

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde  
(Univ.-Prof. Dr. med. D. Beutner)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Klinisches Outcome und die prognostische Relevanz von Tumorstammzellmarkern bei Speicheldrüsenmalignomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Marie Isabel Angela Kruiženga**

aus  
Hamburg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. P. Ströbel

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 18.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Klinisches Outcome und die prognostische Relevanz von Tumorstammzellmarkern bei Speicheldrüsenmalginomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den.....

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden publiziert:

Spiegel JL, Jakob M, **Kruizenga M**, Freytag S, Bertlich M, Canis M, Ihler F, Haubner F, Kitz J, Weiss BG (2020): Cancer stem cell markers in adenocarcinoma of the salivary glands - reliable prognostic markers? Eur Arch Otorhinolaryngol, online ahead of print

Bertlich M, Kitz J, **Kruizenga M**, Spiegel JL, Canis M, Ihler F, Haubner F, Weiss BG, Jakob M (2021): Cancer Stem Cell Markers in Squamous Cell Carcinoma of the Salivary Glands. Oncology, online ahead of print

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie .....	1
1.2 Tumoren der großen Speicheldrüsen.....	2
1.2.1 Speicheldrüsenmalignome .....	2
1.3 Tumorentstehung und Tumorstammzellen ( <i>cancer stem cells</i> , CSC).....	5
1.4 Prognostische Rolle von immunhistochemischen Markern in Speicheldrüsenmalignomen .....	7
1.5 Zielsetzung und Fragestellung .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Patienten .....	11
2.2 Materialliste .....	12
2.3 Methoden .....	14
2.3.1 <i>Tissue-Microarrays</i> .....	14
2.3.2 Immunhistochemie .....	14
2.3.3 Statistische Methoden .....	17
2.3.4 <i>Heatmap</i> .....	17
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>19</b>
3.1 Gesamtkollektiv .....	19
3.2 Adenokarzinome .....	19
3.2.1 Daten zur Demographie und Erkrankung.....	19
3.2.2 Überlebenszeiten .....	22
3.2.3 Immunhistochemische Auswertung.....	29
3.3 Plattenepithelkarzinome .....	41
3.3.1 Daten zur Demographie und Erkrankung.....	41
3.3.2 Überlebenszeiten .....	42
3.3.3 Immunhistochemische Auswertung.....	47
3.4 Primäre Plattenepithelkarzinome .....	59
3.4.1 Überlebenszeiten .....	59
3.4.2 Immunhistochemische Auswertung.....	59
3.5 Kutane in die <i>Glandula parotidea</i> metastasierte Plattenepithelkarzinome .....	63
3.5.1 Überlebenszeiten .....	63
3.5.2 Immunhistochemische Auswertung.....	63

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Topographie der großen Speicheldrüsen und ihre Ausführungsgänge (Drenckhahn 2008). .....	2
Abbildung 2: TMAs und zugehöriger immunhistochemischer Schnitt. ....	14
Abbildung 3: Verteilung der histopathologischen Entitäten in der Gruppe der Patienten mit einem Adenokarzinom. ....	20
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Analyse des Kollektivs der Adenokarzinome. ....	22
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors. ....	23
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom histologischen Grading. ....	24
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der T-Kategorie des Tumors. ....	25
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der N-Kategorie des Tumors. ....	26
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit des UICC-Stadiums des Tumors. ....	27
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie. ....	28
Abbildung 11: ALDH1-Expression .....	30
Abbildung 12: BMI-1-Expression .....	30
Abbildung 13: CD44-Expression .....	31
Abbildung 14: Nanog-Expression .....	31
Abbildung 15: SOX2-Expression .....	31
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von ALDH1. ....	32
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1. ....	33
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von CD44. ....	34
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von Nanog. ....	35
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2. ....	36
Abbildung 21: Clusteranalyse bezogen auf die Expression von CD44, BMI-1, Nanog, ALDH1 und SOX2. ....	39
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse des Kollektivs der Plattenepithelkarzinome. ....	43
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom Patientenalter. ....	44
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom histologischen Grading des Tumors. ....	45
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie. ....	46
Abbildung 26: ALDH1-Expression .....	48
Abbildung 27: BMI-1-Expression .....	48
Abbildung 28: CD44-Expression .....	48
Abbildung 29: SOX2-Expression .....	49
Abbildung 30: Vimentin-Expression. ....	49
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von ALDH1. ....	50
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1. ....	51
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von CD44. ....	52

Abbildung 34: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2. ....	53
Abbildung 35: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von Vimentin. ....	54
Abbildung 36: Clusteranalyse bezogen auf die Expression von CD44, SOX2, BMI-1, ALDH1. ....	57
Abbildung 37: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1. ....	60
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2. ....	65

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maligne Speicheldrüsenneoplasien nach WHO-Klassifikation 2017 .....	3
Tabelle 2: Antikörper .....	12
Tabelle 3: Geräte .....	12
Tabelle 4: Molekularbiologische Agenzien und Materialien.....	13
Tabelle 5: Software.....	14
Tabelle 6: Klinisch-pathologische Parameter des Adenokarzinom-Kollektivs .....	21
Tabelle 7: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter für 40 Patienten mit einem Adenokarzinom .....	29
Tabelle 8: Immunhistochemische Färbung im Kollektiv der Adenokarzinome .....	30
Tabelle 9: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die immunhistochemischen Färbungen für 40 Patienten mit einem Adenokarzinom .....	37
Tabelle 10: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 40 Adenokarzinomen .....	38
Tabelle 11: Daten der Kaplan-Meier-Analyse anhand der Clusterexpression für 39 Patienten mit einem Adenokarzinom .....	40
Tabelle 12: Assoziation der Clusterexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 39 Patienten mit einem Adenokarzinom.....	40
Tabelle 13: Klinisch-pathologische Parameter des PECA-Kollektivs .....	42
Tabelle 14: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom.....	47
Tabelle 15: Immunhistochemische Färbung im Kollektiv der PECA .....	47
Tabelle 16: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die immunhistochemischen Färbungen für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom.....	55
Tabelle 17: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom.....	56
Tabelle 18: Daten der Kaplan-Meier-Analyse anhand der Clusterexpression für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom.....	57
Tabelle 19: Assoziation der Clusterexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom .....	58
Tabelle 20: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinischen-pathologischen Parameter für 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom.....	59

---

Tabelle 21: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Tumorstammzellmarker-Expression für 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom .....	61
Tabelle 22: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Daten von 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom.....	62
Tabelle 23: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter für 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom.....	63
Tabelle 24: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Tumorstammzellmarker-Expression für 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom .....	66
Tabelle 25: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom.....	67

## Abkürzungsverzeichnis

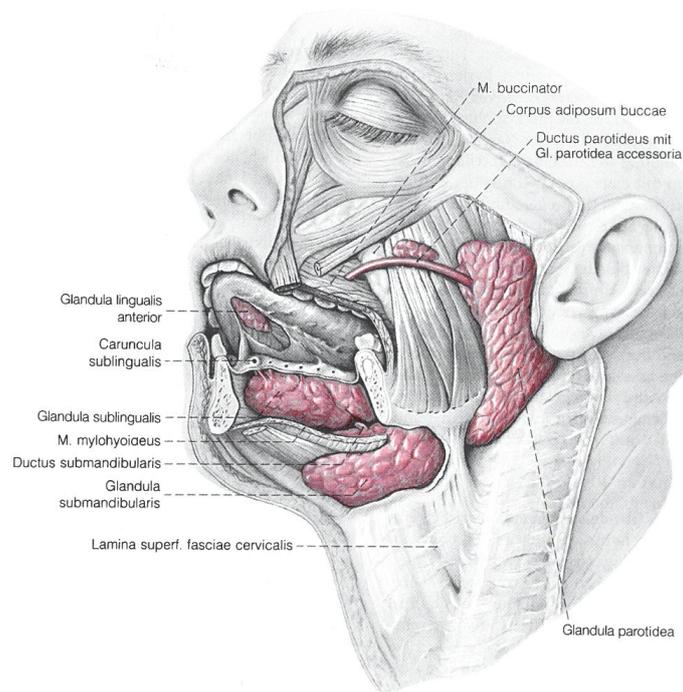
ALDH1	Aldehyd Dehydrogenase 1
BMI-1	<i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
CD133	<i>Cluster of Differentiation 133</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CSC	<i>cancer stem cells</i>
DSS	Krankheitsspezifisches Überleben, <i>Disease specific survival</i>
G	Grading
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
LCR	Lokale Kontrollrate, <i>local control rate</i>
M	Fernmetastase
N	Regionaler Lymphknotenbefall
ND	Neck Dissection
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
Oct-3/4	<i>Octamer binding transcription factor 3/4</i>
OS	Gesamtüberleben, <i>overall survival</i>
PECA	Plattenepithelkarzinom
pn	Perineurale Infiltration
R	Residualtumor-Klassifikation
RFS	Rezidivfreies Überleben, <i>recurrence free survival</i>
ROC-Kurve	<i>Receiver-Operating-Characteristic-Kurve</i>
RT	Radiotherapie
SOX2	<i>Sex-determining region Y-box 2</i>
T	Tumorausdehnung
TMA	<i>Tissue-Microarrays</i>
TNM	<i>tumor, nodal, metastasis stage</i>
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie

Neben den drei großen, paarig angelegten Speicheldrüsen, der *Glandula parotidea*, der *Glandula submandibularis* und der *Glandula sublingualis*, existieren zahlreiche kleine Speicheldrüsen, welche in Mundschleimhaut und Rachen homogen verteilt sind. Die *Glandula parotidea*, die größte der menschlichen Speicheldrüsen, liegt dem *Musculus masseter* auf und reicht kranial bis zum *Arcus zygomaticus* sowie kaudal bis zum Rand der *Mandibula* (Abb. 1). Sie ist von einer Bindegewebskapsel umgeben und weist aufgrund von durchziehenden Bindegewebssepten einen läppchenartigen Aufbau auf. Der *Nervus facialis* durchzieht die Ohrspeicheldrüse mit seinen fünf motorischen Ästen, den *Rami temporales*, den *Rami zygomatici*, den *Rami buccales*, dem *Ramus marginalis mandibulae* und dem *Ramus colli nervi facialis*. Durch ihren nahezu sagittalen Verlauf wird die Drüse in einen oberflächlichen, lateralen und in einen tiefen, medialen Lappen unterteilt, welches Relevanz für die Parotischirurgie hat (laterale vs. totale Parotidektomie). Der Ausführungsgang der *Glandula parotidea* mündet enoral gegenüber dem 2. Molaren (Drenckhahn 2008).

Die *Glandula submandibularis* ist im *Trigonium submandibulae* lokalisiert, welches kaudal durch den *Venter anterior* und *Venter posterior* des *Musculus digastricus* und kraniallateral durch die *Mandibula* begrenzt ist (Abb. 1). Gemeinsam mit der *Glandula sublingualis* mündet die Unterkieferdrüse in die *Carunculae sublingualis*, welche zu beiden Seiten lateral des *Frenulum linguale* am Mundboden liegen (Drenckhahn 2008).



**Abbildung 1: Topographie der großen Speicheldrüsen und ihre Ausführungsgänge (Drenckhahn 2008).** Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des ©Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlags.

## 1.2 Tumoren der großen Speicheldrüsen

Speicheldrüsentumore, sowohl benigne als auch maligne, sind selten und machen weniger als 5 % aller Kopf-Hals-Neoplasien aus (GEKID 2019). In der *Glandula parotidea* sind 75 % der Speicheldrüsentumore lokalisiert, 10 % in der *Glandula submandibularis*, weniger als 1 % in der *Glandula sublingualis* und 14 % in den kleinen Speicheldrüsen (Ihrler *et al.* 2009; Chaukar *et al.* 2015). In den kleinen Speicheldrüsen lässt sich eine ausgeglichene Verteilung von malignen und benignen Tumoren nachweisen. Dahingegen sind in der *Glandula parotidea* nur 20 % der Neoplasien maligne (Chaukar *et al.* 2015).

### 1.2.1 Speicheldrüsenmalignome

Speicheldrüsentumore zeichnen sich durch eine große morphologische Vielfalt aus. Die World-Health-Organization(WHO)-Klassifikation teilt die malignen Speicheldrüsentumore in 22 verschiedene Entitäten ein (Tab.1) (El-Naggar 2017).

**Tabelle 1: Maligne Speicheldrüsenneoplasien nach WHO-Klassifikation 2017**

Maligne Tumore	ICD - O
Azinuszellkarzinom	8550/3
Sekretorisches Karzinom	8502/3
Mukoepidermoidkarzinom	8430/3
Adenoidzystisches Karzinom	8200/3
Polymorphes Adenokarzinom	8525/3
Epithelial-myoepitheliales Karzinom	8562/3
Klarzellkarzinom	8310/3
Basalzell-Adenokarzinom	8147/3
Sebaceöses Karzinom	8410/3
Intraduktales Karzinom	8500/2
Zystadenokarzinom	8440/3
Adenokarzinom, NOS ( <i>not otherwise specified</i> )	8140/3
Speichelgangkarzinom	8500/3
Myoepitheliales Karzinom	8982/3
Karzinom ex pleomorphes Adenom	8941/3
Karzinosarkom	8980/3
Niedrig differenzierte Karzinome	
Neuroendokrin und nicht-Neuroendokrin	
Undifferenziertes Karzinom	8020/3
Großzelliges neuroendokrines Karzinom	8013/3
Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	8041/3
Lymphoepitheliales Karzinom	8082/3
Plattenepithelkarzinom (PECA)	8070/3
Onkozytäres Karzinom	8290/3

Hinsichtlich der Adenokarzinome stellen das Adenokarzinom NOS, das Mukoepidermoidkarzinom und das adenoidzystischen Karzinom die häufigsten Entitäten dar (Seifert 1996). Der Altersgipfel der meisten Entitäten liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, wobei Männer insgesamt häufiger von Speicheldrüsenmalignomen betroffen sind (GEKID 2019). Die Ätiologie der Speicheldrüsenneoplasien ist weitestgehend unbekannt. Speicheldrüsenmalignome präsentieren sich üblicherweise mit einer derben, unverschieblichen Schwellung. Bei dauerhaften Schmerzen, einer peripheren Fazialisparese, geschwollenen zervikalen Lymphknoten oder einer Tumorinfiltration der Haut ist klinisch der Hinweis auf Malignität gegeben. Die zur Bestimmung der Ausdeh-

nung dienende Diagnostik beinhaltet Feinnadelpunktion, Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie und beeinflusst das weitere therapeutische Vorgehen. Die Prognose der in der *Glandula parotidea* liegenden Malignome wird hauptsächlich in absteigender Gewichtung von der Tumorgröße, dem histologischen Grad, den tumorpositiven Lymphknoten, einer vorhandenen Fazialisparese und dem Patientenalter beeinflusst (Lima *et al.* 2005). Das adenoidzystische Karzinom ist aufgrund seiner Tendenz zu Spätrezidiven durch eine besonders schlechte Langzeitprognose gekennzeichnet. So liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei 72 %, während das 15-Jahres-Gesamtüberleben 34 % beträgt (Khan *et al.* 2001). Aus diesem Grund wird es zumeist, unabhängig von anderen Parametern, als High-grade-Malignom eingestuft. Die Höhe des Gradings gibt an in welchem Ausmaß das Tumorgewebe vom ursprünglichen Gewebe abweicht.

