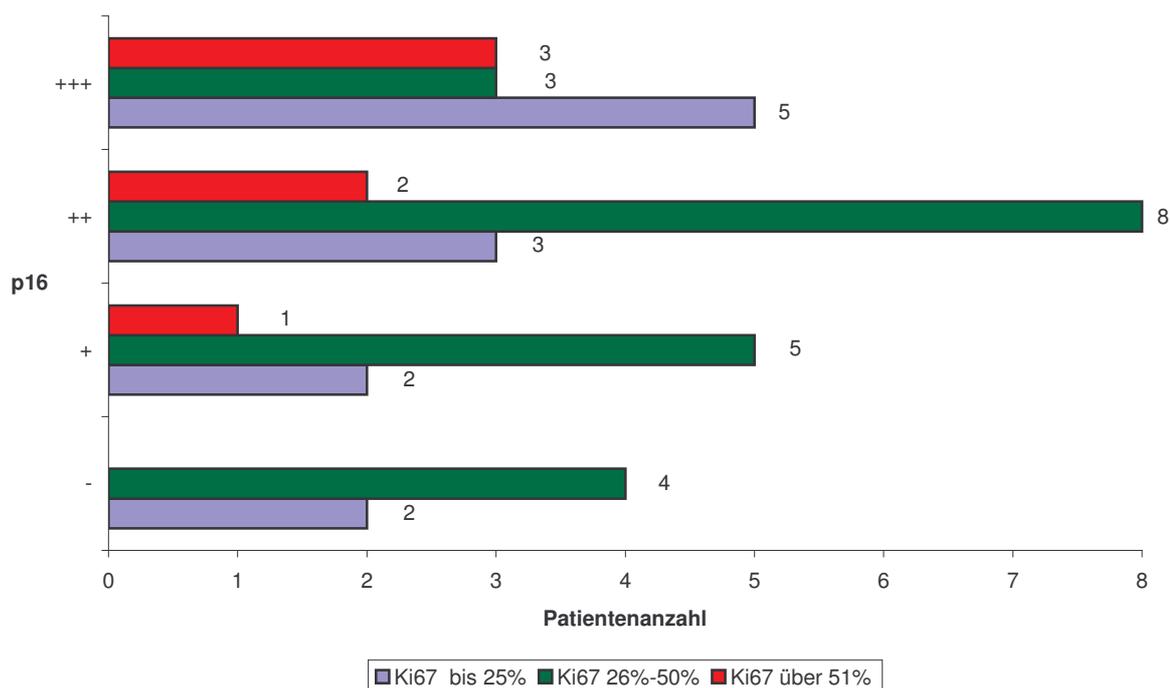
Zur statistischen Analyse eines möglichen Zusammenhangs einer erhöhten Proliferationsrate mit weiteren Merkmalen wurden die Proliferationsraten entsprechend dem prozentuellen Anteil Ki67-positiver Kerne in drei Gruppen eingeteilt (Abb.8).

Abbildung 8: Ki67-Expression in SDC



Eine Verteilung der Proliferationsraten entsprechend der p16-Expressionsgrade ist in der Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Abbildung 9: p16- und Ki67-Immunhistochemie



Mittels statistischer Analysen wurde anschließend untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen p16-Expression und proliferativer Aktivität der Tumorzellen besteht (s. 5.4.4).

5.2 Mutationsanalyse

5.2.1 SSCP-Analyse

5.2.1.1 Probenauswahl

Für die SSCP-Analyse wurden sechs Fälle mit immunhistologisch fehlender p16-Expression, fünf Fälle mit schwacher p16-Expression, sechs Fälle mit mittlerer und drei Fälle mit starker p16-Immunreaktivität ausgewählt (s. Tab. 13).

Tabelle 13: Fallauswahl für die SSCP-Analyse

Fall	Geschlecht	Alter	TNM-Stadium	p16-Expression	Ki67	SSCP für p16-Exon	Aberrante Banden im p16-Exon
3	m	55	pT2N0M0	-	39	1&2b	Wt
14	m	69	pT2N2bM0	-	24	1&2b	1
21	m	47	pT3N0M0	-	27	1&2b	1
22	w	29	pT3N0M0	-	27	1&2b	1
23	w	41	pT3N0M0	-	17	1&2b	Wt

Fall	Geschlecht	Alter	TNM-Stadium	p16-Expression	Ki67	SSCP für p16-Exon	Aberrante Banden im p16-Exon
26	m	73	Normalgewebe	++	-	1&2b	1
			pT3N2bM0	-	28		Wt
8	m	66	pT2N0M0	+	43	1&2b	Wt
17	m	61	pT2N2M0	+	39	1&2b	1
20	m	76	pT3N2bM0	+	38	1&2b	1&2b
25	m	52	pT3N1M0	+	29	1&2b	1
32	m	68	pT4N2bM0	+	34	1&2b	1
1	w	78	pT1N0M0	++	37	1&2b	1
2	w	47	pT2N0M0	++	66	1&2b	1
9	m	70	pT2N0M0	++	44	1&2b	1
16	m	68	pT2N2cM0	++	35	1&2b	Wt
24	w	69	pT3N1M0	++	59	1&2b	1
34	w	50	T4N0M0	++	39	1&2b	2b
11	w	82	pT2N1M0	+++	62	1&2b	Wt
29	m	70	Normalgewebe	+++	-	1&2b	Wt ^{*1}
			pT3N2M0		27		1
35	w	49	T4N2bM0	+++	65	1&2b	Wt

Tabelle 14: Zusammenfassung der SSCP-Ergebnisse

Anzahl der Proben	Anzahl der Fälle	p16-Expression	P16-Mutation im SSCP			
			Exon 1	Exon 2b	Exon 1 & 2b	Wildtyp
7	6	-	4	0	0	3
5	5	+	3	0	1	1
6	6	++	4	1	0	1
4	3	+++	1	0	0	3

Fälle, die ein verändertes Laufverhalten der DNA in der SSCP-Elektrophorese zeigten (Tab. 13 & 14), wurden mikrodissiziert. Die DNA aus den Tumoranteilen wurde separat mittels SSCP analysiert. Auf diese Weise konnte eine mögliche Kontamination der Tumorzell-DNA durch korrespondierende Bindegewebskomponenten und/oder entzündliche Komponenten sowie eine Beeinträchtigung des Laufverhaltens durch nekrotisches Gewebe ausgeschlossen werden. In 14 von 22 mittels SSCP untersuchten Proben (20 Fälle) wurden aberrante Banden nachgewiesen.

^{*1} Wildtyp

5.2.1.2 p16-Mutationen in Speicheldrüsenkarzinomen

Für das veränderte Laufverhalten der DNA in der Elektrophorese können Mutationen im *p16*-Gen verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, wurden Exon 1 und Exon 2b des *p16*-Gens untersucht. 12 Proben zeigten für Exon 1 und eine Probe zeigte für Exon 2b ein verändertes Laufverhalten. Eine Probe wies aberrante Bandenmuster in Exon 1 und 2b, acht Proben (sechs Fälle) wiesen Wildtyp-Bandenmuster auf (s. Tab. 13 & 14). Mittels PCR ließ sich Exon 2a des *p16*-Gens nicht für alle Fälle amplifizieren. Obwohl bei der SSCP-Analyse der PCR-Amplifikate für *p16* Exon 2a DNA-Singlestränge identifiziert werden konnten, wiesen die Sequenzen der aus dem SSCP-Gel isolierten und reamplifizierten Banden diffuse Sequenzfehler auf und waren nicht verwertbar*.

5.2.2 Sequenzanalyse

5.2.2.1 Probenauswahl für die Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte ausschließlich an den mikrodisezierten Fällen, die Veränderungen im Bandenmuster bei der SSCP-Analyse zeigten und damit eine vorhandene Mutation vermuten ließen. Jede Sequenz wurde in beiden einander komplementären DNA-Strängen auf Mutationen überprüft.

Vier von sieben p16-negativen Proben, vier von fünf Proben mit schwacher Positivität, fünf von sechs Proben mit deutlich positiver Färbung und ein Fall mit kräftig positiver Reaktivität zeigten in der SSCP-Analyse mutationsverdächtige Mobilitätsveränderungen (n=14) und wurden für die direkte Sequenzierung ausgewählt.

5.2.2.2 p16-Mutationen

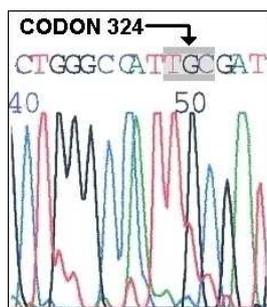
Durch direktes Sequenzieren konnten Mutationen nur in zwei von 14 Fällen (Fall 20 und 34) bestätigt werden (Abb. 11).

Immunhistochemisch wiesen diese zwei Fälle eine mittlere (++) bzw. schwache (+) p16-Expression auf. Es konnten zwei Punktmutationen in Exon 2b im Sinne einer

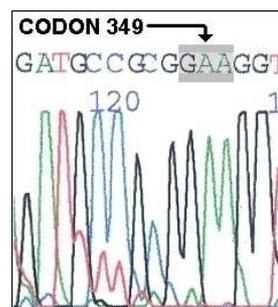
* Diskussion im Kapitel 6

Transition in Codon 324 (Austausch gleichnamiger Basen: Pyrimidin → Pyrimidin) und einer Transversion in Codon 349 (Purin → Pyrimidin) beobachtet werden (s. Abb. 10 und Tab. 15). Die entdeckten Mutationen wurden in einem der beiden einander komplementären DNA-Strängen nachgewiesen. Alle weiteren aufgrund SSCP-Analyse vermuteten Mutationen konnten nicht bestätigt werden.