Primäre Plattenepithelkarzinome (PECA) der Speicheldrüsen stellen eine Rarität dar (Hellquist und Skalova 2014). Diese sind zu 80 % in der *Glandula parotidea* und zu 20 % in der *Glandula submandibularis* lokalisiert (Eveson *et al.* 2005). Sie treten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr und bei Männern doppelt so häufig auf. Makroskopisch imponieren sie als feste, leicht ulzerierende und invasiv wachsende Masse, weshalb PECA bei Diagnosestellung meistens bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufweisen (Eveson *et al.* 2005). Die klinische Schwierigkeit in der Diagnosestellung besteht darin ein primäres PECA von einem High-grade-Mukoepidermoidkarzinom und von einem kutanen, in die Parotis metastasierten PECA zu unterscheiden. Die Abgrenzung zu einer kutanen Metastase ist histopathologisch nicht möglich und wird deshalb häufig klinisch bei einem vorausgegangenen Hauttumor gestellt (Ying *et al.* 2006). Zudem gilt es bei der Diagnose zu berücksichtigen, dass abhängig von der Lokalisation kutane PECA am häufigsten in die *Glandula parotidea* metastasieren (Eveson *et al.* 2005). Somit ist das Erheben einer ausführlichen Tumoranamnese sowie eine dermatologische Mitbeurteilung ein nicht zu vernachlässigender Bestandteil der Diagnosestellung. Primäre PECA der *Glandula parotidea* zeigen ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 25 %, welches deutlich vom UICC-Stadium, dem Patientenalter, von der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus abhängt (Lee *et al.* 2001; Chen *et al.* 2015). Im Vergleich dazu findet sich bei kutanen, in die Parotis metastasierten PECA eine Überlebensrate nach fünf Jahren von 56 %, beeinflusst durch das Vorhandensein tumorpositiver Lymphknoten (Barzilai *et al.* 2005).

Die chirurgische Exzision mit dem Ziel der kompletten Tumorentfernung stellt den Goldstandard der Primärtherapie bei Speicheldrüsenmalignomen dar. Entscheidend dabei ist die Lokalisation und das Ausmaß des Tumors sowie eine mögliche Infiltration des *Nervus facialis* (Adelstein *et al.* 2012). Eine endgültige Therapieempfehlung wird

immer durch eine interdisziplinäre Tumorkonferenz ausgesprochen. Bei klinischem oder radiologischem Verdacht auf Lymphknotenmetastasen wird in allen Fällen eine anschließende Neck Dissection (ND) durchgeführt (Adelstein *et al.* 2012). Die Empfehlung zu einer adjuvanten Radiotherapie wird bei positiven oder knappen Resektionsgrenzen, Rezidivtumoren, Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, Nerven- oder Knocheninfiltration, T-Kategorie 3-4 und High-grade-Tumoren ausgesprochen. Die Basis für diese Indikation bilden verschiedene retrospektive Studien, in denen eine verbesserte Überlebensrate nach durchgeführter Radiatio nachgewiesen wurde (Safdieh *et al.* 2017; Aro *et al.* 2019). Da bei in die Parotis metastasierten PECA bereits ein UICC-Stadium IV vorliegt, besteht ein optimales therapeutisches Vorgehen stets aus einer Kombination von Operation und adjuvanter Radiotherapie (Veness *et al.* 2003; Audet *et al.* 2004). Die Effektivität einer Chemotherapie sowie einer primären Radiotherapie ist hingegen limitiert, weshalb sie heute nur noch in palliativer Situation durchgeführt werden (Cheraghlou *et al.* 2018). Die Etablierung einer zielgerichteten Krebstherapie, welche sich gegen bestimmte Strukturen (*Targets*) der Tumorzelle richtet, ist Bestandteil aktueller Forschung. Es wurden zwar bereits molekulare *Targets* identifiziert, jedoch waren die Ergebnisse dieser Ansätze bisher nicht zielführend. So wurden Imatinib, ein c-kit Tyrosinkinase-Inhibitor (Pfeffer *et al.* 2007), Gefitinib, ein EGFR Tyrosinkinase-Inhibitor (Jakob *et al.* 2015) und Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen HER2 (Haddad *et al.* 2003), ohne Ansprechen des Tumors erfolglos eingesetzt.

### 1.3 Tumorentstehung und Tumorstammzellen (*cancer stem cells, CSC*)

Die beiden wichtigsten für die Tumorentstehung verantwortlichen Gen-Gruppen werden von den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen repräsentiert. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit der Entdeckung tumorbildender RNA-Viren die Grundlage für den Nachweis von retroviralen Onkogenen geschaffen (Stehelin *et al.* 1976). Die Vorstufe der Onkogene stellen Protoonkogene dar, welche ubiquitär in gesunden Zellen vorkommen und die Zellproliferation regulieren. Durch somatische Mutationen verlieren Protoonkogene die Kontrolle über die regulären Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zellen, so dass es zur unkontrollierten Zellproliferation kommt. Die Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene findet unter anderem durch radioaktive Strahlung, chemische Substanzen oder Viren statt.

Das Modell der Tumorsuppressorgene wurde erstmals von Alfred Knudson 1971 als „zwei Treffer“-Hypothese für die Entwicklung eines Retinoblastoms beschrieben (Alfred G. Knudson 1971). Diese drückt aus, dass erst die Schädigung beider Allele eines Tumorsuppressorgens zur Tumorentstehung führt. Tumorsuppressorgene fungieren als

negative Regulatoren im Zellzyklus und induzieren den programmierten Zelltod, die Apoptose. Die negative Rückkopplung sorgt dafür, dass ein Enzym durch hohe Konzentration des Endproduktes gehemmt wird. Mutationen in den Tumorsuppressorgenen führen zum Verlust dieses Feedback-Mechanismus und somit zur ungehinderten Zellproliferation sowie zur Resistenz gegen Wachstumsinhibitoren (Moch *et al.* 2012).

Aktuell wird angenommen, dass diese zur Tumorgenese führenden Mutationen nur in wenigen Zellen stattfinden. Die Theorie der Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) hypothesisiert, dass nur eine Subpopulation der Tumorzellen verantwortlich für die Tumorentstehung, das Wachstum, die Metastasierung sowie die Rezidivbildung ist (Reya *et al.* 2001). Ihr steht das ursprüngliche „stochastische Modell der Tumorgenese“ entgegen, in dem allen Tumorzellen die Fähigkeit zugesprochen wird, Tumorzellwachstum zu initiieren (Chinn *et al.* 2012). Erstmals wurde dieses hierarchische Tumormodell Mitte des 19. Jahrhundert in Form von Rudolf Virchow's Zellulärpathologie (1855) und in einem Fallbericht von Julius Cohnheim (1875) beschrieben. Jedoch konnte erst 1997 durch Bonnet und Dick die Theorie der Tumorstammzellen gerechtfertigt werden (Bonnet und Dick 1997). Sie wiesen eine Zellpopulation nach, welche nach Transplantation in immunsupprimierten Mäusen in der Lage war, eine akute myeloische Leukämie hervorzurufen. Die entdeckten leukämischen Progenitorzellen waren, entsprechend gesunder hämatopoetischer Vorläuferzellen, CD34-positiv bei gleichzeitiger CD38-Negativität. Diese Erkenntnis ließ auf eine Verwandtschaft der Zellen schließen (Bonnet und Dick 1997).

Eine Eigenschaft der CSC stellt die Chemo- und Strahlentherapieresistenz dar. Das Überleben und die Vermehrung der CSC nach Chemo- und Radiotherapie werden als Ursachen für die Entwicklung von Tumorrezidiven diskutiert (Sun und Wang 2010). In Brustkrebs und hepatozellulären Karzinomen konnte beispielsweise eine Anreicherung der CSC nach Strahlentherapie festgestellt werden (Ghisolfi *et al.* 2012; Lagadec *et al.* 2012).

Mittlerweile konnten CSC in vielen soliden Tumoren nachgewiesen werden (Shideng Bao *et al.* 2006; Vermeulen *et al.* 2008). Der Identifizierung von CSC wird eine Bedeutung bei der Etablierung prognostischer Marker zugesprochen. Als Marker für CSC eignen sich Oberflächenproteine, welche mittels Immunhistochemie detektiert werden. So werden Tumorstammzellmarker, wie ALDH1 (Seifi *et al.* 2016), BMI-1 (Yi *et al.* 2016), CD133 (Wang *et al.* 2016), Nanog (Destro Rodrigues *et al.* 2017) und SOX2 (Dai *et al.* 2014) eingesetzt, um ihr Expressionsmuster mit klinisch-pathologischen Parametern der Adenokarzinome der Speicheldrüsen zu korrelieren. Auch die immunhistochemischen Marker Oct-3/4 (Ravindran *et al.* 2015) und Vimentin (Liu *et al.* 2017) werden in aktuellen Studien auf ihre prognostische Relevanz für verschiedene Tumore

untersucht. Das prognostische Potenzial der genannten Marker wurde speziell für PECA der Speicheldrüsen noch nicht erforscht, jedoch für PECA anderer Organe des Kopf-Hals-Bereichs (Huber *et al.* 2011; Yang *et al.* 2013).

#### 1.4 Prognostische Rolle von immunhistochemischen Markern in Speicheldrüsenmalignomen

ALDH1 trägt durch die Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure zur frühen Stammzellendifferenzierung bei (Vasiliou *et al.* 2000). Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass ALDH1 als Tumorstammzellmarker in soliden Tumoren eine funktionelle Rolle spielt (Ginestier *et al.* 2007; Krishnamurthy *et al.* 2014). In PECA des Kopf-Hals-Bereiches (Prince *et al.* 2007) und in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen (Sun und Wang 2010) wird ALDH1 als Tumorstammzellmarker beschrieben, seit die Implantation von wenigen ALDH1-positiven Zellen *in vivo* zur Tumorneubildung geführt hat. Die ALDH1-Expression wurde daraufhin in PECA des Kopf-Hals-Bereiches mit einer höheren T-Kategorie, N-Kategorie, einem höheren Grading und einem niedrigeren Gesamtüberleben korreliert (Hildebrand *et al.* 2014; Qian *et al.* 2014). In Adenokarzinomen der Speicheldrüse konnte ALDH1 bislang keine Bedeutung als prognostischer Marker zugesprochen werden (Zhou *et al.* 2013; Seifi *et al.* 2016).

Das Protoonkogen BMI-1 ist zu einem wesentlichen Anteil an der Selbsterneuerung und dem Zellzyklus von gesunden und malignen Stammzellen beteiligt (Bracken *et al.* 2007). Über die Regulation des p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> Locus kann BMI-1 die beiden bekanntesten Tumorsuppressorgene, Rb und p53, beeinflussen (Bracken *et al.* 2007). So wurde eine Überexpression von BMI-1 mit der Tumorgenese verschiedenster Malignome assoziiert (Watanabe 2009; Lu *et al.* 2012). Bezogen auf Adenokarzinome der Speicheldrüsen ist eine starke BMI-1-Expression mit einem ungünstigeren metastasenfrem Überleben bei der Untersuchung von adenoidzystischen Karzinomen assoziiert (Yi *et al.* 2016). Im Hinblick auf PECA des Kopf-Hals-Bereiches konnte ein Zusammenhang der BMI-1-Überexpression mit einem positiven Lymphknotenstatus ermittelt werden, wohingegen die Aussagen über die Assoziation zu den Überlebenszeiten kontrovers sind (Häyry *et al.* 2010; Huber *et al.* 2011).

CD133, ein membranständiges Glykoprotein, konnte erstmals 1997 aus neuroepithelialen Stammzellen von Mäusen isoliert werden (Weigmann *et al.* 1997; Shmelkov *et al.* 2005). Die Eigenschaft, dass Zellen mit CD133-Überexpression im Vergleich zu CD133-negativen Zellen größeres Invasions- und Tumorgenesepotential aufweisen, wird zur Identifizierung von potentiellen Tumorstammzellpopulationen genutzt (Zhang *et al.* 2010). In Adenokarzinomen der Speicheldrüsen fand sich eine Korrelation zwi-

schen CD133-Positivität und einem kürzeren Gesamtüberleben, dem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen sowie der Lokalisation in der großen oder kleinen Speicheldrüse (Wang *et al.* 2016; Xu *et al.* 2017). Eine CD133-Überexpression in PECA des Kopf-Hals-Bereiches korrelierte mit einem hohen UICC-Stadium, Lymphknotenmetastasen und einem schlechteren Gesamtüberleben (Chiou *et al.* 2008; Canis *et al.* 2012).

CD44, ein transmembranes Glykoprotein, vermittelt hauptsächlich durch seine Affinität zu Hyaluronsäure Eigenschaften, welche unter anderem essentiell für die Tumorentstehung sind (Cichy und Puré 2003). Sein Tumorgenesepotential wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass in vivo einzig aus Zellen mit CD44-Überexpression ein heterogener Tumor entstehen konnte (Prince *et al.* 2007). Uneinigkeit besteht hingegen darüber, ob das Glykoprotein CD44 uneingeschränkt zur Identifizierung von Tumorstammzellen eingesetzt werden kann (Mack und Gires 2008). Kritisiert wird sein ubiquitäres Vorkommen, sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumorgewebe (Jaggupilli und Elkord 2012). Arbeitsgruppen, welche die CD44-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern bei Adenokarzinomen der Speicheldrüsen assoziierten, wiesen Signifikanzen nur bei der Betrachtung mehrerer kombinierter Marker nach (Soave *et al.* 2013; Xu *et al.* 2017). Die alleinige Untersuchung der CD44-Expression wies lediglich einen Tendenz auf (Binmadi *et al.* 2016). Für PECA des Kopf-Hals-Bereichs finden sich widersprüchliche Aussagen über die Korrelation der CD44-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Überleben (Yang *et al.* 2013; Chai *et al.* 2014; Chen *et al.* 2014; Hildebrand *et al.* 2014).

Nanog ist ein Transkriptionsfaktor mit Homöodomäne, welcher in pluripotenten Zellen und sich entwickelnden Keimzellen nachweisbar ist (Chambers *et al.* 2003; Mitsui *et al.* 2003). Die Anwesenheit von Nanog gilt als Kennzeichen für Pluripotenz, während sein Verlust einen frühen Marker für Zelldifferenzierung darstellt. Für die prognostische Bedeutung von Nanog in Speicheldrüsenkarzinomen konnte ausschließlich in Mukoepitheloidkarzinomen eine signifikante Assoziation der perineuralen Tumordinfiltration mit einer starken Nanog-Expression hergestellt werden (Destro Rodrigues *et al.* 2017). Weitere klinisch-pathologische Parameter sowie das Gesamtüberleben korrelierten nicht mit dem Expressionsmuster von Nanog (Destro Rodrigues *et al.* 2017).

Oct-3/4 ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher wesentlich an der Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung von embryonalen Stammzellen beteiligt ist (Lee *et al.* 2006). Diese von der Oct-3/4-Menge abhängige Differenzierung der embryonalen Stammzellen ist laut aktueller Studienlage umkehrbar (Niwa *et al.* 2000). In verschiedenen Tumoren, inklusive in PECA der Mundhöhle (Ravindran *et al.* 2015), gelang es,

eine Oct-3/4-Expression mit einer schlechteren Prognose zu assoziieren. Eine Studie untersuchte auch Mukoepidermoidkarzinome der Speicheldrüsen und korrelierte eine Oct-3/4-Expression mit vorhandener perineuraler Infiltration (Destro Rodrigues *et al.* 2017).

Der Transkriptionsfaktor SOX2 spielt eine zentrale Rolle als Pluripotenzfaktor in embryonalen Stammzellen. So kommt es in Mäusen bei Verlust von SOX2 zur frühen embryonalen Letalität (Masui *et al.* 2007). Außerdem ist SOX2 in neuronalen Progenitorzellen nachweisbar – hier inhibiert der Transkriptionsfaktor die neuronale Differenzierung (Graham *et al.* 2003). Die SOX2-Expression in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen konnte bislang nur in wenigen Studien mit klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Überleben korreliert werden. (Dai *et al.* 2014; Sedassari *et al.* 2017). Auch die Rolle von SOX2 in PECA des Kopf-Hals-Bereiches stellt sich widersprüchlich dar (Lee *et al.* 2014; Bayo *et al.* 2015).

Vimentin ist als Intermediärfilament Bestandteil des Zytoskeletts und sorgt im Wesentlichen für die Aufrechterhaltung von Zellstruktur und die Gewebeintegrität der Zelle (Zhou *et al.* 2015). Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Tumorgenese und der epithelial-mesenchymalen Transition, welche entscheidend für die Metastasierung von Malignomen ist (Kidd *et al.* 2013). Bei der epithelialen-mesenchymalen Transition kommt es zur Hochregulation von Vimentin, wodurch epitheliale Tumorzellen eine spindelförmige Form annehmen und schließlich die Fähigkeit zur Migration erlangen (Moch *et al.* 2012). Für die prognostische Bedeutung von Vimentin in PECA des Kopf-Hals-Bereiches waren in bereits publizierten Daten einheitliche Ergebnisse zu verzeichnen. So wurde eine starke Vimentin-Expression mit einem niedrigeren Gesamtüberleben sowohl in PECA der Mundhöhle als auch der Zunge assoziiert (Zhou *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017).

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Speicheldrüsenkarzinome sind seltene Tumore mit einer enormen histologischen Entitätenvielfalt. Zudem sind sie mit einer ungünstigen Prognose verbunden, so dass es von großer Bedeutung ist klinische und immunhistochemische Prognoseparameter zu ermitteln, die eine frühzeitige Einstufung der aggressiven Speicheldrüsenmalignome ermöglichen.

Bislang haben retrospektive Arbeiten gezeigt, dass das Tumorstadium der wichtigste prognostische Faktor ist. Als potentielle prognostische immunhistochemische Marker in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen werden ALDH1, BMI-1, CD133, CD44, Nanog, Oct-3/4 und SOX2 diskutiert. Eine alleinige Betrachtung von PECA der Speicheldrüsen mit den genannten Markern, einschließlich Vimentin, wurde bislang nicht durchgeführt.

In dieser Dissertation erfolgte die retrospektive Auswertung von klinisch-pathologischen Parametern aller Patienten, welche von 2003 bis 2015 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (HNO) der Universität Göttingen aufgrund eines Speicheldrüsenmalignoms behandelt wurden. Zudem wurden am entnommenen Tumorgeewebe die immunhistochemischen Färbungen von ALDH1, BMI-1, CD133, CD44, Nanog, Oct-3/4, SOX2 und Vimentin durchgeführt.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Ist die Prognose eines Speicheldrüsenkarzinoms abhängig von klinisch-pathologischen Parametern sowie von einer adjuvanten Radiotherapie?
- Lässt sich das Expressionsmuster der potentiellen prognostischen Marker ALDH1, BMI-1, CD133, CD44, Nanog, Oct-3/4, SOX2 und Vimentin mit dem Überleben korrelieren und gibt es einen Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern?
- Besteht ein Unterschied in der prognostischen Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter und der immunhistochemischen Marker bei separater Betrachtung von primären bzw. kutanen, in die *Glandula parotidea* metastasierten PECA?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Retrospektiv wurden die Krankendaten aller konsekutiven Patienten ausgewertet, welche wegen eines epithelialen Speicheldrüsenmalignoms in der *Glandula parotidea* oder *Glandula submandibularis* in den Jahren von 2003 bis 2015 in der Klinik für HNO der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen operativ behandelt wurden. Vervollständigt wurden die Daten durch die Kontaktaufnahme zu den behandelnden Hausärzten. Zu Beginn der Datenerhebung lag ein positives Ethikvotum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen vom 09.12.2016 mit dem Aktenzeichen 2/1/17 vor. Es wurden folgende Parameter erhoben: Geschlecht, Patientenalter, Tumorentität, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium, histologisches Grading, primäre Tumorlokalisierung, perineurale Infiltration, Therapiekonzept, ein vorausgegangener Hauttumor sowie die Rezidiv- und Überlebensraten. Die Patientenanzahl von 132 wurde durch Abfrage von SAP und der Pathologie-Datenbank Nexus ermittelt. Gemäß der einheitlich definierten Ausschlusskriterien wurden für die vorliegende Arbeit 71 Patienten weiter analysiert. Die Ausschlusskriterien umfassten die postoperative Diagnose eines Lymphoms, keine Primärtherapie in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, die Ablehnung der Operation, das Fehlen von Tumorgewebe im Pathologie-Archiv sowie Metastasen in der Speicheldrüse – hiervon waren Hauttumormetastasen ausgenommen.

Die histopathologischen Befunde wurden durch das Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen erhoben. Dies erfolgte gemäß der zu Beginn der Dissertation aktuellsten Ausgabe der WHO-Klassifikation von 2005 (Eveson *et al.* 2005) und der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) von 2002 und 2009, welche keine Unterschiede in der TNM-Klassifikation der malignen Speicheldrüsentumore aufweisen (Sobin und Wittekind 2002; Sobin *et al.* 2009). Aus Gründen des unterschiedlichen prognostischen Verhaltens wurde die Auswertung der Adenokarzinome (n = 40) und der PECA (n = 31) separat vorgenommen. Zusätzlich wurden primäre PECA getrennt von kutanen, in die Parotis metastasierten PECA betrachtet. Alle PECA, denen ein Hauttumor vorausging, wurden als Hautmetastasen gewertet und nicht als primäres PECA der Speicheldrüsen.

## 2.2 Materialliste

Einen Überblick über die verwendeten Antikörper, Geräte, molekularbiologischen Agenzien, Materialien und Softwares geben die Tabellen 2-5.

**Tabelle 2: Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Verstärkersystem
ALDH1	ABCAM, Cambridge, Großbritannien	1:200	FLEX+Rabbit
BMI-1	CellSignalling, Leiden, Niederlande	1:200	FLEX+Rabbit
CD 133	MACS, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:50	FLEX+Mouse
CD 44	CellSignalling, Leiden, Niederlande	1:50	FLEX
Nanog	CellSignalling, Leiden, Niederlande	1:12800	FLEX+Mouse
Oct-3/4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:50	FLEX+Mouse
SOX-2	Cell Marque, California, USA	ready to use	FLEX+Rabbit
Vimentin	Agilent, Hamburg, Deutschland	ready to use	FLEX

**Tabelle 3: Geräte**

Geräte	Hersteller
<i>AutostainerLink 48</i>	Dako, Hamburg, Deutschland
Brutschrank 65°C	Memmert, Schwabach, Deutschland
Dako Omnis	Dako, Hamburg, Deutschland
Microtom Leica SM2000R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Axio Scope.A1	Zeiss, Jena, Deutschland
<i>PT Link</i>	Dako, Hamburg, Deutschland
<i>Tissue-Tek Film Coverslipper</i>	Sacura, Staufen, Deutschland
<i>Tissue-Tek Prisma-E2S Slide Stainer</i>	Sacura, Staufen, Deutschland

**Tabelle 4: Molekularbiologische Agenzien und Materialien**

Molekularbiologische Agenzien und Materialien	Hersteller
<i>Clearify Clearing Agent</i>	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX + Mouse (LINKER)	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX + Rabbit (LINKER)	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX Substrate, Working Solution	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX TRS	Agilent, Hamburg, Deutschland
EnV FLEX/HRP	Agilent, Hamburg, Deutschland
Ethanol 96 %, 99 %	ChemSolute, Renningen Deutschland
FLEX/DAB+Substrat-Chromogen	Agilent, Hamburg, Deutschland
Hematoxylin	Agilent, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser Braunschweig, Deutschland
<i>Tissue-Tek Coverslipping Film</i>	Sacura, Staufen, Deutschland
Waschpuffer	Agilent, Hamburg, Deutschland
Xylol	ChemSolute, Renningen Deutschland

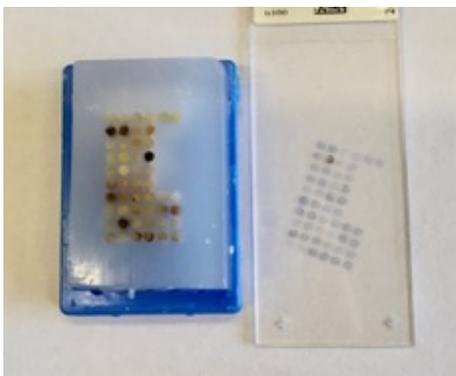
**Tabelle 5: Software**

Software	Hersteller
<i>easyROC web-tool 1.3</i>	Hacettepe Universität, Ankara, Türkei
Excel 2017	Microsoft Europe, Berlin, Deutschland
<i>Cluster 3.0</i>	Stanford Universität, Stanford, USA
Nexus	NEXUS AG, Donaueschingen, Deutschland
SAP 2015	SAP, Walldorf, Deutschland
Statistica 13.1	StatStoft Europe, Hamburg, Deutschland
Word 2017	Microsoft Europe, Berlin, Deutschland
ZEN 2012 ( <i>Blue edition</i> )	ZEISS, Jena, Deutschland

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Tissue-Microarrays

*Tissue-Microarrays* (TMAs) bilden einen Zusammenschluss von mehreren Gewebeproben in Form von Zylinderstanzen auf einem Paraffinblock. Anhand dieser wird das Auswerten der immunhistochemischen Färbungen eines großen Kollektivs erleichtert. Die Anordnung der Stanzen wurde tabellarisch und visuell festgehalten (Abb. 2).



**Abbildung 2: TMAs und zugehöriger immunhistochemischer Schnitt.**

### 2.3.2 Immunhistochemie

Antikörper binden über das Schlüssel-Schloss-Prinzip ausschließlich an bestimmte Moleküle, die sogenannten Antigenen. Die Affinität von Antikörpern zu dem zu untersuchenden Antigen wird sich in der Immunhistochemie zu Nutze gemacht. Hierzu wird der Antikörper-Antigenkomplex in einem histologischen Präparat mit verschiedenen Detektionssystemen visualisiert. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Detektionsschritte (indirektes oder direktes Verfahren), in der Art der Blockierung von unspezi-

fischen Bindungsstellen des Antikörpers sowie durch das verwendete Verstärkersystem (Linke 2012). Schnelle Durchführung, geringe Kosten, einfache Aufbewahrung angefertigter Schnitte und die Auswertung lediglich unter dem Lichtmikroskop sind Vorteile der Immunhistochemie. Der geringen Objektivität aufgrund der Auswertung anhand eines Scoringsystems, steht die hohe Standardisierung durch den Einsatz eines Färbvollautomaten entgegen. In einem computergesteuerten Automaten erfolgt die Erkennung der Schnitte anhand von Barcodes, wodurch Verwechslungen vermieden werden. Somit wird ein exaktes, reproduzierbares und schnelles Ergebnis erzielt.