Abbildung 10: Mutationen im *p16* Exon 2b



Fall 34



Fälle 20 und 34

Abbildung 11: SSCP-Mutationsanalyse in Speichelgangkarzinomen, *p16* Exon 2b

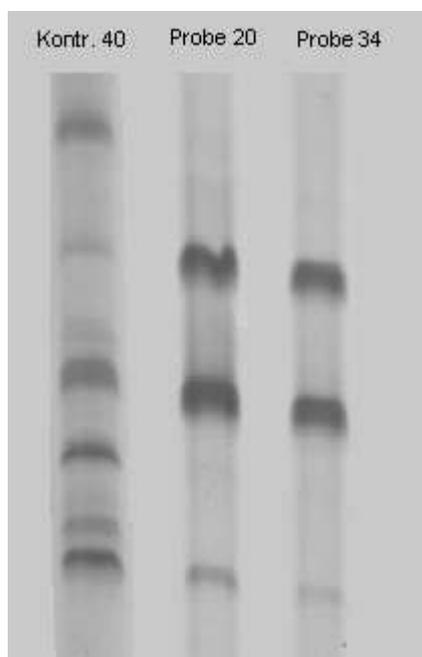


Tabelle 15: Sequenzierungsergebnisse

Speicheldrüsenkarzinom					
Fall	Alter	IHC**2	SSCP	Codon	p16-Mutation bestätigt durch Sequenzierung
1	78J	++	Exon 1		nicht bestätigt
25	52J	++	Exon 1		
22	29J	-	Exon 1		
24	69J	+++	Exon 1		
17	61	+	Exon 1		
34	50J	++	Exon 2	324**3 349**3	CGC → TGC Arg → Cys CAA → GAA Gln → Glu
2	47J	++	Exon 1		nicht bestätigt
14	69J	-	Exon 1		nicht bestätigt
20	76J	+	Exon 1		nicht bestätigt
			Exon 2	349**3	CAA → GAA Gln → Glu
32	68J	+	Exon 1		nicht bestätigt
9	70J	++	Exon 1		
21	47J	-	Exon 1		
29	70J	+++	Exon 1		
Normalgewebe					
26	73J	++	Exon 1		nicht bestätigt

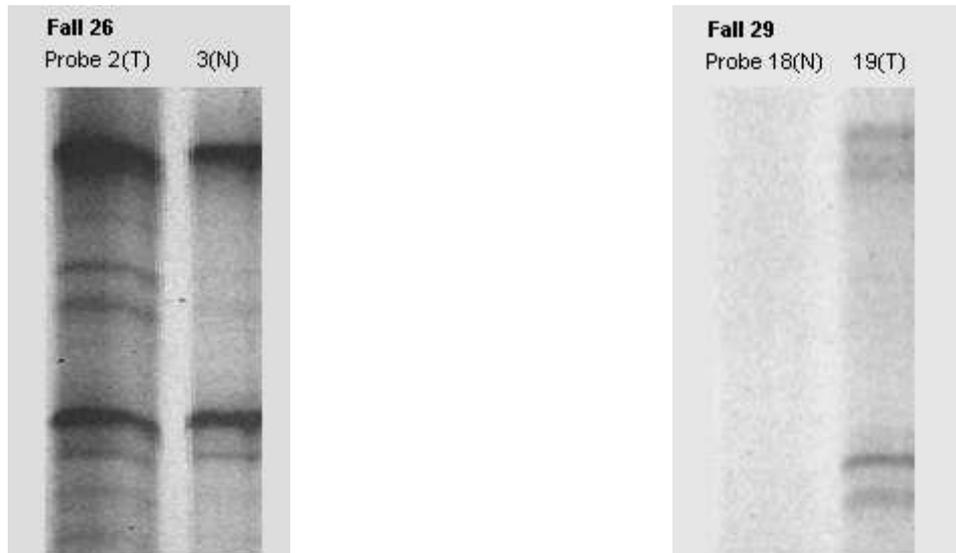
Ein Problem bei der retrospektiven Untersuchung von Material aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister war, dass die vorhandenen Paraffinblöcke fast ausschließlich Tumoranteile enthielten.

Somit standen für Kontrolluntersuchungen an korrespondierendem „Normalgewebe“ nur zwei Proben zur Verfügung. Eine Probe (Fall 29) ergab in der SSCP-Analyse für Normal- (N) und Tumorgewebe (T) unterschiedliche Bandenmuster für Exon1 des p16-Gens. In der Sequenzanalyse konnte jedoch keine Mutation nachgewiesen werden. Das Bandenmuster des Tumorgewebes im Fall 26 entsprach einem Wildtyp-Bandenmuster, was nicht für das Vorliegen einer genetischen Aberration sprach (siehe Tab. 13, Abb. 12).

** 2 – negative; + schwach positive; ++ deutlich positive; +++ stark positive Reaktion,

**3 Nummerierung laut Husussian (Husussian et al. 1994)

Abbildung 12: Mutationsanalyse im korrespondierenden Speicheldrüsengewebe, *p16* Exon 1

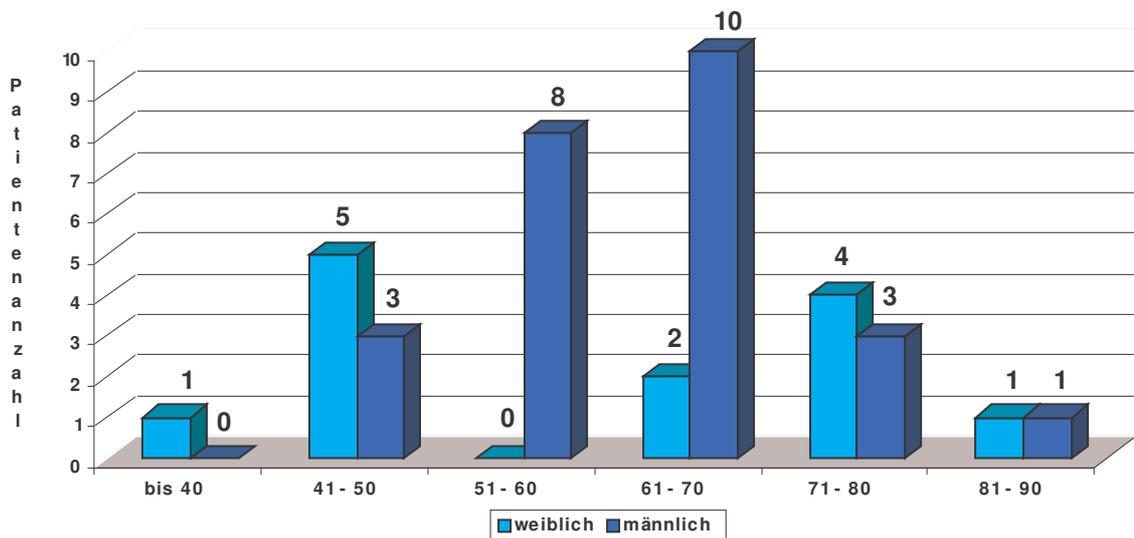


5.3 Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs

5.3.1 Alter und Geschlecht

Von der Erkrankung waren überwiegend männliche Patienten (65,8%) im höheren Alter im sechsten (32%) und siebten (40%) Lebensjahrzehnt betroffen. Bei Frauen trat der Tumor gehäuft in der fünften (38,5%) Lebensdekade auf (Abb. 13.). Das durchschnittliche Alter der PatientInnen betrug 61 Jahre (29 bis 82 Jahre).

Abbildung 13: Altersverteilung

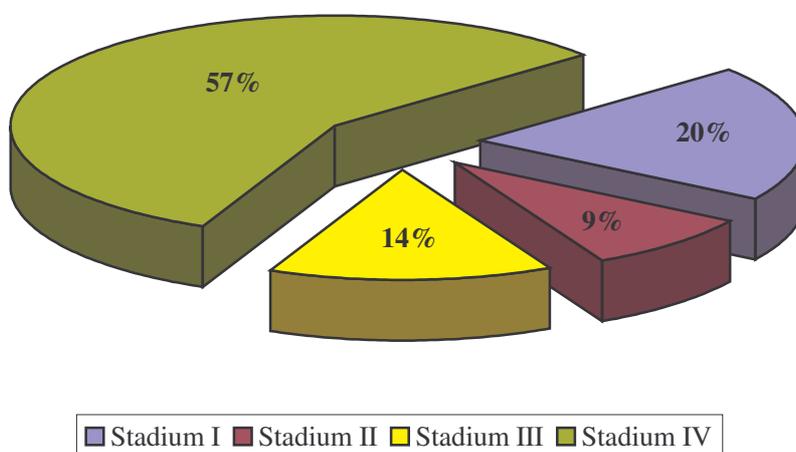


5.3.2 Tumorstaging

Speichelgangkarzinome (57%) im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung waren im untersuchten Patientenkollektiv überproportional vertreten (Abb. 14).

24 Patienten (68,6%) hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Lymphknotenmetastasen; keiner der Patienten (n=35) hatte Fernmetastasen. Bei vier Patienten lagen relativ große Primärtumoren in den Stadien pT3 (n=3) und pT4 (n=1) vor, jedoch ohne nachweisbare Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen.

Abbildung 14: Tumorstaging



5.3.3 Risikofaktoren und Vorerkrankungen

Als potentielle Risikofaktoren konnten bei sechs (17%) von 35 Patienten Nikotin und/oder Alkohol-Konsum anamnestisch festgestellt werden. Bei fünf Patienten (14,3%) lag ein Erstkarzinom vor (BlasenCa, PortioCa, MammaCa, PlattenepithelCa der Mundschleimhaut). Bei zwei Patienten (5,7%) wurde in der Vorgeschichte eine gutartige Neoplasie festgestellt. Fall 30 wies in der Vorgeschichte einen „gutartigen Misch tumor“ der Parotis und Fall 2 ein „hellzelliges Adenom“ der Parotis auf.

5.3.4 Klinischer Verlauf

Die Dauer der Beschwerden (bezogen auf eine Raumforderung) schwankte zwischen zwei Wochen und 16 Monaten, der Mittelwert betrug 8 Monate (Tab. 16).