Zur Vorbereitung der Färbung der Antikörper gegen ALDH1 (1:200 FLEX+Rabbit, ABCAM, Cambridge, Großbritannien), CD133 (1:50 FLEX+Mouse, MACS, Bergisch Gladbach, Deutschland), CD44 (1:50, FLEX, CellSignalling, Leiden, Niederlande), BMI-1 (1:200 FLEX+Rabbit, CellSignalling, Leiden, Niederlande), Oct-3/4 (1:50 FLEX+Mouse, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Nanog (1:12800 FLEX+Mouse, CellSignalling, Leiden, Niederlande) und Vimentin (FLEX, Agilent, Hamburg, Deutschland) wurden 1 µm dicke Schnitte der TMAs mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Microtom Leica SM2000R, Leica, Wetzlar, Deutschland) erstellt und auf einen Objektträger (Menzel-Gläser Braunschweig, Deutschland) aufgetragen. Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 65 °C für 20 Minuten aufbewahrt, um dann demaskiert zu werden. Die Demaskierung diente dazu, die durch die Fixierung quervernetzten Bindungsstellen des Antikörpers im Gewebe wieder freizulegen. Dieser Prozess erfolgte vollautomatisiert in drei Schritten im *PT Link* (Dako, Hamburg, Deutschland). Zuerst wurde der Automat auf 85 °C vorgewärmt, dann für 15 Minuten auf 97 °C erhitzt, um letztendlich wieder auf 85 °C heruntergekühlt zu werden. Der Objektträger mit dem Schnitt wurde anschließend zum Abkühlen in Waschpuffer (Agilent, Hamburg, Deutschland) überführt. Schließlich erfolgte die immunhistochemische Färbung mittels des Färbeautomaten *AutostainerLink 48* (Dako, Hamburg, Deutschland). Nach Auftragen von EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Agilent, Hamburg, Deutschland) für 5 Minuten, inkubierten die primären Antikörper für 30 Minuten und das Verstärkersystem für weitere 15 Minuten. Zur Entwicklung der Färbung wurde ein Diaminobenzidi FLEX/DAB+Substrat-Chromogen (Agilent, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben und mit Hämatoxylin (Agilent, Hamburg, Deutschland) gegengefärbt. Nach jedem dieser Schritte erfolgte eine Spülung mit Waschpuffer. Letztendlich wurden die Schnitte luftgetrocknet, um dann mit *Tissue-Tek Coverslipping Film* (Sacura, Staufen, Deutschland) abgedeckt zu werden. Die Färbeprotokolle der genannten Antikörper variierten nur in der Verwendung des Verstärkersystems (Tab. 2).

Die Färbung des Antikörpers gegen SOX2 (FLEX+Rabbit, Cell Marque, California, USA) wurde hingegen mit dem Färbvollautomaten Dako Omnis (Dako, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zu Beginn wurde das Wachs mittels *Clearify Clearing Agent* (Agilent, Hamburg, Deutschland) als Lösungsmittel bei 25 °C entfernt. Die Demaskierung erfolgte für 30 Minuten bei 97 °C durch Auftragen von EnV FLEX TRS (Agilent, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde der Antikörper gegen SOX2 hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert. Zum Blocken wurden die Schnitte mit EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Agilent, Hamburg, Deutschland) für 3 Minuten inkubiert. EnV FLEX+ Rabbit LINKER (Agilent, Hamburg, Deutschland) wurde als Verstärkungssystem verwendet. Zur Entwicklung der Färbung wurde ein Diaminobenzidin FLEX/DAB+Substrat-Chromogen hinzugegeben und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils 10 Mal mit Waschpuffer für 2 Minuten gespült. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (ChemSolute, Renningen Deutschland) (Ethanol 75 %, 96 % und 3 Mal 100 %) für je 1 Minute behandelt und 3 Mal in Xylol (ChemSolute, Renningen Deutschland) getaucht, um dann mit *Tissue-Tek Film Coverslipper* (Sacura, Staufen, Deutschland) abgedeckt zu werden.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung berücksichtigte den Prozentsatz der gefärbten Zellen und die Intensität der Färbung. Hierzu wurde unter dem Lichtmikroskop (Mikroskop Axio Scope.A1, Zeiss, Jena, Deutschland) für jede gefärbte Gewebestanze festgelegt, wie viel Prozent der vorhandenen Tumorzellen den vorher definierten Kategorien 0 bis 3 zuzuordnen waren (0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mittel positiv, 3 = stark positiv). Aus dieser Einteilung wurde der H-Score mittels folgender Formel berechnet (Ishibashi *et al.* 2003):

$$\text{H-Score} = 1 \times \text{Prozent Kategorie 1} + 2 \times \text{Prozent Kategorie 2} + 3 \times \text{Prozent Kategorie 3}$$

Dieser Score reicht somit von 0-300 und der Maximalwert spricht für 100 % stark gefärbte Zellen. Der nun für jede Gewebestanze bzw. jeden Patienten erhaltene Zahlenwert wurde den jeweiligen klinischen-pathologischen Parametern zugeordnet.

Für das Kollektiv der Adenokarzinome wurden zur Einteilung der Färbeintensität in „stark“ und „schwach“ Trennwerte anhand einer *Receiver-Operating-Characteristic-Kurve* (ROC-Kurve) und des Youden-Index für die Antikörper SOX2, CD44 und BMI-1 berechnet. Diese Berechnung wurde mit Hilfe des freien Onlineprogramms *easyROC (a web-tool for ROC curve analysis ver. 1.3, Hacettepe Universität, Ankara, Türkei)* durchgeführt (Goksuluk *et al.* 2016). Der Youden-Index gibt einen bestmöglichen Trennwert an, um bei einer Erhebung zwei Gruppen zu unterscheiden. Dieser wird auf einer ROC-Kurve ermittelt, welche die Zusammenhänge von Spezifität und Sensitivi-

tät analysiert. Für SOX2 ergab sich ein Youden-Index von 30, für CD44 von 255 und für BMI-1 von 190. Im Falle von ALDH1 und Nanog wurde aufgrund von überwiegend mangelnder Expression der Wert 0 als Expressions-Grad „schwach“ definiert und eine vorhandene Färbung als Expressions-Grad „stark“ gewertet.

In den Gruppen der PECA wurden die Trennwerte der Antikörperfärbungen wie folgt festgelegt: Für ALDH1 und Vimentin wurde der Wert 0 als Expressions-Grad „schwach“ definiert und jegliche sichtbare Färbung als Expressions-Grad „stark“ gewertet. Für BMI-1 wurde der Trennwert bei 165 festgelegt. Der Median wurde für SOX2 (Median: 33) und CD44 (Median: 270) als Trennwert definiert.

Die Antikörper CD133 und Oct-3/4 zeigten in keinem Kollektiv eine Expression. Nanog wiederum wurde in der Gruppe der PECA nicht exprimiert. Deshalb erfolgten keine weiteren statistischen Auswertungen dieser Antikörper.

### 2.3.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mittels der Software Statistica, Version 13.1 (Stat-Soft Europe, Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Das Signifikanzniveau war bei allen Tests auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Mit Hilfe der univariaten Kaplan-Meier-Analyse wurde das Gesamtüberleben (OS), das krankheitsspezifische Überleben (DSS), das rezidivfreie Überleben (RFS) und die lokale Kontrollrate (LCR) berechnet (Kaplan und Meier 1958). Beim OS wurde der Tod, unabhängig von der Ursache, als Event gewertet und jeder lebende Patient bei der letzten Nachuntersuchung wurde zensiert. Das DSS bezog sich ausschließlich auf die Patienten, die durch den Primärtumor gestorben waren – andere Todesursachen wurden als zensiert betrachtet. Beim RFS wurden Lokalrezidive, Fernmetastasen und der Tod durch den Primärtumor als Event gewertet, wohingegen bei der LCR nur die Lokalrezidive als Event berücksichtigt wurden. Anschließend wurde der Einfluss der klinisch-pathologischen Parameter und der Einfluss der Färbeintensitäten („stark“ und „schwach“) auf die Überlebenszeiten ermittelt. Hierfür wurden die Kurven mit Hilfe des Log-rank-Tests verglichen.

Anhand des Chi-Quadrat-Tests und der *Odds Ratio* wurde auf einen Zusammenhang der klinischen-pathologischen Parameter (TNM-Klassifikation, UICC-Stadien, Lokalisation, Grading, Verdacht auf Hautmetastase, perineurale Infiltration) mit den immunhistochemischen Färbungen geprüft.

### 2.3.4 Heatmap

Die Clusteranalyse ermöglicht das Gruppieren von ähnlichen Genexpressionsmustern in einem Baumdiagramms (Eisen *et al.* 1998). Um zu untersuchen, ob Untergruppen

vorhanden waren, wurde mit Hilfe der Software „*Cluster 3.0*“ (Stanford Universität, Stanford, USA) im Kollektiv der Adenokarzinome die Expressionsmuster der Färbungen mit den Antikörpern gegen CD44, ALDH1, Nanog, SOX2 und BMI-1 und im Kollektiv der PECA die Expressionsmuster der Färbungen von CD44, SOX2, BMI-1 und ALDH1 analysiert. Die Distanzen im Baumdiagramm entsprachen den Ähnlichkeiten der Färbeintensitäten. Die Daten wurden anhand einer Quantilnormalisierung angepasst sowie Spalten und Zeilen durch die *average-linkage*-Methode geclustert. Die zwei mittels der *Heatmaps* erstellten Gruppen wurden daraufhin den klinisch-pathologischen Parametern zugeordnet. Die Untersuchung auf Zusammenhänge der Gruppen mit den klinisch-pathologischen Parametern und den Überlebenszeiten erfolgte anhand des Chi-Quadrat-Tests und der univariaten Kaplan-Meier-Analyse.

## **3 Ergebnisse**

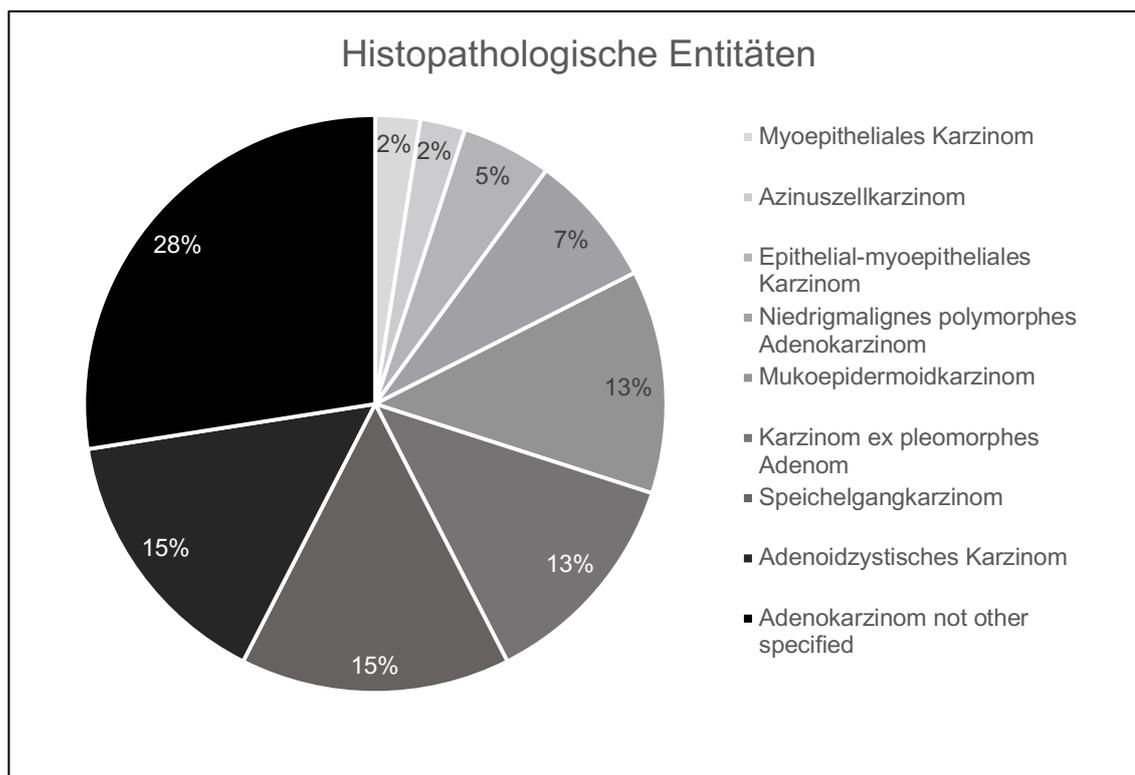
### **3.1 Gesamtkollektiv**

Insgesamt wurden 132 Patienten mit einem Malignom der Speicheldrüsen in der Klinik für HNO der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen von 2003 bis 2015 registriert. Gemäß der einheitlich definierten Ausschlusskriterien wurden für die vorliegende Arbeit 71 Patienten untersucht. Das Mittlere Diagnosealter lag bei  $70,0 \pm 16,0$  Jahren mit 67,6 % ( $n = 48$ ) Männern und 32,4 % ( $n = 23$ ) Frauen. Die Nachbeobachtungszeit betrug durchschnittlich  $34,5 \pm 35,6$  Monate.

### **3.2 Adenokarzinome**

#### **3.2.1 Daten zur Demographie und Erkrankung**

Die Einschlusskriterien wurden von 40 Patienten mit einem Adenokarzinom erfüllt. Die klinischen und pathologischen Daten sind in Tabelle 6 dargestellt. Es fanden sich mehr Männer (72,5 %,  $n = 29$ ) als Frauen (27,5 %,  $n = 11$ ). Das mittlere Diagnosealter betrug  $64,4 \pm 16,9$  Jahre (23-85 Jahre). Abbildung 3 zeigt die Verteilung der Patienten mit Manifestation eines Adenokarzinoms in Bezug auf die verschiedenen histopathologischen Entitäten.



**Abbildung 3: Verteilung der histopathologischen Entitäten in der Gruppe der Patienten mit einem Adenokarzinom.**

Die Nachbeobachtungszeit ab Operationsdatum betrug durchschnittlich  $41,8 \pm 42,0$  Monate (0-163 Monate). In 25,0 % der Fälle ( $n = 10$ ) entwickelten die Patienten nach durchschnittlich  $39,0 \pm 41,0$  Monaten ein Rezidiv. Fünf dieser Patienten entwickelten Fernmetastasen mit Lokalisation in der Lunge, in den Knochen oder im Gehirn. In dem Patientenkollektiv erfolgte in drei Fällen (7,5 %) eine Resektion des Primarius ohne Neck Dissection oder adjuvanter Therapie, in 15 Fällen (37,5 %) eine Tumorresektion mit Neck Dissection, in zwei Fällen (5 %) eine Tumorresektion mit adjuvanter Bestrahlung sowie in 20 Fällen (50 %) eine Tumorresektion mit Neck Dissection und adjuvanter Bestrahlung. Die alleinige Tumorresektion war bei einem der drei Patienten indiziert. In den anderen beiden Fällen wurde eine adjuvante Therapie abgelehnt. Die Tumorresektion in Kombination mit einer Neck Dissection ohne adjuvante Radiotherapie war bei elf der 15 Patienten indiziert. Fünf weitere Patienten lehnten eine Radiatio entweder ab ( $n = 2$ ) oder der Grund für eine nicht durchgeführte adjuvante Radiotherapie konnte anhand der Akten nicht ermittelt werden ( $n = 2$ ).