Ein Lokalrezidiv entwickelten 20 von 35 Patienten, davon zwei Patienten innerhalb von 12 Monaten, 12 Patienten innerhalb von zwei Jahren, vier Patienten innerhalb des dritten Jahres nach Behandlung und zwei Patienten zu einem noch späteren Zeitpunkt

Zum zensierten Zeitpunkt hatten 23 von 35 Patienten Fernmetastasen entwickelt. Drei Patienten entwickelten Fernmetastasen innerhalb eines Jahres, der überwiegende Anteil (n=17) zeigte diese innerhalb eines Zeitraumes von drei Jahren oder später (n=3) (Tab. 16).

Zum zensierten Zeitpunkt wurde in 22 Fällen eine tumorbedingte Todesursache festgestellt, in sechs Fällen lag ein nicht tumorbedingter Tod bzw. eine unbekannte Todesursache vor. Sieben Patienten waren zum Zeitpunkt der Studie noch am Leben (Tab. 16).

Tabelle 16: Klinischer Verlauf

Raumforderung	Häufigkeit	%
weniger als 6 Monate	10	28,6
6 bis 12 Monate	15	42,9
12 und mehr Monate	10	28,6
Gesamt	35	100,0

Exitus	Häufigkeit	%
am Leben	7	20
Tod nicht tumorbedingt	4	11,4
Tod tumorbedingt	22	62,9
Todesursache unbekannt	2	5,7

Fernmetastasen	Häufigkeit	%
bis 12 Monate	3	8,6
12 bis 36 Monate	17	48,6
36 bis 60 Monate	1	2,9
später als 60 Monate	2	5,7
keine FM	11	31,4
keine Angaben	1	2,9
Gesamt	35	100,0

Rezidivzeit	Häufigkeit	%
bis 12 Monate	2	5,7
12 bis 24 Monate	12	34,3
24 bis 36 Monate	4	11,4
später als 36 Monate	2	5,7
kein Rezidiv	15	42,9
keine Angaben	0	0
Gesamt	35	100,0

Als Metastasierungsorgane waren die Lungen mit 72,7% und das Skelettsystem mit 31,8% am häufigsten betroffen, gefolgt von der Leber mit 14% sowie dem Gehirn, der Aderhaut, den Nieren und der Milz mit jeweils 5%. Fünf Patienten wiesen Fernmetastasierung mit Beteiligung mehrerer Organe auf.

5.4 Statistische Auswertung

5.4.1 Assoziation der p16-Expression zu klinischen Daten und Proliferationsrate

Eine statistische Prüfung der Assoziation mittels Kontingenztafeln und ein Signifikanztest (Chi-Quadrat-Test) ergaben keinen Zusammenhang zwischen p16-Expression und Geschlecht, Alter, Lokalisation des Tumors, Vorerkrankungen, Risikofaktoren und Proliferationsrate (Tab. 17). Es konnte jedoch eine signifikante Assoziation zwischen der p16-Expression und dem Tumorstaging ($p=0,01$) nachgewiesen werden (Tab. 17 & 18).

Tabelle 17: Chi-Quadrat-Test

Chi-Quadrat-Test		Geschlecht	Alter	Lokalisation	Risikofaktoren	Vorerkrankungen	Ki67	Staging
p16	p-Wert	0,79	0,81	0,68	0,54	0,41	0,55	0,01

Tabelle 18: Kontingenztafel: Staging und p16-Expression

Staging	p16-Expression				Summe
	negativ	+	++	+++	
I,observed	1	2	3	1	7
I,expected	1,200	1,6	2,4	1,8	7
II,observed	3	0	0	0	3
II,expected	0,514	0,68571429	1,02857143	0,77142857	3
III,observed	0	0	2	3	5
III,expected	0,857	1,14285714	1,71428571	1,28571429	5
IV,observed	2	6	7	5	20
IV,expected	3,429	4,57142857	6,85714286	5,14285714	20
Summe	6	8	12	9	35

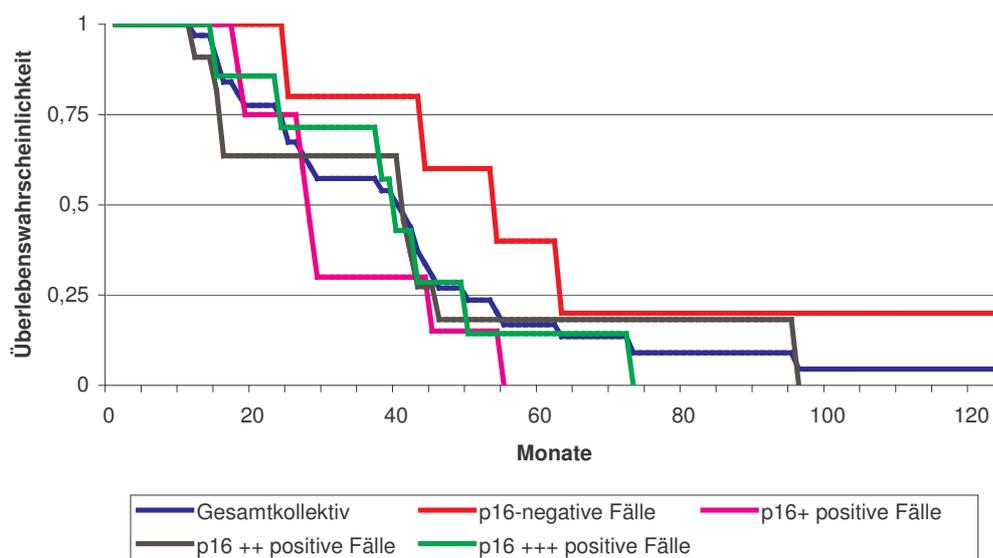
Als Nullhypothese wurde angenommen, dass das Staging und die p16-Expression unabhängige Merkmale sind. Mittels rxc-Kontingenztafeln wurden die Abweichungen der beobachteten von den erwarteten geschätzten Häufigkeiten berechnet und auf Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test überprüft. Es wurden signifikante Abweichungen der beobachteten Häufigkeiten von den erwarteten Häufigkeiten festgestellt ($p 0,01$), so dass die Nullhypothese abzulehnen war.

5.4.2 p16-Expression und die Überlebenszeiten

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten im Gesamtkollektiv sowie in Abhängigkeit von der p16-Expression wurden nach Kaplan-Meier berechnet (Abb. 15). Die Überlebensraten der Gesamtstichprobe verteilten sich folgendermaßen: Die drei-Jahres-Überlebensrate betrug 57,3%, die fünf Jahres-Überlebensrate betrug 16,8% und die 8-Jahres-Überlebensrate betrug 4,5 %.

Mittels Logrank-Test wurde die Abweichung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von unterschiedlicher p16-Expression im Vergleich zum Gesamtkollektiv überprüft. Hierbei ergab sich keine signifikante Abweichung im Vergleich zur Überlebensrate des Gesamtkollektivs (Abb. 15, Tab. 19).

Abbildung 15: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier



5.4.3 p16-Expression und Lokalrezidive / Fernmetastasen

Die Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit ohne das Auftreten von Fernmetastasen und ohne Manifestation von Lokalrezidiven bei unterschiedlicher p16-Expression (Logrank-Test) ergab keine signifikanten Unterschiede zum Gesamtkollektiv (Tab. 19).

Tabelle 19: Logrank-Test

Logrank-Test		LR	FM	Überlebensfunktion
p16	pWert	0,08	0,83	0,45

5.4.4 Assoziation der Proliferationsrate zu p16 und klinischen Daten

Ob die Proliferationsrate (bestimmt mittels Ki67-Expression) mit den weiteren Faktoren wie Geschlecht, Alter, Lokalisation des Tumors, Risikofaktoren, Vorerkrankungen und p16-Expression in den Tumorzellen assoziiert ist, wurde mittels Kontingenztafeln und einer Signifikanzprüfung mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Es war keine Assoziation erkennbar. (s. Tab. 20).

Tabelle 20: Chi-Quadrat-Test

Chi-Quadrat-Test		Geschlecht	Alter	Lokalisation	Risikofaktoren	Vorerkrankungen	p16	Staging
Ki67	p-Wert	0,15	0,81	0,33	0,63	0,68	0,55	0,9

5.4.5 Proliferationsrate und Überlebenszeiten

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Proliferationsraten zeigten keine signifikante Abweichung im Vergleich zum Gesamtkollektiv (Logrank-Test, Tab. 21). Die Analyse einer möglichen Abhängigkeit des Auftretens von Fernmetastasen bzw. Lokalrezidiven von der Proliferationsrate (Logrank-Test) ergab keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Gesamtkollektiv (Tab. 21).

Tabelle 21: Logrank-Test

Logrank-Test		LR	FM	Überlebensfunktion
Ki67	pWert	0,51	0,18	0,67

5.4.6 p16-Mutationen in Speichelgangkarzinomen

Angesichts der geringen Anzahl von Fällen mit nachgewiesenen Mutationen im p16-Gen (n=2) war eine statistisch korrekte Auswertung nicht möglich.

6 Diskussion

Die Rarität der Speichelgangkarzinome und die erst 1991 erfolgte Anerkennung dieses Tumors als eigenständige Entität erklären, weshalb Untersuchungen zum Speichelgangkarzinom bisher nur in wenigen Studien und mit geringer Probandenanzahl durchgeführt wurden (Fayemi und Tocker 1974, de Araujo et al. 1987, Simpson et al. 1991, Anderson et al. 1992, Butterworth et al. 1992, Colmenero Ruiz et al. 1993, Dee et al. 1993, Delgado et al. 1993). Bei einer insgesamt sehr schlechten Prognose des Tumors konnten bisher keine prognostisch relevanten Marker bestimmt werden.

Ein Funktionsverlust von p16 hat grundlegende Auswirkungen auf die Kontrolle des Zellwachstums, so dass ein Ziel dieser Arbeit die Abklärung der Bedeutung der p16-Expression für die Prognose des Speichelgangkarzinoms war. Die Ursachen für eine fehlende p16-Expression sollten mittels *p16*-Mutationsanalyse geklärt werden und in Kombination mit den klinischen Daten sollte die Beziehung zwischen veränderter p16-Expression, Mutationen im *p16*-Gen und ätiologisch sowie prognostisch relevanten Merkmalen analysiert werden.

6.1 Klinische Daten

Bestätigt werden konnte auch in dieser Studie, dass Männer häufiger als Frauen (2:1) im höheren Alter (Männer: 6./7. Dezennium; Frauen: 5. Dezennium) an diesem Tumor erkranken (Ellis und Auclair 1996). Die Lokalisation des Tumors in der Gl. Parotis lag in der vorliegenden Studie bei 78,9%. Dies entspricht in etwa den Beobachtungen von Kleinsasser et al. (1968), Delgado et al. (1993) und Felix et al. (1996), die eine Lokalisation des SDC in der Gl. Parotis in über 90% der Fälle beschrieben.

Abweichend von den bisherigen Untersuchungsergebnissen wurde in dieser Studie lediglich in 15,8% der Fälle eine manifeste Fazialisparese festgestellt. Delgado et al. (1993) und Simpson et al. (1991) berichteten über eine manifeste Fazialisdysfunktion bzw. Fazialisparese in über 25% der Fälle. Laut Seifert (1996 (b)) kommen in ca. 40% der Fälle Fazialiskomplikationen vor.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie anhand der ermittelten klinischen Daten die schlechte Prognose des Tumors bestätigt werden. 58% der Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv innerhalb von drei Jahren, 69% entwickelten Fernmetastasen, davon 57% innerhalb von drei Jahren.

Diese Zahlen liegen sogar über den von Seifert (1996 (b)) publizierten Auswertungsergebnissen (FM 55-60%, LR 30-35%). In der vorliegenden Studie wurde ein tumorbedingter Tod in 63% der Fälle festgestellt, ein Ergebnis, das nur geringfügig von der von Seifert (1996 (b)) sowie Afzelius et al. (1987) beschriebenen Mortalität von ca. 70% bzw. 73% abweicht. Mangelnde Übereinstimmung und Streuungen der Ergebnisse bei den einzelnen Studien können u.a. in der geringen Anzahl von Fällen begründet sein.

6.2 Immunhistochemie

6.2.1 p16-Expression

Das p16-Protein wurde in dieser Studie mit monoklonalen Antikörpern (Klon G175-405) nachgewiesen und zeigte, wie in mehreren Arbeiten beschrieben, eine sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung der Tumorzellen (Milde-Langosch et al. 1998, 1999 und 2001, Nielsen et al. 1999, Shintani et al. 2000). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Speichelgangkarzinome zeigten in 32 Fällen (84%) eine positive Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper gegen p16-Protein, lediglich 6 Fälle (16%) zeigten keine p16-Expression. Einen ähnlich geringen Anteil an Tumoren mit einem Verlust der p16-Expression zeigten adenoidzystische Karzinome der Speicheldrüsen mit 13,6% (Shintani et al. 2000) und Ovarialkarzinome (Milde-Langosch et al. 1998), sowie Speichelgangkarzinome (Etges et al. 2003) mit 20% der untersuchten Fälle. In der vorliegenden Studie konnte überwiegend eine mittlere (34%) bis starke (29%) p16-Expression im Tumorgewebe festgestellt werden; eine geringe p16-Expression zeigten 21% (n=8) der Fälle.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Paraffinblöcke aus dem Hamburger Speicheldrüsenregister enthielten fast ausschließlich Tumoranteile, so dass nur in zwei Fällen Proben mit korrespondierendem Normalgewebe vorlagen. Hinsichtlich der Unterschiede in der p16-Expression konnte nur in einem Fall ein Verlust der p16-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden.

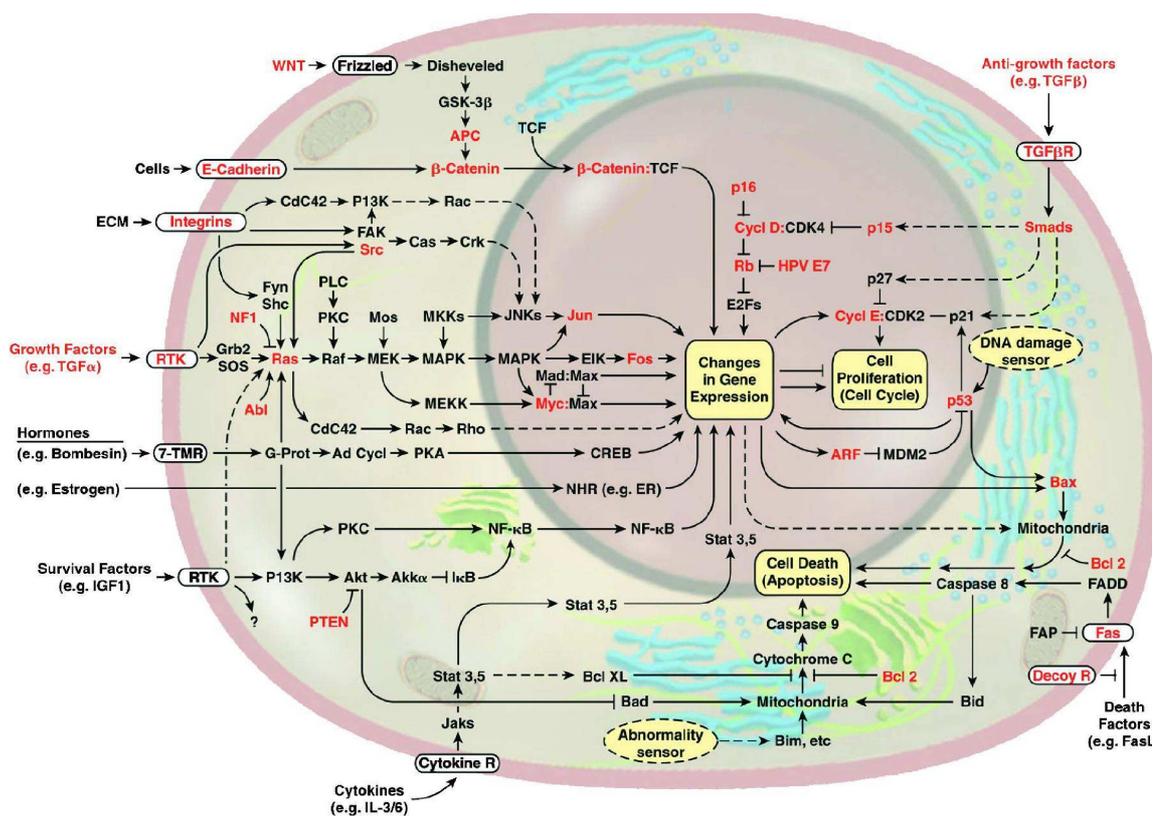
In diesem Fall wiesen die duktales Zellen des Normalgewebes fast ausschließlich zytoplasmatische, die Tumorzellen jedoch keine p16-Reaktivität auf.

Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass auch der Nachweis einer zytoplasmatischen p16-Reaktivität zu berücksichtigen ist, obgleich das p16-Protein überwiegend im Nukleus lokalisiert ist (Emig et al. 1998, Nielsen et al. 1999, Milde-Langosch et al. 2001).

31,6% der in der vorliegenden Studie untersuchten Fälle zeigten eine inhomogene p16-Expression, d.h. neben nukleärer Färbung wiesen die Zellen auch Unterschiede in der zytoplasmatischen p16-Reaktivität auf. Bei diesen Fällen richtete sich die Zuordnung in die entsprechenden Expressionsgruppen nach der geringsten Expressionsausprägung. Diese Gruppenzuordnung erfolgte unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass duktales und myoepitheliale Zellen auch in normalen Speicheldrüsen eine mäßige bis starke p16-Expression zeigen (Nielsen et al. 1999, Shintani et al. 2000), und dass einer fehlenden oder bereits einer geringen p16-Expression molekulare Veränderungen im *p16*-Gen zu Grunde liegen können (Kamb et al. 1994, Cairns et al. 1995, Milde-Langosch et al. 1998). Auf diese Weise sollte vermieden werden, dass durch eine falsch-positiv gewertete p16-Expression molekulare Veränderungen des *p16*-Gens nicht erwartet, nicht untersucht und damit übersehen werden. Trotz der so definierten Auswahlkriterien verfügen von den untersuchten Fällen mehr als 80% über eine intakte, davon fast 30% über eine starke p16-Expression. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass durch unterschiedliche Studien belegt worden ist, dass auch eine erhöhte p16-Expression entweder als Folge einer Amplifikation protoonkogener Faktoren (CDK4, Cyclin D, E2F) oder als Folge einer Alteration der Tumorsuppressoren (Rb, p130) in der Regulationsbahn INK4a-CDK4(6)-Rb-E2F (Johnson 1995, Lukas et al. 1995, Kitahara et al. 1996, Khleif et al. 1996, Emig et al. 1998, Shintani et al. 2000) von Bedeutung für die Tumorprogression sein kann (Abb.16).

So wurde eine hohe p16-Expression bei Rb-Alterationen im Sinne einer Rückkoppelung sowie eine fehlende bzw. schwache p16-Expression bei normaler Rb-Expression von mehreren Autoren (Yeager et al. 1995, Emig et al. 1998, Etges et al. 2003) beschrieben. Demnach wiesen Fälle mit hoher p16-Expression auch Verlust einer Rb-Expression auf. Alterationen im *Rb*-Gen können u.a. die Ursache für eine Zellzyklusstörung mit einer p16-Überexpression als Folge sein.

Abbildung 16: Zellzyklusregulation (Hanahan und Weinberg 2000)



6.2.2 p16-Expression und klinische Daten

Die statistische Analyse zur Beziehung zwischen der p16-Expression und den klinischen Daten ergab für die p16-Expression eine Unabhängigkeit vom Geschlecht, von der Lokalisation des Tumors und von Risikofaktoren (Nikotin, Alkohol). Auch andere Autoren (Milde-Langosch et al. 1998, Hui et al. 2000) wiesen auf eine Unabhängigkeit der p16-Expression vom Alter hin. Trotz einer hypothetisch erhöhten Tumor-Suszeptibilität oder einer metachronen Tumorentstehung bei vorausgegangenen Tumorerkrankungen (sowohl Karzinome als auch in der vorliegenden Studie Tumoren unklarer Dignität wie „hellzelliges Adenom“ bzw. „gutartiger Misch tumor“) ist kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der p16-Expression und vorausgegangenen Tumorerkrankungen nachweisbar.