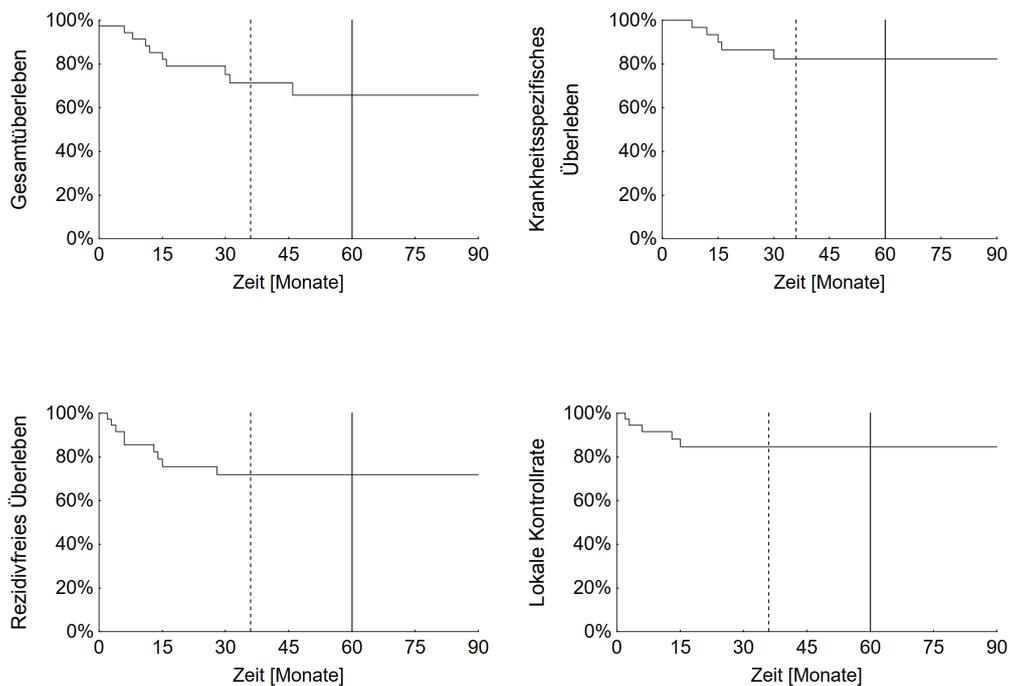
**Tabelle 6: Klinisch-pathologische Parameter des Adenokarzinom-Kollektivs**

	n	%
<b>Geschlecht</b>		
männlich	29	72,5
weiblich	11	27,5
<b>Lokalisation</b>		
Parotis	28	70
Submandibularis	12	30
<b>Histologisches Grading</b>		
G1	8	20
G2	21	52,5
G3	11	27,5
<b>pTNM-Klassifikation</b>		
T1-2	20	50
T3-4	20	50
N0	21	52,5
N1	4	10
N2	13	32,5
N3	2	5
<b>UICC-Stadium</b>		
I-II	14	35
III-IV	26	65
<b>R-Status</b>		
R0	36	90
R1	3	7,5
Rx	1	2,5
<b>Pn</b>		
Pn0	26	65
Pn1	14	35
<b>Therapie</b>		
Tumorresektion	3 <sup>a</sup>	7,5
Tumorresektion + ND	15 <sup>b</sup>	37,5
Tumorresektion + RT	2	5
Tumorresektion + ND + RT	20	50
<b>Rezidiv</b>	10	25

ND, Neck Dissection; n, Fallzahl; RT, Radiotherapie; pn, perineurale Infiltration; R, Resektionsstatus; TNM, *tumor, nodal, metastasis stage*; UICC, International Union Against Cancer; a: 2x Radiotherapie + weitere Operationen abgelehnt, 1x keine Indikation für weitere Therapien; b: 11x keine Indikation für RT, 2x RT abgelehnt, 2x Indikation für RT (Grund des Ausbleibens unklar)

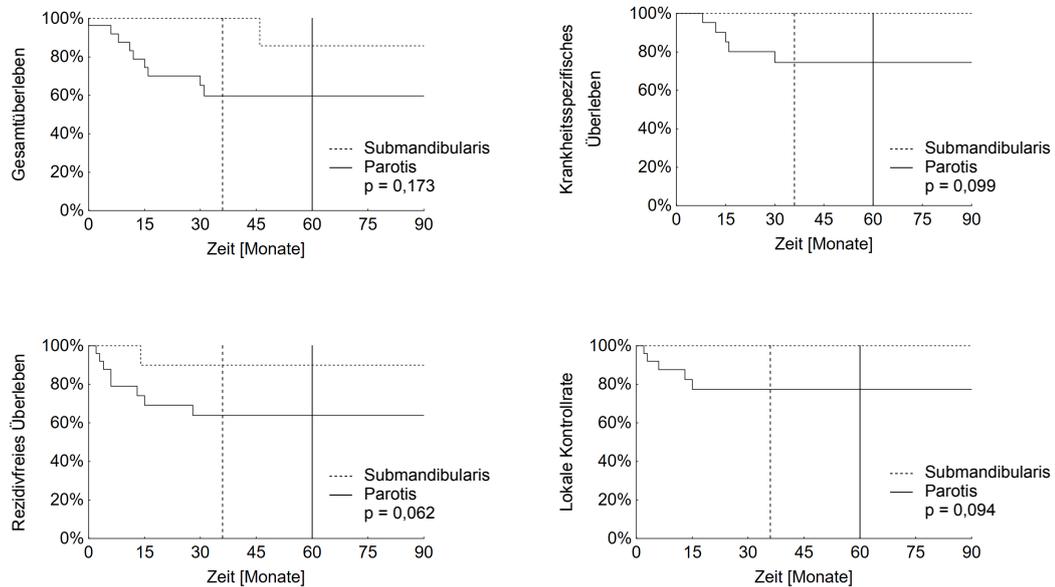
### 3.2.2 Überlebenszeiten

Insgesamt errechnete sich in der Gruppe der Patienten mit der Manifestation eines Adenokarzinoms ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 65,8 % und ein krankheitsspezifisches 5-Jahres-Überleben von 82,4 %. Das rezidivfreie 5-Jahres-Intervall betrug 71,9 % und die lokale 5-Jahres-Kontrollrate lag bei 84,6 % (Tab. 7, Abb. 4).



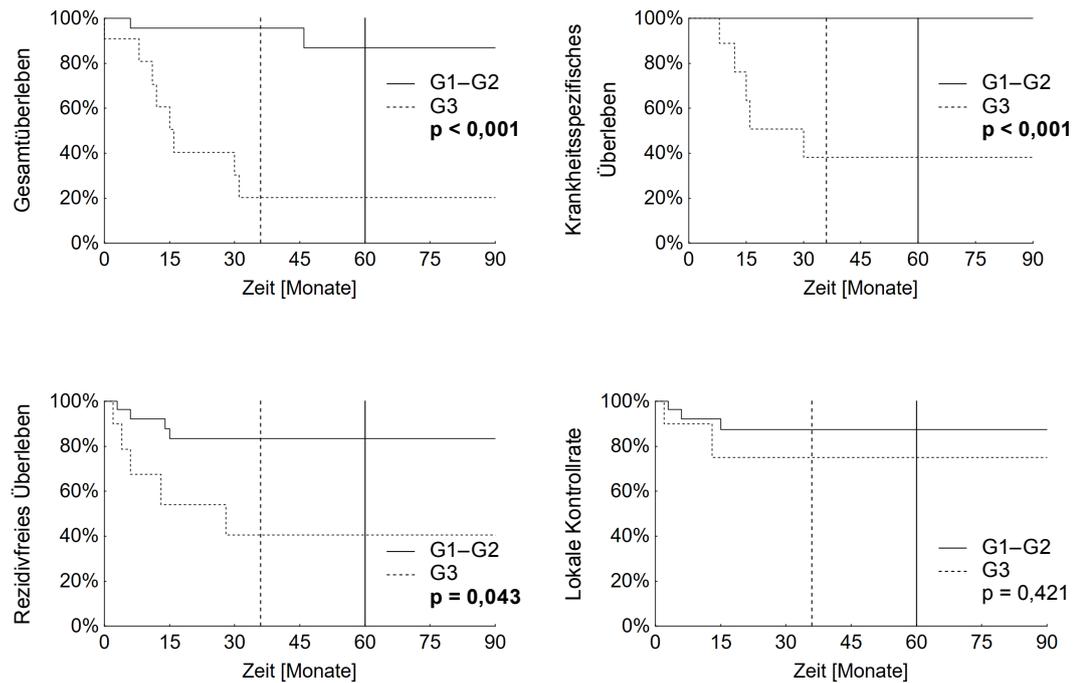
**Abbildung 4: Kaplan-Meier-Analyse des Kollektivs der Adenokarzinome.** Es wurden das Gesamtüberleben, das krankheitsspezifische Überleben, das rezidivfreie Überleben und die lokale Kontrollrate von 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse berechnet.

Es zeigen sich in Abbildung 5 geringere Überlebensraten bei Patienten mit einem Karzinom in der *Glandula parotidea*. Dieser Unterschied ist jedoch für keine der betrachteten Überlebensraten signifikant (Tab. 7).



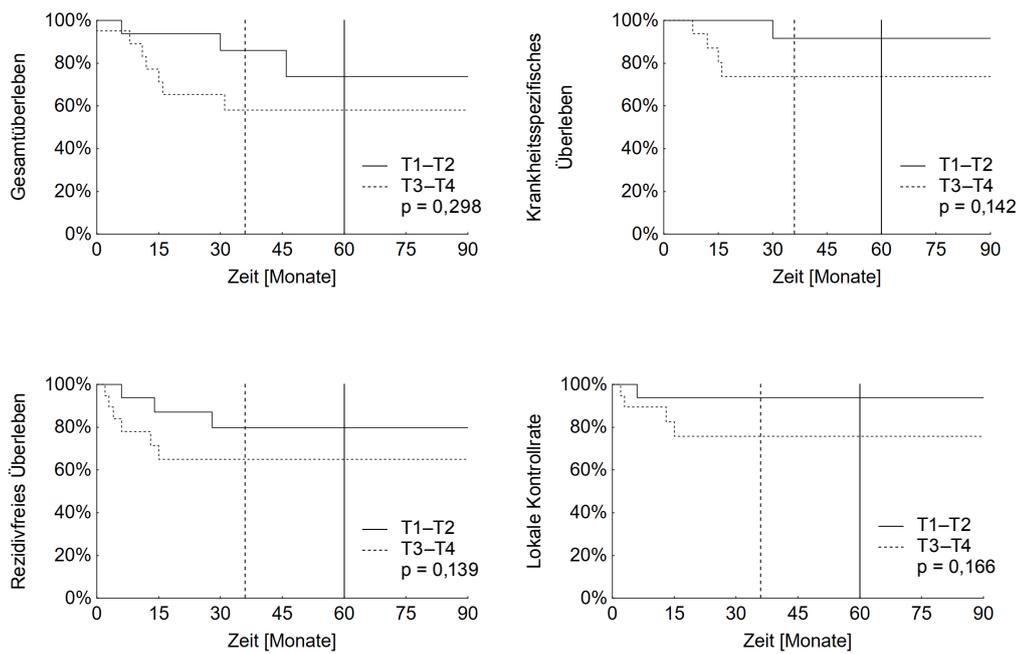
**Abbildung 5: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Einen signifikanten Einfluss hatten die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Tumore auf die Überlebenszeiten. So war das Gesamtüberleben ( $p < 0,001$ , Log-Rank-Test), das krankheitsspezifische Überleben ( $p < 0,001$ , Log-Rank-Test) und das rezidivfreie Überleben ( $p = 0,043$ , Log-Rank-Test) der Patienten mit hochmalignen Tumoren (G3) signifikant niedriger als im Falle von niedrigmalignen Tumoren (G1-2) (Abb. 6, Tab. 7).



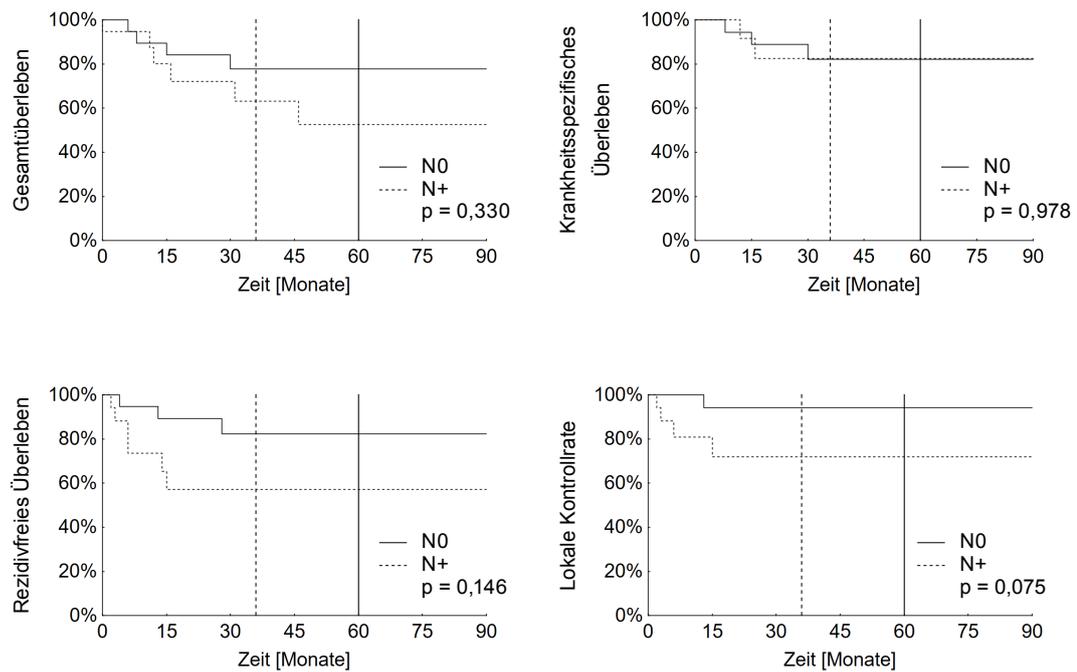
**Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom histologischen Grading.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des rezidivfreien Überlebens. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Die 5-Jahres-Beobachtungen deuten darauf hin, dass Patienten mit einer hohen T-Kategorie schlechtere Überlebenszeiten aufwiesen (Tab. 7, Abb. 7). Trotzdem blieb dieser diskrepante Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven für die T-Kategorien (T1-2 vs. T3-4) ohne Signifikanz.