Dagegen konnte in dieser Studie eine signifikante Assoziation der p16-Expression mit dem Tumorstadium ($p=0,01$) festgestellt werden. Deutlich positive und starke

immunhistochemische p16-Reaktivität wurde sowohl im Stadium I (57%) als auch in den TNM-Stadien III (100%) und IV (60%) beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen an Ovarialkarzinomen von Milde-Langosch et al. (1998). Hier war eine mittlere/starke p16-Expression in 59% der Fälle im Stadium III/IV, sowie in 72% der Fälle mit schlecht differenzierten OvarialCa (Grad 3) zu beobachten. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen starker p16-Expression und schlechter Differenzierung (G3) sowie regionären LK-Metastasen bei MammaCa wurde von Emig et al. (1998) und Hui et al. (2000) nachgewiesen, was p16 als einen negativen prognostischen Faktor darstellt. Da für die Zuordnung des Speicheldrüsenkarzinoms zu Stadium III/IV das Vorliegen von regionären LK-Metastasen und/oder Fernmetastasen ausschlaggebend ist, impliziert das Vorliegen einer mittleren/starken p16-Expression bei fortgeschrittenem Verlauf der Erkrankung eine ungünstige Prognose. Dies würde auch die Beobachtungen von Lee et al. (1999) und Hui et al. (2000) über p16-Überexpression als einen Risikofaktor für Rezidiv der Tumorerkrankung bestätigen, dennoch ergab sich für die in der vorliegenden Studie untersuchten SDC nach statistischer Analyse, dass die Überlebensraten, das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen unabhängig von unterschiedlichen Ausprägungen der p16-Expression sind. Saito et al. (1999) konnten in ihren Untersuchungen eine quantitative Zunahme der p16-positiven Zellen bei oralen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu präkanzerösen Läsionen und zum Normalgewebe zeigen. Natarajan et al. (2003) beobachteten eine p16-Expression im Zusammenhang mit einer Überexpression von Laminin 5 γ 2 in premalignen und präinvasiven Arealen bei PlattenepithelCa und Dysplasien der Haut sowie im oralen Plattenepithel. In Anbetracht des bekannten invasiven Verhaltens von Speicheldrüsenkarzinomen sind Veränderungen in der p16-Expression auch als ein mögliches Invasionsindiz anzusehen.

6.2.3 Ki67-Immunhistochemie und p16-Expression

Die Proliferationsrate im Speicheldrüsenkarzinom wurde in dieser Studie immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper Ki67 (Klon MIB1) bestimmt. Insgesamt zeigten 68% der Fälle eine hohe Wachstumsfraktion (über 25% der Tumorzellkerne waren Ki67-positiv). Bezogen auf das gesamte Kollektiv streuten die Werte zwischen 13% und 66% mit einem Mittelwert von 34,4%. Diese Werte weichen von denen von Felix et al. (1996) mittels PCNA-Färbung bestimmten Proliferationsraten im SDC (30 Probanden) ab. Die Ergebnisse sind allerdings nicht direkt vergleichbar, da PCNA nur in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird.

In der vorliegenden Studie konnte bei einer statistischen Analyse keine Assoziation zwischen p16-Expression und Proliferationsrate der Tumorzellen festgestellt werden. Auch Milde-Langosch et al. (1998) wiesen auf eine fehlende Assoziation beider Merkmale in Ovarialkarzinomen hin.

Im Gegensatz dazu konnte von einigen Arbeitsgruppen bei MammaCa eine signifikante Assoziation der p16-Expression mit der Proliferationsrate (Ki67-Nachweis) nachgewiesen werden (Emig et al. 1998, Milde-Langosch et al. 2001). Eine inverse Relation der p16-Expression zur Proliferationsaktivität (PCNA-Färbung) wurde von Shintani et al. (2000) für das adenoidzystische Karzinom der Speicheldrüsen beschrieben. Auch bei diesen Ergebnissen ist wieder zu bedenken, dass die über den PCNA-Nachweis bestimmte Proliferationsrate nicht vergleichbar ist.

Insgesamt ergab die statistische Analyse in der vorliegenden Studie keine signifikante Assoziation der Proliferationsrate zu Geschlecht, Alter, Lokalisation, Risikofaktoren und Vorerkrankungen, Tumorstadien in Speicheldrüsenkarzinomen sowie prognostischen Merkmalen wie Überlebensrate, das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Felix et al. (1996) überein, die ebenfalls keine Korrelation zwischen Proliferationsrate und prognostischen Merkmalen nachweisen konnten.

6.3 *p16*-Mutationsanalyse

6.3.1 SSCP

In der Literatur wird über eine Inaktivierung des *p16^{ink4a}* Tumorsuppressorgens in einer Vielzahl von Tumoren und Tumorzelllinien berichtet, die zum Verlust der p16-Expression führt. Ursache für die Inaktivierung können verschiedene Alterationsmechanismen sein, darunter homozygote Deletionen (Kamb et al. 1994, Cairns et al. 1995), Hypermethylierung des 5' CpG- Abschnittes innerhalb der Promoterregion (Merlo et al. 1995, Milde-Langosch et al. 1998, Song et al. 2000) und Punktmutationen innerhalb des Gens (Cairns et al. 1994, Merlo et al. 1995).

Um die Ursache für den beobachteten p16-Expressionsverlust in den entsprechenden Speichelgangkarzinomen zu klären, wurde eine Selektion der Proben für die SSCP-Analyse unter Berücksichtigung der immunhistochemisch bestimmten p16-Expression im Tumorgewebe vorgenommen. Die SSCP-Analyse wurde zuerst von Orita et al. (1989) als eine hochsensitive Methode zur Detektion von DNA-Mutationen beschrieben. Prinzipiell lassen sich so Mutationen sowohl in einem als auch in beiden DNA-Strängen aufgrund von mutationsbedingten Mobilitätsunterschieden mittels einer Gelelektrophorese nachweisen. Für die vorliegende Studie wurden alle Fälle mit fehlender p16-Expression sowie zum Vergleich p16-positive Tumorfälle mit unterschiedlich starker p16-Reaktivität ausgewählt und analysiert.

In 14 von 22 mittels SSCP untersuchten Proben wurden im Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten DNA-Proben aberrante Banden nachgewiesen. Ein verändertes Laufverhalten im SSCP-Gel zeigten 12 Fälle für Exon 1 und ein Fall für Exon 2b. Ein Fall wies aberrante Bandenmuster sowohl für Exon 1 als auch Exon 2b des *p16*-Gens auf. Bei der SSCP-Analyse von korrespondierendem Normalgewebe (n=2) konnte nur in einem Fall (29) ein aberrantes Bandenmuster festgestellt werden. Ein Grund für den Misserfolg bei der Amplifikation der DNA-Fragmente des Exons 2a und demzufolge für die fehlende Mutationsanalyse dieses Exons kann eine Degradation der DNA durch nicht optimale Lagerung und Fixation des Gewebes sein. Ähnliche Probleme wurden auch von anderen Autoren erwähnt. So konnten Cerilli et al. (1999) bei ihren

Untersuchungen zur *p16*-Mutation in SDC nur in einem von neun Fällen beide Exons (1 und 2) erfolgreich amplifizieren, in vier Fällen jeweils nur ein Exon. Die Autoren begründeten dies mit der Größe der DNA-Fragmente der Exons 1 und 2 und den allgemein erschwerten Bedingungen für Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe (Cerilli et al. 1999). Vier von sieben p16-negativen Proben, vier von fünf Proben mit schwacher p16-Reaktivität, fünf von sechs Proben mit deutlich positiver Färbung und ein Fall mit kräftig positiver Reaktivität zeigten in der SSCP-Analyse mutationsverdächtige Mobilitätsveränderungen (n=14) und wurden für das direkte Sequenzieren ausgewählt.

6.3.2 Sequenzanalyse

Die Ergebnisse der SSCP-Mutationsanalyse in der vorliegenden Studie konnten trotz der hohen Sensitivität der Methode (> 80%, bei Fragmenten unter 300 bp) (Hayashi and Yandell, 1993) mittels direkter Sequenzierung der aberranten Banden nicht bestätigt werden. Mittels direkter Sequenzierung konnten in der vorliegenden Studie lediglich in zwei Fällen Punktmutationen in Exon 2b des *p16*-Gens nachgewiesen werden. In einem Fall mit schwacher p16-Expression zeigte die Sequenz einen Basenaustausch im Codon 349 des Exons 2b (Transversion). In einem anderen Fall mit mittlerer p16-Expression zeigte sich ein Basenaustausch in zwei Codons des Exons 2b (Transversion im Codon 349 und Transition im Codon 324).

Immunhistologisch zeigten diese Fälle also trotz nachgewiesener Mutation im Exon 2b eine erhaltene Expression des *p16*-Gens mit einer schwachen (+) bzw. deutlich positiven (++) p16-Immunreaktivität. Grund hierfür ist der heterozygote Status der Mutation. Dies bestätigt die Hypothese, dass erst Mutationen in beiden Allelen, d.h. ein sog. „Loss of Heterozygosity“ (LOH) zum Verlust der Funktion des *p16*-Tumorsuppressorgens führen (Cerilli et al. 1999, Motsch et al. 2003).

Durch die direkte Sequenzierung konnte in zwei von 14 Fällen die in der SSCP-Analyse vermutete Mutation bestätigt werden. Als Ursache für die veränderten SSCP-Bandenmuster in denjenigen Fällen, die keine Mutation in dem untersuchten Exon enthielten, ist ebenfalls eine durch Lagerung und Fixation degradierte DNA-Sequenz mit Lesefehlern bei der Amplifikationsreaktion zu diskutieren. Obwohl in Fällen mit fehlender p16-Expression keine aberranten Banden mittels SSCP-Analyse nachgewiesen werden konnten, schließt das Fehlen von aberranten Banden eine Mutation im untersuchten Abschnitt nicht aus (Hayashi and Yandell, 1993). Auch

van Beerendonk et al. (2004) berichtete über das Fehlen von aberranten Banden bei der SSCP-Analyse hinsichtlich *p16*-Mutationen bei zentralen Chondrosarkomen, obwohl ein LOH für einen oder mehrere Marker in 37,5% der Fälle nachweisbar war. Als Ursache kommt neben einer für das Probenmaterial nicht optimalen Auswahl von Primer-Sequenzen auch eine aberrante Promotermethylierung des *p16*-Gens in Frage, die ursächlich für den Verlust der p16-Expression sein kann (Milde-Langosch et al. 1998, Motsch et al. 2003). Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht und kann nicht ausgeschlossen werden.

Als ein Ergebnis der vorliegenden Studie lässt sich feststellen, dass die geringe Anzahl (n=2) der durch direkte Sequenzierung bestätigten *p16*-Mutationen im Speicheldrüsenkarzinom daraufhin deutet, dass in der untersuchten Gruppe von Speicheldrüsenkarzinomen *p16*-Genveränderungen offensichtlich sehr selten sind, dass sie keine Ursache für p16-Expressionsunterschiede bei SDCs sind und ihnen keine ursächliche Rolle im Prozess der Tumorentstehung und Tumorprogression zukommt. Damit haben p16-Mutationen bei SDCs keine ätiologische und/oder prognostische Relevanz. Bei einer geringen Mutationsrate und einer überwiegend starken p16-Expression im untersuchten Tumorgewebe sind weitergehende Untersuchungen der nachgeschalteten Checkpoints der Zellzykluskontrolle (CDK4 und 6, Cyclin D1, Rb, E2F) (Johnson 1995, Yeager et al. 1995, Sherr 1996, Khleif et al. 1996, Kitahara et al. 1996, Ueki et al. 1996, Emig et al. 1998, Shintani et al. 2000) notwendig, um Störungen in der INK4A-CDK4(6)-pRb-E2F Regulationsbahn auszuschließen. Für weitere Studien an Speicheldrüsenkarzinomen zur Zellzyklusregulation bieten sich auch Untersuchungen zur p14^{ARF} sowie p53-Expression an, um Störungen in der p14^{ARF} - HDM2 - p53 Regulationsbahn auszuschließen, zumal das Exon 2 der *INK4A*-Region für beide Genprodukte p16^{INK4A} und p14^{ARF} kodiert (Quelle et al. 1995, Voorhoeve und Agami 2003).

7 Zusammenfassung

Speichelgangkarzinome stellen eine seltene Tumorentität mit einer sehr schlechten Prognose dar. Aussagen zur Prognose der Speichelgangkarzinome basieren bislang auf der TNM-Klassifikation.

In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 38 Patienten mit der Diagnose Speichelgangkarzinom hinsichtlich ihrer p16-Expression und möglichen *p16*-Mutationen immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht. Es wurde überwiegend eine mittlere (34%) bis starke (29%) p16-Expression gefunden; nur acht Fälle (21%) zeigten eine schwache p16-Expression. Ein Verlust der p16-Expression konnte in 16% der Fälle (n=6) festgestellt werden. Mittels SSCP-Mutationsanalyse und direkter Sequenzierung konnten insgesamt zwei heterozygote Punktmutationen im *p16*-Gen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. In diesen Fällen führten *p16*-Mutationen nicht zu einem Verlust der p16-Expression, was mit dem heterozygoten Status der Mutation gut vereinbar ist. Die Ergebnisse der durchgeführten statistischen Analysen zeigten, dass die p16-Expression unabhängig von den ausgewählten klinischen Parametern ist. Lediglich bezüglich p16-Expression und Tumorstadium besteht eine signifikante Assoziation, die jedoch keine weiteren prognostischen Aussagen in Hinblick auf Überlebensdauer sowie Auftreten eines Lokalrezidivs und einer Fernmetastasierung zulässt.

Die vorgelegten Ergebnisse zur p16-Expression bei einer geringen *p16*-Mutationsrate in Speichelgangkarzinomen lassen Störungen in anderen Checkpoints des Zellzyklus vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass *p16*-Genveränderungen, die zu einem Verlust der p16-Expression führen, in diesem speziellen Tumortyp offensichtlich sehr selten sind und damit kein für die Tumorentstehung wesentliches Ereignis darstellen. Auch wenn sich p16 nach der vorliegenden Studie nicht als prognostisch relevanter Marker für Speichelgangkarzinome erwiesen hat, kann der p16-Expressionsstatus, z.B. eine Überexpression, dennoch in Kombination mit anderen molekularen Ereignissen von Bedeutung sein. In dieser Hinsicht sollte eine p16-Überexpression als möglicher Progressionsfaktor für die Tumorerkrankung in Betracht gezogen werden.

8 Literaturverzeichnis

- 1) **Afzelius LE**, Cameron WR, Svensson C (1987) Salivary duct carcinoma - a clinicopathologic study of 12 cases. *Head Neck Surg* 9:151-156
- 2) **Anderson C**, Muller R, Piorowski R, et al. (1992) Intraductal carcinoma of major salivary gland. *Cancer* 69:609-614
- 3) **Araujo VC de**, de Souza SO, Sesso A, Sotto MN, de Araujo NS (1987) Salivary duct carcinoma: ultrastructural and histogenetic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63:592-6
- 4) **Armstrong JG**, Harrison LB, Spiro RH, et al. (1990a) Malignant tumors of major salivary gland origin. A matched- pair analysis of the role of combined surgery and postoperative radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116:290-293
- 5) **Armstrong JG**, Harrison LB, Spiro RH, et al. (1990b) Observation on the natural history and treatment of recurrent major salivary gland cancer. *J Surg Oncol* 44:138-141
- 6) **Auclair PL**, Ellis GL, Gnepp DR (eds) (1991) Salivary gland neoplasms: general considerations. *Surgical pathology of the salivary glands* 9 (Vol. 25):135-164
- 7) **Azzopardi JG** (1979) Problems in breast pathology. Major problems in pathology 11:131-133
- 8) **Barnes L**, Rao U, Contis L, et al. (1994) Salivary duct carcinoma. Part II. Immunohistochemical evaluation of 13 cases for estrogen and progesterone receptors, cathepsin D, and c-erbB-2 protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78:74-80
- 9) **Batsakis JG** (1980) Salivary gland neoplasia: An outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg* 3:229-232
- 10) **Batsakis JG**, Regezi JA, Luna MA, et al. (1989) Histogenesis of salivary gland neoplasms : a postulate with prognostic implications. *J Laryngol Otol* 103:939-944
- 11) **Beerendonk van HM**, Rozeman LB, Taminiou AHM, et al. (2004) Molecular analysis of the *INK4A/INK4A-ARF* gene locus in conventional (central) chondrosarcomas and enchondromas: indication of an important gene for tumour progression. *J Pathol* 202:359-366

- 12) **Belsky JL**, Takeichi N, Yamamoto T, et al. (1975) Salivary gland neoplasms following atomic radiation: additional cases and reanalysis of combined data in a fixed population, 1957- 1970. *Cancer* 35:555-559
- 13) **Biankin AV**, Biankin SA, Kench JG, et al. (2002) Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 50:861-8
- 14) **Brandwein M**, Biller H (1992) Intraductal carcinoma of major salivary gland [Letter]. *Cancer* 70:1202
- 15) **Brandwein MS**, Jagirdar J, Patil J, et al. (1990) Salivary Duct Carcinoma (Cribriform Salivary Carcinoma of Excretory Ducts). *Cancer* 65:2307-2314
- 16) **Burns KL**, Ueki K, et al. (1998) Molekular genetic correlates of p16, cdk4 and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 122-130
- 17) **Butterworth DM**, Jones AW, Kotecha B (1992) Salivary duct carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat* 420:371-374
- 18) **Cairns P**, Mao L, Merlo A, et al. (1994) Rates of *p16 (MTS1)* mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265(5170):p415-7
- 19) **Cairns P**, Polascik TJ, Eby Y, et al. (1995) Frequency of homozygous deletion at *p16/CDKN2* in primary human tumours. *Nat Genet* 11(2):210-2
- 20) **Caldas C**, Hahn SA, et al. (1994) Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the *p16 (MTS1)* gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 8:27-32
- 21) **Cerilli LA**, Swartzbaugh JR, Saadut R, et al. (1999) Analysis of chromosome 9p21 deletion and *p16* gene mutation in salivary gland carcinomas. *Hum Pathol* 30(10):1242-6
- 22) **Cesinaro AM**, Criscuolo M, Collina M, et al. (1995) Salivary gland tumours: revision of 391 cases according to the new WHO classification. *Pathologica* 86:602-605
- 23) **Chen KTK** (1983) Intraductal Carcinoma of the minor salivary gland. *The Journal of Laryngology and Otology* 97:189-191
- 24) **Chen KTK**, Hafez GR (1981) Infiltrating salivary duct carcinoma. A clinicopathological study of five cases. *Arch Otolaryngol* 107:37-39
- 25) **Colmenero Ruiz C**, Patrón Romero M, Martín P (1993) Salivary Duct Carcinoma: A report of nine cases. *J Oral Maxillofac Surg* 51(6):641-6
- 26) **Dardick I** and Burford-Mason AP (1994) Pathology of the salivary glands: the contribution of electron microscopy. *Micr Res Tech* 27(1):46-60