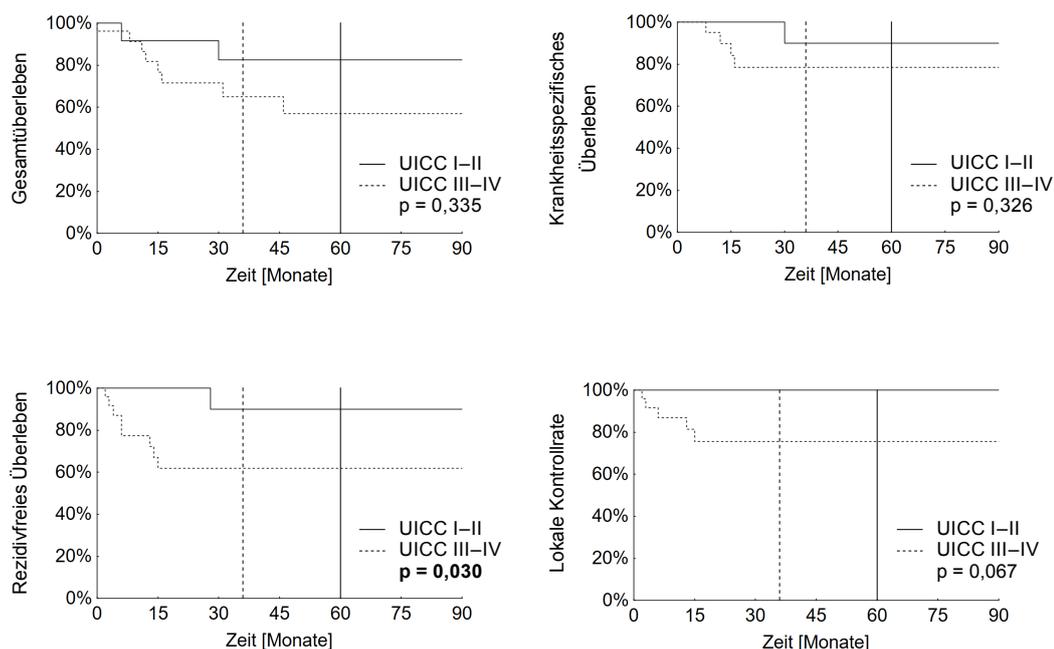
**Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der T-Kategorie des Tumors.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Ein positiver Lymphknotenstatus ging mit geringeren Überlebensraten einher, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 8).



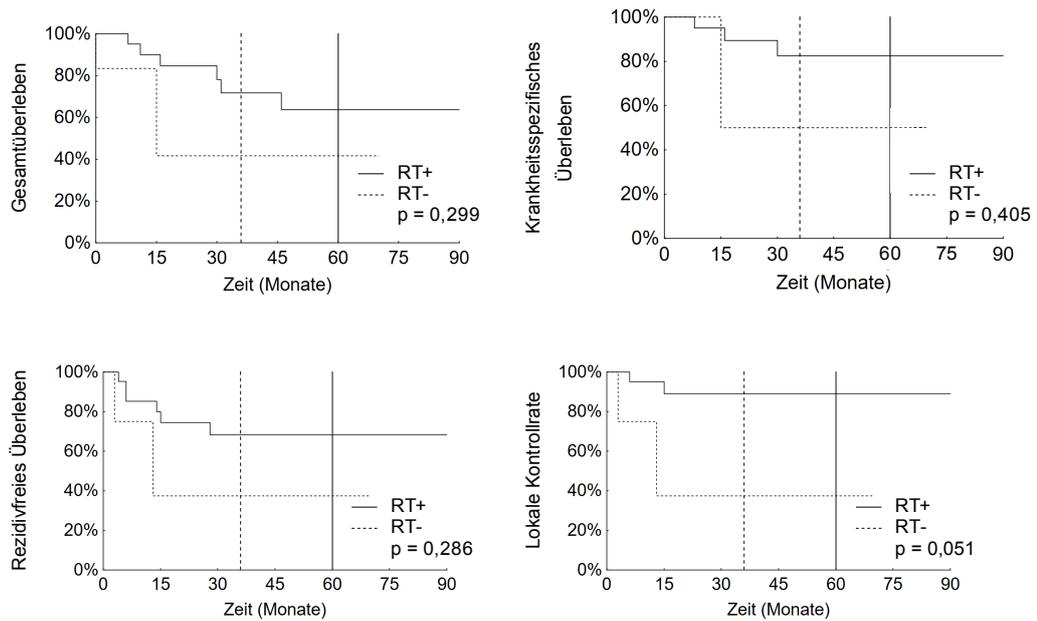
**Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der N-Kategorie des Tumors.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

In Abbildung 9 zeigen sich geringere Überlebensraten bei Patienten mit einem UICC-Stadium III-IV. Es errechnete sich ein negativer signifikanter Zusammenhang des UICC-Stadiums bezogen auf das rezidivfreie Überleben ( $p = 0,030$ , Log-Rank-Test).



**Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit des UICC-Stadiums des Tumors.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des rezidivfreien Überlebens. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Anhand einer univariaten Kaplan-Meier-Analyse wurden sechs Patienten mit Indikation zur Radiotherapie, welche keine adjuvante Bestrahlung erhielten, mit 22 Patienten mit indizierter Radiotherapie, welche eine adjuvante Radiotherapie erhielten, verglichen (Abb. 10). Daraus ergab sich, dass die Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie mit einer tendenziell besseren lokalen Kontrollrate einherging ( $p = 0,051$ , Log-Rank-Test). Die lokale 5-Jahres-Kontrollrate betrug mit Radiatio 89,1 % und ohne Radiatio 37,5 % (Tab. 7). Auch die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben, das krankheitsspezifische Überleben und das rezidivfreie Überleben deuten auf einen positiven Einfluss der adjuvanten Bestrahlung hin, allerdings sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie.** Es wurden die Überlebensraten von insgesamt 28 Patienten mit einem Adenokarzinom in der Speicheldrüse mit einer Indikation für eine adjuvante Radiotherapie, die diese erhielten oder nicht erhielten, mittels des Log-Rank-Test verglichen.

Das Geschlecht stellte zwar keinen signifikanten Einflussfaktor dar, doch waren die Überlebenszeiten für das weibliche Geschlecht im Vergleich besser (Tab. 7). Auch beim Betrachten des Patientenalters konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

**Tabelle 7: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter für 40 Patienten mit einem Adenokarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
Gesamt	40	71,3	65,8		82,4	82,4		71,9	71,9		84,6	84,6	
Geschlecht													
weiblich	11	88,9	88,9	0,138	100,0	100,0	0,130	87,5	87,5	0,497	87,5	87,5	0,648
männlich	29	64,4	58,0		75,5	75,5		66,1	66,1		83,7	83,7	
Alter													
< 60	18	76,5	76,5	0,195	81,3	81,3	0,752	75,6	75,6	0,778	86,7	86,7	0,557
≥ 60	22	66,2	49,6		83,6	83,6		68,5	68,5		83,1	83,1	
Lokalisation													
Parotis	28	59,7	59,7	0,173	74,5	74,5	0,099	63,8	63,8	0,062	77,3	77,3	0,094
Submandibularis	12	100,0	85,7		100,0	100,0		90,0	90,0		100,0	100,0	
Grading													
G1-2	29	95,7	87,0	<b>&lt;0,001</b>	100,0	100,0	<b>&lt;0,001</b>	83,3	83,3	<b>0,043</b>	87,5	87,5	0,421
G3	11	20,2	20,2		38,1	38,1		40,5	40,5		75,0	75,0	
N-Kategorie													
N0	21	77,7	77,7	0,330	82,1	82,1	0,978	82,3	82,3	0,146	94,1	94,1	0,075
N+	19	63,1	52,6		82,5	82,5		57,2	57,2		71,9	71,9	
T-Kategorie													
T1-T2	20	85,9	73,7	0,298	91,7	91,7	0,142	79,8	79,8	0,139	93,8	93,8	0,166
T3-T4	20	58,1	58,1		73,7	73,7		64,9	64,9		75,7	75,7	
UICC-Stadium													
UICC I-II	14	82,5	82,5	0,355	90,0	90,0	0,326	90,0	90,0	<b>0,030</b>	100,0	100,0	0,067
UICC III-IV	26	65,0	56,9		78,5	78,5		61,9	61,9		75,6	75,6	
Radiotherapie (Indikation vorhanden)													
RT +	22	71,7	63,7	0,299	82,5	82,5	0,405	68,3	668,3	0,286	89,1	89,1	0,051
RT -	6	41,7	41,7		50,0	50,0		37,5	37,5		37,5	37,5	

DSS, *disease specific survival*; G, Grading; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; N, N-Kategorie; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; RT, Radiotherapie; T, *tumor size*; UICC, International Union Against Cancer; Signifikanzen fett gedruckt

### 3.2.3 Immunhistochemische Auswertung

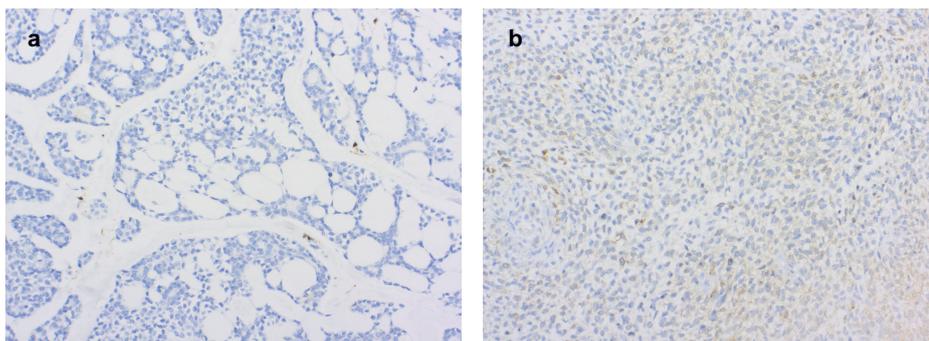
Die Expression der zu untersuchenden Marker in Biopsien der Adenokarzinome wurde immunhistochemisch dargestellt und in die Kategorien „stark“ und „schwach“ eingeteilt (s. Kapitel 2.3.2). Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Tumorproben auf die genannten Kategorien für die einzelnen Marker.

**Tabelle 8: Immunhistochemische Färbung im Kollektiv der Adenokarzinome**

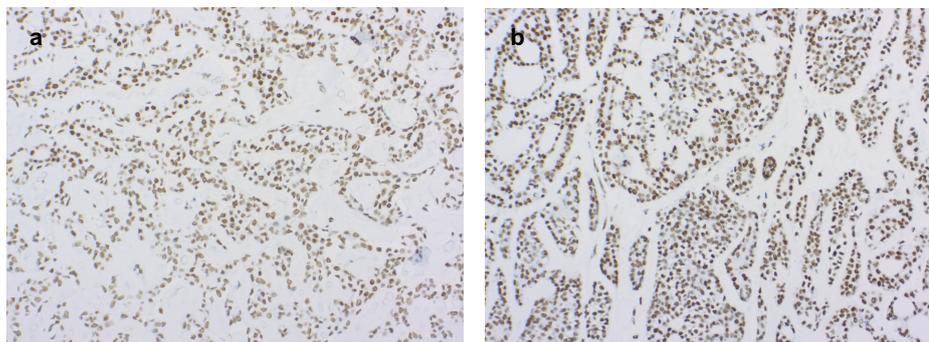
	schwach		stark	
	n	%	n	%
ALDH1	36	90	4	10
BMI-1	19	47,5	21	52,5
CD133	0	0	0	0
CD44	28	70	12	30
Nanog	36	90	4	10
Oct-3/4	0	0	0	0
SOX2	33	82,5	7	17,5

n, Fallzahl

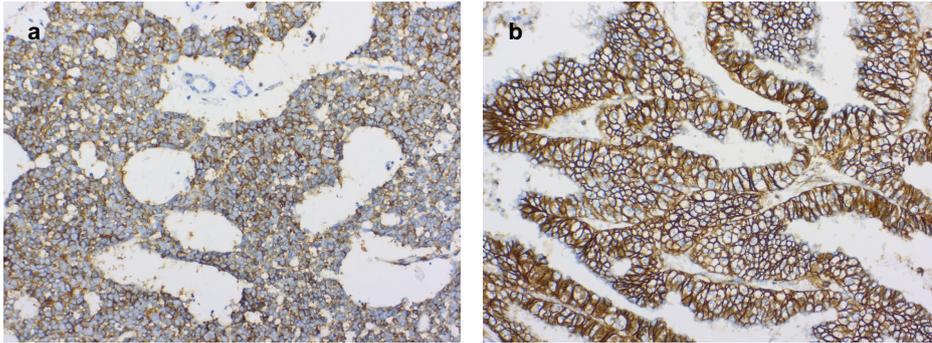
Die Abbildungen 11-15 stellen beispielhaft die immunhistochemischen Färbungen der untersuchten Marker dar. Die Antikörper gegen BMI-1 und SOX2 färbten nukleär, die Antikörper gegen CD44 membranös und die Antikörper gegen ALDH1 sowie Nanog zytoplasmatisch.