- 27) **Dardick I** and van Nostrand AWP (1987) Morphogenesis of salivary glands tumors. A prerequisite to improving classification. *Pathology Ann.* 22(part1):1-53
- 28) **Dardick I**, Kahn HJ, van Nostrand AWP, Baumal R (1984) Salivary gland monomorphic adenoma. Ultrastructural, immunoperoxidase, and histogenetic aspects. *Am J Pathol* 115:334-348
- 29) **Dardick I**, van Nostrand AWP, Jeans MTD, Rippstein P, Edwards V (1983) Pleomorphic adenoma: I. Ultrastructural organization of "epithelial" regions. *Hum. Pathol.* 14:780-797
- 30) **Dee S**, Masood S, Issacs JH Jr., Hardy NM (1993) Cytomorphologic features of salivary duct carcinoma on fine needle aspiration biopsy. A case report. *Acta Cytol* 37:539-42
- 31) **Delgado R**, Vuitch F, Albores-Saavedra J (1993) Salivary Duct Carcinoma. *Cancer* 72:1503-12
- 32) **Dyson N** (1998) The Regulation of E2F by pRB- family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262
- 33) **Ellis GL**, Auclair PL (1996) Atlas of tumor pathology. Tumors of the salivary glands. Armed Forces Institute of Pathology, Third series, fasc. 17:324-333
- 34) **Emig R**, Magener A, Ehemann V, Meyer A et al. (1998) Aberrant cytoplasmatic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer* 78(12):1661-8
- 35) **Etges A**, Pinto DS, Kowalski LP, Soares FA, Araujo VC (2003) Salivary duct carcinoma: immunohistochemical profile of an aggressive salivary gland tumour. *J Clin Pthol* 56(12):914-8
- 36) **Eversole LR** (1971) Histogenetic classification of salivary tumors. *Arch Path* 92:433-443
- 37) **Fan CY**, Melhem MF, Hosal AS, et al. (2001) Expression of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in salivary duct carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127:1075-9
- 38) **Fan CY**, Wang J, Barnes EL (2000) Expression of androgen receptor and prostatic specific markers in salivary duct carcinoma: an immunohistochemical analysis of 13 cases and reviews of the literature. *Am J Surg Pathol* 24:579-86
- 39) **Fayemi AO**, Toker C (1974) Salivary duct carcinoma. *Arch Otolaryngol* 99:366-368

- 40) **Felix A**, El-Naggar AK, Press MF, et al. (1996) Prognostic Significance of Biomarkers (c-erb-2, p53, Proliferating Cell Nuclear Antigen, and DNA Content) in Salivary duct Carcinoma. *Hum Pathol* 27:561-566
- 41) **Fu KK**, Leibel SA, Levine ML, et al. (1977) Carcinoma of the major and minor salivary glands. Analysis and treatment results and sites and causes of failures. *Cancer* 40:2882-2890
- 42) **Fukushima N**, Sato N, Ueki T, et al. (2002) Aberrant methylation of preproenkephalin and *p16* genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 160:1573-81
- 43) **Garland TA**, Innes DJ, Fechner RE (1984) Salivary duct carcinoma: An analysis of four cases with review of the literature. *Am J Clin Pathol* 81:436-441
- 44) **Goldstein AM**, Fraser MC, et al. (1995) Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with *p16ink4* mutations. *N Engl J Med* 333:970-974
- 45) **Hall M**, Peters G (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk-inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res* 68:67-108
- 46) **Hanahan D**, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70
- 47) **Harbour JW**, Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14(19):2393-2409
- 48) **Harrison LB**, Armstrong JG, Spiro RH, et al. (1990) Postoperative radiation therapy for major salivary gland malignancies. *J Surg Oncol* 45: 52- 55
- 49) **Hayashi K**, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2(5):338-46
- 50) **Hellquist HB**, Karlsson MG, Nilsson C (1994) Salivary duct carcinoma: A highly aggressive salivary gland tumor with overexpression of C-erbB-2. *J Pathol* 172:35-44
- 51) **Hoang MP**, Callender DL, Sola Gallego JJ, et al. (2001) Molecular and biomarker analyses of salivary duct carcinomas: comparison with mammary duct carcinoma. *Int J Oncol* 19:865-71
- 52) **Hui KK**, Batsakis JG, Luna MA, et al. (1986) Salivary duct adenocarcinoma: a high grade malignancy. *The Journal of Laryngology and Otology* 100:105-114
- 53) **Hui R**, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, et al. (2000) INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of

- p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. Clin Cancer Res 6(7):2777-87
- 54) **Hussussian CJ**, Struewing JP, et al. (1994) Germline *p16* mutations in familial melanoma. Nat Genet 8:15-21
- 55) **Ihrler S**, Zietz C, Sendelhofert A, et al. (2002) A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. Virchows Arch 440(5):519-26
- 56) **Innes DJ**, Garland TA, Fechner RE (1982) Structures in salivary gland intraductal adenocarcinoma. Ultrastruct Pathol 3:193-197
- 57) **Jaehne M**, Jäkel KT, Röser K, Usmüller J, Löning Th. (2001) About the prognostic value of Her-2 gene-amplifikation and cell-proliferation in salivary duct carcinoma of the major salivary glands – a pilot-study. Laryngorhinootologie 80:525-9
- 58) **Johnson DG** (1995) Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. Oncogene 11(9):1685-92
- 59) **Kamb A**, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 264:436-440
- 60) **Kaplan MJ**, Johns ME, Cantrell RW (1986) Chemotherapy for salivary gland cancer. Otolaryngol Head Neck Surg 95:165-170
- 61) **Khleif SN**, De Gregori J, Yee CL, Otterson GA et al. (1996) Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. Proc Natl Acad Sci 93(9):4350-4
- 62) **Kiene P**, Milde-Langosch K, Runkel M, Schulz K, Löning Th (1992) A simple and rapid technique to process formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for the detection of viruses by the polymerase chain reaction. Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol 420:269-273
- 63) **Kitahara K**, Yasui W, Yokozaki H et al. (1996) Expression of cyclin D1, CDK4 and p27KIP1 is associated with the p16MTS1 gene status in human esophageal carcinoma cell lines. J Exp Ther Oncol 1(1):7-12
- 64) **Kleinsasser O**, Klein HJ, Hubner G (1968) Speicheldrüsenkarzinome: Eine den Milchgangkarzinomen der Brustdrüse analoge Gruppe von Speicheldrüsentumoren. Arch Klin Exp Ohren- Nasen- Kehlkopfheilk 192:100-115
- 65) **Koh J**, Enders GH, et al. (1995) Tumour-derived *p16* alleles encoding proteins defective in cell cycle inhibition. Nature 375:506-510

- 66) **Lack EE**, Upton MP (1988) Histopathologic review of salivary gland tumors in childhood. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114:898-906
- 67) **Lee CT**, Capodieci P, Osman I, et al. (1999) Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. Clin Cancer Res 5(5):977-83
- 68) **Levitt SH**, McHugh RB, Gomez-Marin O, et al. (1981) Clinical staging system for cancer of the salivary gland: a retrospective study. Cancer 47:2712-2724
- 69) **Li X**, Tsuji T, Wen S et al. (1995) A fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with centromere-specific DNA Probes of chromosomes 3 and 17 in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas. J Oral Pathol Med 24:398-401
- 70) **Li Y**, Nichols MA, Shay JW and Xiong Y (1994) Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res. 54:6078-6082
- 71) **Licitra L**, Cavina R, Grandi C, et al. (1996) Cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide in advanced salivary gland carcinoma. A Phase II trial of 22 Patients. Ann Oncol 7:640-642
- 72) **Liggett WH**, Sewell DA, Rocco J et al. (1996) p16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. Cancer Res 56(18):4119-23
- 73) **Lipinski MM**, Jacks T (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. Oncogene 18:7873-7882
- 74) **Lopes MA**, de Abreu Alves F, Levy BA, et al. (2001) Intraoral salivary duct carcinoma: case report with immunohistochemical observations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91(6):689-92
- 75) **Lopez JI**, Nevado M, Eizaguirre B (1990) Salivary duct adenocarcinoma (letter). J Clin Pathol 43:608
- 76) **Lowe SW**, Sherr CJ (2003) Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. Curr. Opin. Genet. Dev. 13:77-83
- 77) **Lukas JD**, Agaars L, Mann DJ, Bartkova J et al. (1995) Rb- dependent cell cycle inhibition by p16^{CDKN2A} tumor suppressor. Nature 375:503-506
- 78) **Luna MA**, Batsakis JG, Ordez NG, Mackay B, Tortoledo ME (1987) Salivary gland adenocarcinomas: a clinicopathologic analysis of three distinctive types. Semin Diagn Pathol 4:117-35

- 79) **Mancuso TF**, Brenann MJ (1970) Epidemiological considerations of cancer of the gallbladder, bile ducts and salivary glands in the rubber industry. *J Occup Med* 12:333-341
- 80) **Mark J**, Wedell B, Dahlenfors R, Stenman G (1991) Karyotyp variability and evolutionary characteristics of a polymorphous low-grade adenocarcinoma in the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet* 55:19-29
- 81) **Medema RH**, Herrera RE, et al. (1995) Growth suppression by p16^{INK4A} requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci* 92:6289-6293
- 82) **Merlo A**, Herman JG, Mao L, et al. (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers. *Nat Med* 1(7):686-92
- 83) **Milde-Langosch K**, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Löning Th (2001) Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 67(1):61-70
- 84) **Milde-Langosch K**, Ocon E, Becker G, Löning Th (1998) *p16/MTS1* inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hyper-methylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. *Int J Cancer (pred. Oncol.)* 75:61-65
- 85) **Milde-Langosch K**, Rietdorf L, et al. (1999) P16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas. *Virchows Arch* 434:23-28
- 86) **Mori T**, Miura K, et al. (1994) Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4 (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54:3396-3397
- 87) **Moriki T**, Ueta S, Takahashi T, et al. (2001) Salivary duct carcinoma: cytologic characteristics and application of androgen receptor immunostaining for diagnosis. *Cancer* 93:344-50
- 88) **Motsch C**, Giers A, Boltze C, Evert M, et al. (2004) Biallelische Inaktivierung des *p16*-Gens bei metachronem Dreifachkarzinom im oropharyngealem Bereich. *Laryngo-Rhino-Otol* 83:55-60
- 89) **Muller H**, Bracken AP, Vernell R, et al. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 15:267-285
- 90) **Natarajan E**, Saeb M, Crum CP, et al. (2003) Co-expression of p16(INK4A) and laminin5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol* 163(2):477-91

- 91) **Nevins JR** (1998) Toward and understanding of the functional complexity of the E2F and Retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 9:585-593
- 92) **Nielsen GP**, Stemmer-Rachamimov AO, et al. (1999) Immunohistochemical Survey of p16^{INK4A} Expression in Normal Human Adult and Infant Tissues. *Lab Invest* 79:1137-1143
- 93) **Nobori T**, Miura K, Wu DJ, et al. (1994) Deletions of the cyclin- dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756
- 94) **Nordkvist A**, Edström S, Mark J, Stenman G (1992) Multiple unrelated chromosome abnormalities in a metastatic mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet* 61:158-161
- 95) **North CA**, Lee D, Piantadosi S, et al. (1990) Carcinoma of the major salivary glands treated by surgery plus postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18:1319-1326
- 96) **Orita M**, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(8):2766-70
- 97) **Palmero I**, McConnell B, Parry D, et al. (1997) Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 15(5):495-503
- 98) **Pesce C**, Colacino R, Buffa P (1986) Duct Carcinoma of the minor salivary glands. *The Journal of Laryngology and Otology* 100:611-613
- 99) **Quelle D**, et al. (1995) Alternative reading frames of the *INK4a* tumor suppressor gene encode to unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993-1000
- 100) **Quinn AG**, Sikkink S, et al (1994) Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res.* 54:4756-9
- 101) **Reed AL**, Califano J, Cairns P et al. (1996) High frequency of *p16* (*CDKN2/MTS-1/INK4A*) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56(16):3630-3
- 102) **Reznikoff CA**, Yeager TR, Belair CD, et al. (1996) Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res* 56(13):p2886-90

- 103) **Saemundsen AK**, Albeck H, Hansen JPH et al. (1982) Epstein-Barr virus in nasopharyngeal and salivary gland carcinomas of Greenland Eskimos. *Br J Cancer* 46:721-728
- 104) **Saito T**, Nakajima T, Mogi K (1999) Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28:226-32
- 105) **Saku T**, Hayashi Y, Takahara O, et al. (1997) Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer* 79:1465-1475
- 106) **Santucci M**, Gallo O, Calzolari A, Bondi R (1993) Detection of Epstein-Barr viral genome in tumor cells of Warthin`s Tumor of parotig gland. *Am J Clin Pathol* 100:662-665
- 107) **Schneider AB**, Shore-Freedman E, Ryo UY, et al. (1985) Radiation induced tumors of the head and neck following childhood irradiation: Prospective studies. *Medicine* 64:1-15
- 108) **Seifert G** (1996 (a)) Classification and differential diagnosis of clear and basal cell tumors of the salivary glands. *Semin Diagn Pathol* 13(2):95-103
- 109) **Seifert G** (1996 (b)) *Oralpathologie I., Pathologie der Speicheldrüsen.* Springer Verlag, Berlin
- 110) **Seifert G**, Sobin LH (1991) *Histological typing of salivary gland tumours,* 2nd ed. Springer Verlag, Berlin
- 111) **Serrano M**, Gomez-Lohoz E, Depinho RA et al. (1995) Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by *p16INK2*. *Science* 267:249-252
- 112) **Serrano M**, Hannon GJ and Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707
- 113) **Sheffield VC**, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci* 86: 232-236
- 114) **Sherr CJ** (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677
- 115) **Sherr CJ** (2001) The *INK4A/ARF* network in tumour suppression. *Nature Rev.* 10:731-737
- 116) **Shintani S**, Mihara M, Nakahara Y et al.(2000) Infrequent alternations of RB pathway (*Rb-p16INK4A-cyclinD1*) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer Res* 20(3B):2169-76

- 117) **Simpson RH**, Clarke TJ, Sarsfield PTL, Babajews AV (1991) Salivary duct adenocarcinoma. *Histopathology* 18:229-235
- 118) **Skalova A**, Starek, Kucerova V, et al. (2001) Salivary duct carcinoma – a highly aggressive salivary gland tumor with HER-2/neu oncoprotein overexpression. *Pathol Res Pract* 197:621-6
- 119) **Smith DB**, Levitt SH (1974) Radiation carcinogenesis: An unusual familial occurrence of neoplasia following irradiation in childhood for benign disease. *Cancer* 34:2069-2071
- 120) **Song SH**, Jong HS, Choi HH, et al. (2000) Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down regulate P16(INK4A) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 87:236-40
- 121) **Soufir N**, Moles JP, Vilmer C, et al (1999) *P16* UV mutations in skin epithelial tumours. *Oncogene* 18:5477-81
- 122) **Spiro IJ**, Wang CC, Montgomery WW (1993) Carcinoma of the parotid gland. Analysis of treatment results and patterns of failure after combined surgery and radiation therapy. *Cancer* 71:2699-2705
- 123) **Spiro RH**, Huvos AG, Strong EW (1975) Cancer of the parotid gland. A clinicopathologic study of 288 primary cases. *Am J Surg* 130:452-459
- 124) **Spitz MR**, Tilley BC, Batsakis JG, Gibeau JM, Newell GR (1984) Risk factors for major salivary gland carcinoma. A case comparison study. *Cancer* 54:1854-1859
- 125) **Sui L**, Dong Y, Ohno M, et al. (2000) Inverse Expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 79:230-7
- 126) **Suzuki H**, Fujioka Y (1998) Deletion of the *p16* gene and microsatellite instability in carcinoma arising in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Diagn Mol Pathol* 7(4):224-31
- 127) **Suzuki J** (1982) Basal cell adenoma with acinic differentiation. *Acta Pathol Jpn* 32:1085-1092
- 128) **Takeichi N**, Hirose F, Yamamoto H, Ezaki H, Fujikura T (1983) Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. II. Pathologic study and supplementary epidemiologic observations. *Cancer* 52:377-385
- 129) **Tam SW**, Shay JW, Pagano M (1994) Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin- dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res* 54:5816-20
- 130) **Teshima T**, Inoue Ta, Inoue To, et al. (1993) Radiation therapy for carcinoma of the major salivary glands. Results of conventional irradiation technique. *Strahlenther Onkol* 169:486-491

- 131) **Trampisch HJ**, Windeler J. (2000) Medizinische Statistik, 2nd. ed. Springer Verlag, Berlin
- 132) **Tu G**, Hu Y, Jiang P, et al. (1982) The superiority of combined therapy (surgery and postoperative irradiation) in parotid cancer. Arch Otolaryngol 108:710-713
- 133) **Ueki K**, Ono Y et al. (1996) *CDKN2/p16* or *RB* alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. Cancer Res 56:150-53
- 134) **Union Internationale Contre le Cancer** (1997) TNM classification of malignant tumors, Fifth edition. Sobin LH, Wittekind Ch & Wiley-Liss (eds). pp 43-47
- 135) **Voorhoeve PM** and Agami R (2003) The tumor-suppressiv functions of the human *INK4A* locus. Cancer Cell 4(4):311-9
- 136) **Weinberg R** (1995) The Retinoblastoma gene and cell cycle control. Cell 81:323-330
- 137) **Yeager T**, Stadler W, Belair C et al. (1995) Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. Cancer Res 55(3):493-7
- 138) **Zindy F**, Quelle DE, Roussel MF, et al. (1997) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. Oncogene 15(2):p203-11
- 139) **Zohar Y**, Shem-Tov Y, Gal R (1988) Salivary duct carcinoma in major and minor salivary glands. A clinicopathologic analysis of four cases. J Craniomaxillofac Surg 16:320-323

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Oralpathologie des Zentrums für klinisch-theoretische Medizin I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Th. Löning für die Überlassung des Themas, die zur Verfügung gestellten Tumorgewebe aus dem Speicheldrüsenregister des Institutes für Oralpathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, seine Unterstützung und seine kritische Begleitung meiner Arbeit.

Für ihr großes Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit, zahlreiche Diskussionen und kritische Anregungen möchte ich Frau Dr. rer. nat. K. Röser und Herrn Dr. med. K.T. Jäkel meinen herzlichen Dank aussprechen.

Für die zur Verfügung gestellten klinischen Daten zu dieser Studie und die Betreuung meiner Arbeit bedanke ich mich bei Herrn PD. Dr. med. M. Jaehne.

Frau G. Rieck, Frau B. Kelp und Herr PD. Dr. A. Erbersdobler unterstützten mich bei Fragen der Methodik sowie bei der Einarbeitung in die Labortechnik und waren bei der Bewältigung auftretender Probleme stets außerordentlich zuvorkommend und hilfsbereit.

Dank gebührt auch Frau Dr. rer. nat. K. Milde-Langosch für die Kontrollmaterialien und Gen-Sequenzen, die sie mir für meine Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Für die Beratung zur statistischen Auswertung von Ergebnissen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Berger.

Für gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich beim Herrn Dr. med. J.-D. Schepers bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn P. Bailly, Magister Artium in Geschichte und politischer Wissenschaft, für seine Unterstützung.

10 Lebenslauf

Name: Natalie Albert
Anschrift: Rheinhäuser Str 19a
68165 Mannheim

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren: am 08.08.78 in Afanasjewka
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1985-1995 Allgemeinbildende Schule in (Russland).
Abschluss mit Auszeichnung (Silbermedaille).
Allgemeine Hochschulreife.

Studium

1995-1998 Vorklinisches Studium an der Medizinischen
Staatsakademie (Omsk, Russland)
1999-2003 Klinisches Studium der Humanmedizin an der
Universität Hamburg
1998 Ärztliche Vorprüfung
2000 I Staatsexamen
2002 II Staatsexamen
2003 III Staatsexamen

Tätigkeiten

Seit 09.2000 Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn
Univ.-Prof. Dr.med.Th. Löning
im Institut für Oralpathologie
des Zentrums für klinisch-theoretische Medizin I
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

2002-2003 Praktisches Jahr (Wahlfach: Ophthalmologie)
02.2004-09.2004 ÄiP an der Universitätsaugenklinik Heidelberg

seit 10.2004 Assistenzärztin an der Universitätsaugenklinik
Heidelberg

11 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....