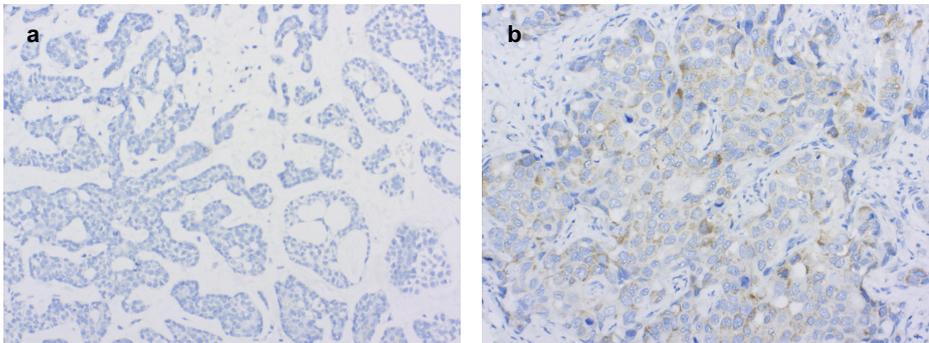
**Abbildung 11: ALDH1-Expression** (x200) a) am Beispiel eines adenoidzystischen Karzinoms mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) am Beispiel eines myoepithelialen Karzinoms mit starker immunhistochemischer Färbung



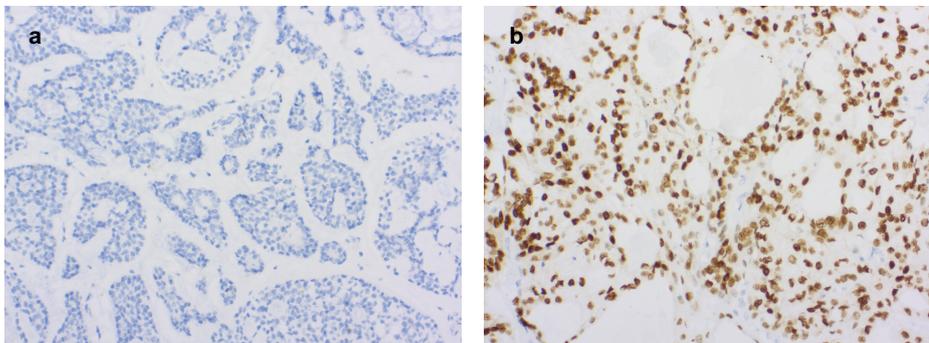
**Abbildung 12: BMI-1-Expression** (x200) am Beispiel eines adenoidzystischen Karzinoms mit a) schwacher und b) starker immunhistochemischer Färbung



**Abbildung 13: CD44-Expression** (x200) a) am Beispiel eines Karzinoms ex pleomorphen Adenoms mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) am Beispiel eines Adenokarzinoms NOS mit starker immunhistochemischer Färbung



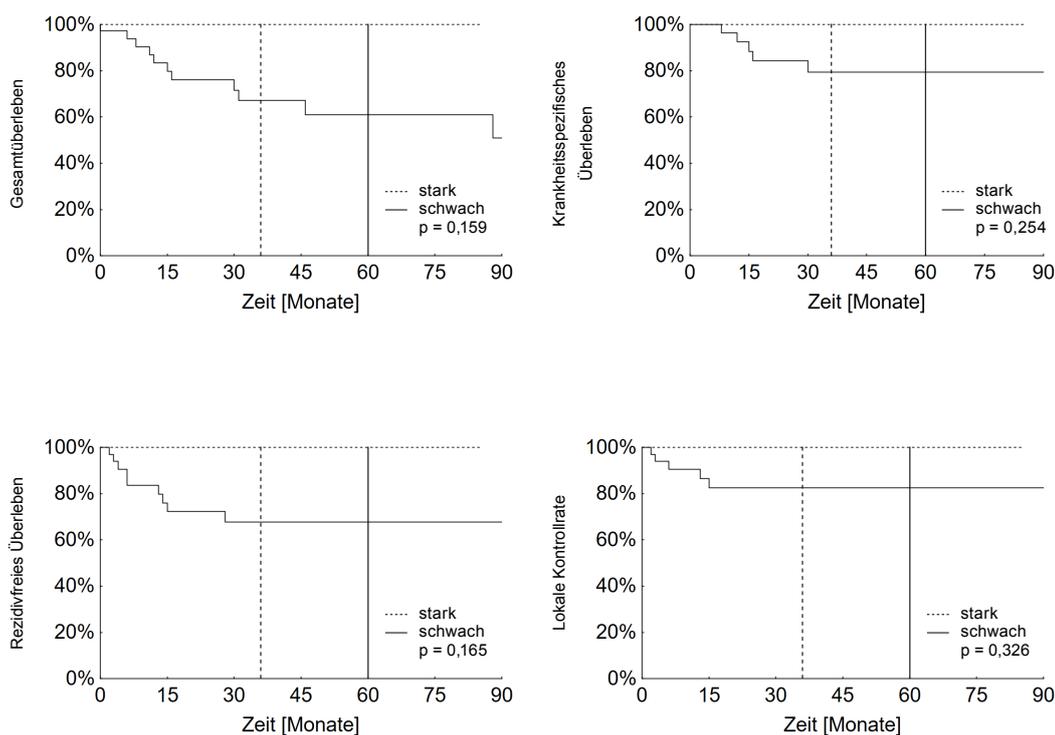
**Abbildung 14: Nanog-Expression** (x200) a) am Beispiel eines adenoidzystischen Karzinoms mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) am Beispiel eines Karzinoms ex pleomorphen Adenoms mit starker immunhistochemischer Färbung



**Abbildung 15: SOX2-Expression** (x200) a) am Beispiel eines adenoidzystischen Karzinoms mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) am Beispiel eines niedrigmalignen polymorphen Adenokarzinoms mit starker immunhistochemischer Färbung

### 3.2.3.1 ALDH1

Für eine ALDH1-Überexpression in der Patientengruppe der Adenokarzinome wurden höhere 5-Jahres-Überlebenszeiten beobachtet, als bei fehlender ALDH1-Expression, jedoch blieben diese Unterschiede ohne statistische Signifikanz (Abb. 16, Tab. 9). Außerdem trat eine schwache ALDH1-Expression vermehrt in High-grade-Tumoren auf, was sich auch in der starken Korrelation der Expression von ALDH1 mit dem Grading widerspiegelte ( $p < 0,001$ , Chi-Quadrat-Test) (Tab. 10).

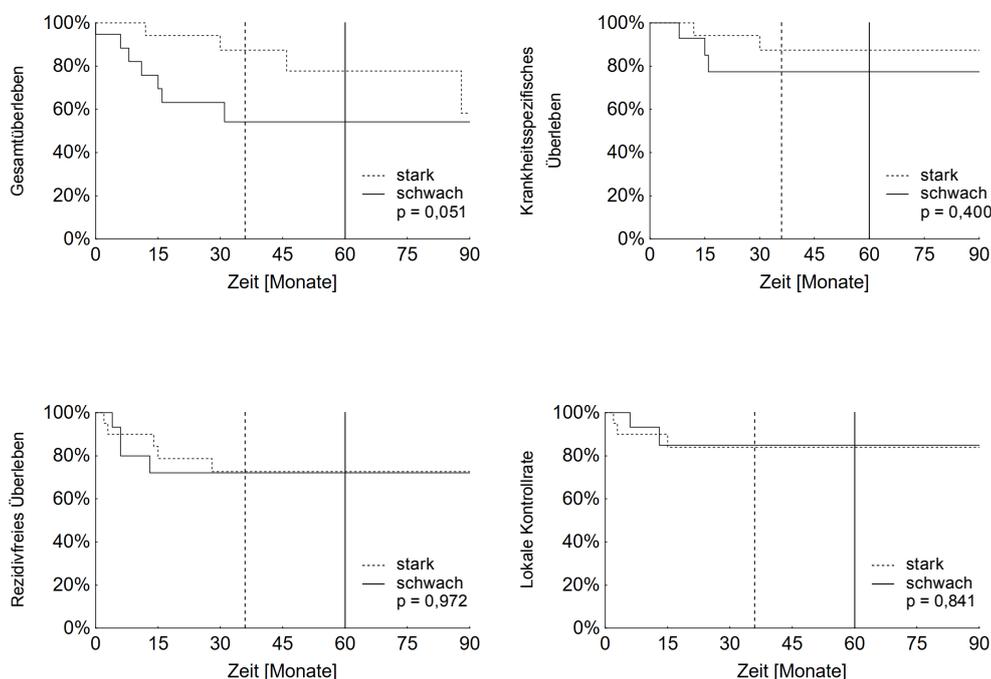


**Abbildung 16: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von ALDH1.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.2.3.2 BMI-1

Es ergab sich für Patienten mit einem Adenokarzinom, die einen Expressions-Grad „schwach“ von BMI-1 aufwiesen, ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 54,1 % (Abb. 17, Tab. 9). Für Patienten die einem Expressions-Grad „stark“ von BMI-1 zugeordnet wurden, berechnete sich ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 77,7 %. Die statistische Auswertung deutet mit einem p-Wert, welcher mit 0,051 nur knapp unter dem vorher festgelegtem Signifikanzniveau liegt, auf einen merklichen Unterschied hin ( $p = 0,051$ , Log-Rank-Test). Die Analyse mittels des Chi-Quadrat-Tests der BMI-1-Expression im

Kollektiv der Adenokarzinompatienten ergab keine Korrelationen zu den klinisch-pathologischen Parametern (Tab. 10).

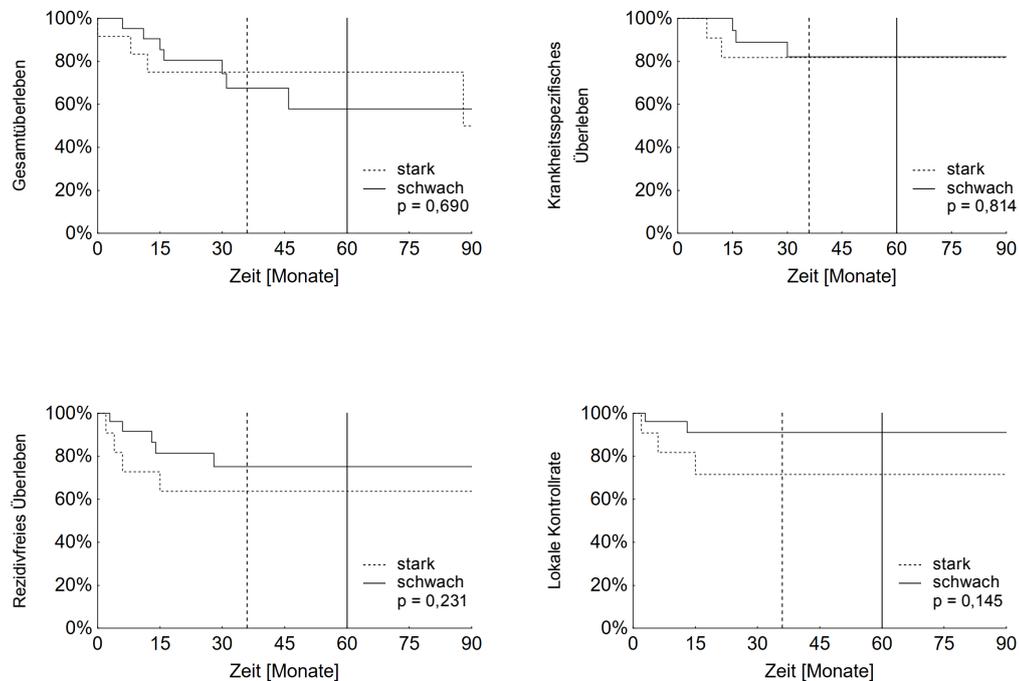


**Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.2.3.3 CD44

Der größte Unterschied des Kurvenverlaufs zeigte sich bei der Betrachtung der lokalen Kontrollrate. Zu beobachten war eine niedrigere lokale 5-Jahres-Kontrollrate von 71,6 % bei starker CD44-Expression im Vergleich zur schwachen CD44-Expression mit einer lokalen 5-Jahres-Kontrollrate von 91,1 % (Abb. 18, Tab. 9). Für das Gesamtüberleben stellte sich der Verlauf der Kurven umgekehrt dar. Letztendlich erwies sich keiner der Unterschiede als signifikant. Bezüglich der klinischen Parameter korrelierte die Expression von CD44 signifikant mit dem UICC-Stadium ( $p = 0,002$ , Chi-Quadrat-Test). Eine starke CD44-Expression lag im Stadium III-IV vor, nicht aber im Stadium I-II. Außerdem fanden sich signifikante Korrelationen von CD44 mit der N-Kategorie ( $p = 0,023$ , Chi-Quadrat-Test), T-Kategorie ( $p = 0,006$ , Chi-Quadrat-Test) und der Lokalisation ( $p = 0,050$ , Chi-Quadrat-Test) (Tab. 10). Mittels einer *Odds Ratio* wurde das Risiko der einzelnen Parameter und somit der genaue Zusammenhang berechnet. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von CD44 mit tumorpositiven Lymphknoten ( $p = 0,029$ ) und hohem (T3-4) Tumorstadium ( $p = 0,011$ ) korrelierte. Das Risiko für das Auftreten

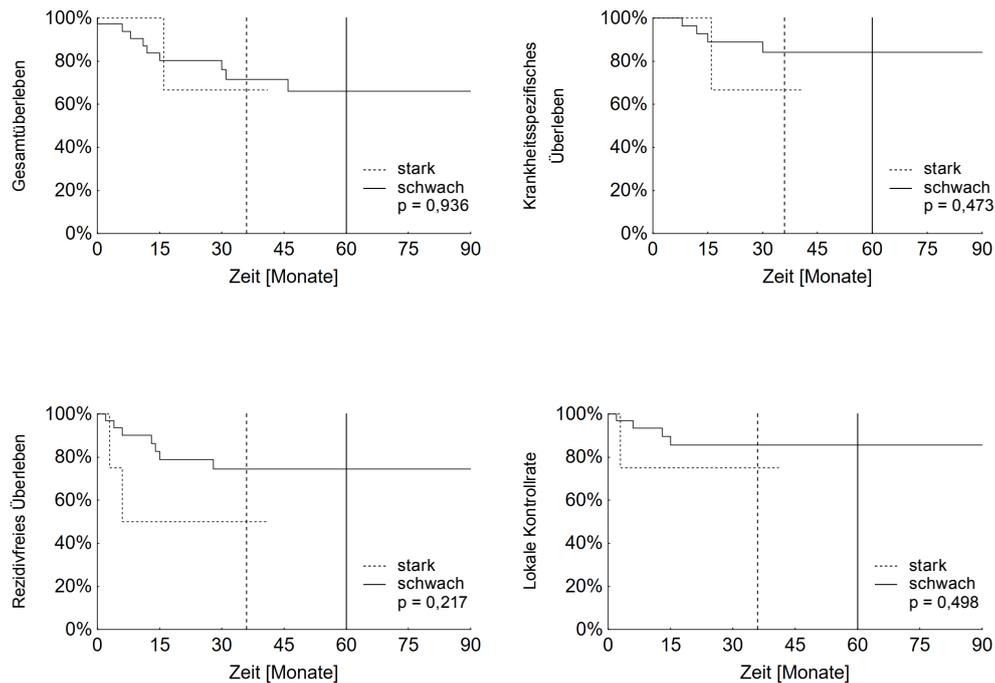
eines Adenokarzinoms in der *Glandula parotidea* war im Vergleich zur Lokalisation in der *Glandula submandibularis* bei starker CD44-Expression erhöht, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen ( $p = 0,078$ , *Odds Ratio*).



**Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von CD44.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.2.3.4 Nanog

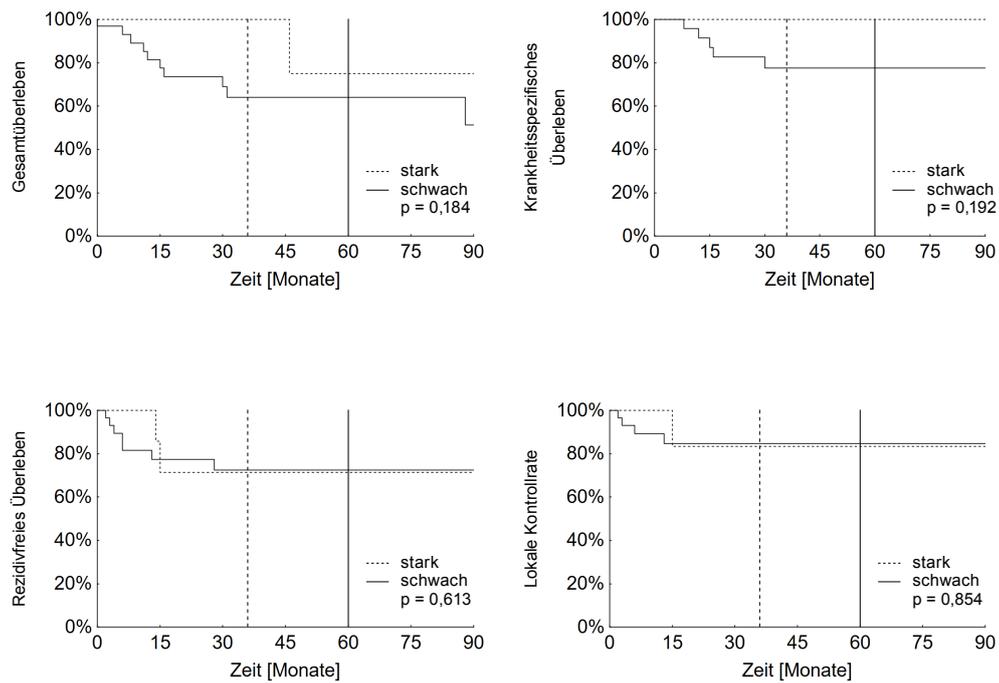
Die Kaplan-Meier-Kurven weisen auf geringere Überlebenszeiten bei starker Nanog-Expression hin (Abb. 19, Tab. 9). Jedoch war der Unterschied für keine der betrachteten Überlebenszeiten statistisch signifikant. Auch lag kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Nanog-Expression und den klinisch-pathologischen Parametern vor (Tab. 10).



**Abbildung 19: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von Nanog.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.2.3.5 SOX2

Es wurde bei starker Expression des Markers SOX2 ein höheres 5-Jahres-Gesamtüberleben (75 %) und ein höheres krankheitsspezifisches 5-Jahres-Überleben (100 %) im Gegensatz zur schwachen Expression mit einem 5-Jahres-Gesamtüberleben von 64,1 % und einem krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überleben von 77,6 % beobachtet (Abb. 20, Tab. 9). Diese Vergleiche der Überlebenszeiten, in Abhängigkeit von der SOX2-Expression in der Gruppe der Adenokarzinome, ergaben keine signifikanten Unterschiede. Keine Tumorprobe mit einer perineuralen Infiltration zeigte einen Expressions-Grad „stark“ für SOX2. Diese Verteilung und die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests deuteten darauf hin, dass eine SOX2-Überexpression mit dem Ausbleiben einer perineuralen Infiltration korrelierte ( $p = 0,020$ ) (Tab. 10).



**Abbildung 20: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 40 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

**Tabelle 9: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die immunhistochemischen Färbungen für 40 Patienten mit einem Adenokarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert									
<b>ALDH1</b>													
stark	4	100,0	100,0	0,159	100,0	100,0	0,254	100,0	100,0	0,165	100,0	100,0	0,326
schwach	36	67,1	61,0		79,4	79,4		67,7	67,7		82,4	82,4	
<b>BMI-1</b>													
stark	21	87,4	77,7	0,051	87,4	87,4	0,400	72,7	72,7	0,972	84,0	84,0	0,841
schwach	19	54,1	54,1		77,4	77,4		72,0	72,0		84,8	84,8	
<b>CD44</b>													
stark	12	75,0	75,0	0,690	81,8	81,8	0,814	63,6	63,6	0,231	71,6	71,6	0,145
schwach	28	67,5	57,8		82,1	82,1		75,1	75,1		91,1	91,1	
<b>Nanog</b>													
stark	4	66,7		0,936	66,7		0,473	50,0		0,217	75,0		0,498
schwach	36	71,6	66,1		84,2	84,2		74,5	74,5		85,5	85,5	
<b>SOX2</b>													
stark	7	100,0	75,0	0,184	100,0	100,0	0,192	71,4	71,4	0,613	83,3	83,3	0,854
schwach	33	64,1	64,1		77,6	77,6		72,5	72,5		84,8	84,8	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*

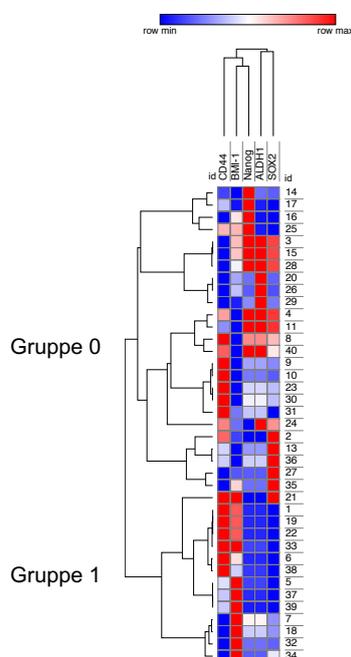
**Tabelle 10: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 40 Adenokarzinomen**

	ALDH1			BMI-1			CD44			Nanog			SOX2		
	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert
<b>Geschlecht</b>															
weiblich	9	2	0,288	5	6	0,873	9	2	0,315	10	1	0,906	8	3	0,479
männlich	27	2		14	15		19	10		26	3		24	5	
<b>Alter</b>															
< 60	14	3	0,166	7	10	0,491	11	6	0,530	16	1	0,455	12	5	0,201
≥ 60	22	1		12	11		17	6		20	3		20	3	
<b>Lokalisation</b>															
Parotis	25	3	0,818	14	14	0,629	17	11	<b>0,050</b>	24	4	0,168	23	5	0,605
Submandibularis	11	1		5	7		11	1		12	0		9	3	
<b>Grading</b>															
G1-2	25	4	0,194	12	17	0,208	22	7	0,189	26	3	0,906	21	8	0,051
G3	11	0		7	4		6	5		10	1		11	0	
<b>Grading</b>															
G1	4	4	<b>&lt; 0,001</b>	5	3	0,342	7	1	0,227	8	0	0,292	6	2	0,693
G2-3	32	0		14	18		21	11		28	4		26	6	
<b>pT-Kategorie</b>															
T1-T2	17	3	0,292	16	4	0,288	18	2	<b>0,006</b>	19	1	0,292	17	3	0,429
T3-T4	19	1		13	7		10	10		17	3		15	5	
<b>pN-Kategorie</b>															
negativ	18	3	0,342	12	9	0,199	18	3	<b>0,023</b>	20	1	0,246	18	3	0,342
positiv	18	1		7	12		10	9		16	3		14	5	
<b>Perineurale Infiltration</b>															
Pn0	22	4	0,122	13	13	0,666	18	8	0,885	25	1	0,077	18	8	<b>0,020</b>
Pn1	14	0		6	8		10	4		11	3		14	0	
<b>UICC-Stadium</b>															
I-II	11	3	0,077	8	6	0,370	14	0	<b>0,002</b>	13	1	0,658	13	1	0,136
III-IV	25	1		11	15		14	12		23	3		19	7	

G, Grading; N, *nodal status*; Pn, perineurale Infiltration; T, *tumor size*; UICC, International Union Against Cancer; Signifikanzen fett gedruckt

### 3.2.3.6 Heatmap

Abbildung 21 stellt die Gruppierung aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionen der einzelnen Markerproteine für das Adenokarzinomkollektiv dar. Es ergab sich eine Einteilung in zwei Gruppen. Die rechte Spalte gibt die von 1 bis 39 durchnummerierten Patienten an. Ein rotes Feld spricht für eine starke Färbung des zugehörigen Markers, ein blaues Feld für eine schwache Färbung. In der Gruppe 1 finden sich vorwiegend Tumorproben, welche BMI-1 und CD44 stark und Nanog, ALDH1 und SOX2 schwach exprimierten. Die zwei Gruppen zeigten keine Korrelationen zu den Überlebenszeiten (Tab. 11). Jedoch erwiesen sich die Gruppen als signifikant mit dem Grading assoziiert ( $p = 0,029$ , Chi-Quadrat-Test) (Tab. 12). Anhand der Risikoberechnung wurde ermittelt, dass die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines G1-Tumors in Gruppe 0 neunfach höher war als für die Gruppe 1.



**Abbildung 21: Clusteranalyse bezogen auf die Expression von CD44, BMI-1, Nanog, ALDH1 und SOX2.** Es werden die Gruppierungen aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionen der einzelnen Marker von Insgesamt 39 Patienten mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse abgebildet. Die entstandene *Heatmap* wurde mit der Software *Cluster 3.0* erstellt. Hierfür wurden die Patienten in der rechten Spalte von 1 bis 39 durchnummeriert. Ein blaues Feld spricht für eine schwache Färbung des zugehörigen Markers und ein rotes Feld für eine starke Färbung. Es ergab sich eine Gruppierung in zwei Gruppen. In der Gruppe 1 finden sich vorwiegend Tumorproben, welche BMI-1 und CD44 stark und Nanog, ALDH1 und SOX2 schwach exprimierten.

**Tabelle 11: Daten der Kaplan-Meier-Analyse anhand der Clusterexpression für 39 Patienten mit einem Adenokarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert									
Gruppe 0	25	64,9	64,9	0,329	80,8	80,8	0,980	70,5	70,5	0,545	85,2	85,2	0,880
Gruppe 1	14	80,8	69,3		82,9	82,9		72,7	72,7		83,1	83,1	

**Tabelle 12: Assoziation der Clusterexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 39 Patienten mit einem Adenokarzinom**

	Gruppe 0	Gruppe 1	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	7	3	0,652
männlich	18	11	
<b>Alter</b>			
< 60	10	7	0,546
≥ 60	15	7	
<b>N-Kategorie</b>			
negativ	14	6	0,431
positiv	11	8	
<b>Grading</b>			
G1/2	18	10	0,970
G3	7	4	
<b>Grading</b>			
G1	7	0	<b>0,029</b>
G2/3	18	14	
<b>Pn</b>			
Pn0	18	8	0,345
Pn1	7	6	
<b>T-Kategorie</b>			
T1-T2	13	7	0,905
T3-T4	12	7	
<b>UICC-Stadium</b>			
I-II	10	4	0,475
III-IV	15	10	
<b>Lokalisation</b>			
Parotis	19	8	0,221
Submandibularis	6	6	

G, Grading; N, *nodal status*; Pn, perineurale Infiltration; T, *tumor size*; UICC, International Union Against Cancer; Signifikanzen fett gedruckt

### 3.3 Plattenepithelkarzinome

#### 3.3.1 Daten zur Demographie und Erkrankung

Insgesamt wurden 31 Patienten mit der Manifestation eines PECA der Speicheldrüsen während der untersuchten Zeitspanne von 2003 bis 2015 in der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen behandelt (Tab. 13). Das Kollektiv bestand aus 61,3 % (n = 19) männlichen Patienten und 38,7 % (n = 12) weiblichen Patienten. Zum Diagnosezeitpunkt lag das durchschnittliche Alter bei  $77,0 \pm 11,0$  Jahren (44-92 Jahre). Der Nachbeobachtungszeitraum betrug im Mittel  $25 \pm 23$  Monate (0-81 Monate). In 52,0 % (n = 16) der Fälle entwickelten die Patienten nach durchschnittlich  $19,0 \pm 22,0$  Monaten ein Rezidiv. Bei elf (35,5 %) Patienten lag ein Lokalrezidiv vor und bei fünf (16,0 %) Patienten eine Fernmetastase. Die Lokalisationen der Fernmetastasen waren Lunge, Knochen, Ösophagus und parapharyngeal.

Um zu ermitteln, welches PECA ein Primärtumor der Speicheldrüse war bzw. welches aus einer Hautmetastase entstand, wurden alle Tumore, denen ein Hauttumor vorausging, als Hautmetastase gewertet. Alle anderen zählten als Primärtumore. Es ergab sich ein Verhältnis von 58,0 % (n = 18) Primärtumore zu 42,0 % (n = 13) Hautmetastasen.

Unter diesen 31 Patienten mit PECA erfolgte bei zwei Patienten (6,0 %) ausschließlich die Resektion des Tumors, bei elf Patienten (35,0 %) eine Tumorsektion und eine Neck Dissection, bei zwei Patienten (6,0 %) eine Tumorsektion und eine adjuvante Bestrahlung sowie bei 16 Patienten (52,0 %) eine Tumorsektion, eine Neck Dissection und eine adjuvante Bestrahlung. Die alleinige Tumorsektion war bei einem Patienten indiziert und bei einem weiteren Patienten war aufgrund vorausgegangener Radiotherapie eine adjuvante Radiotherapie technisch nicht möglich. Von den elf Patienten, welche eine Neck Dissection und eine Tumorsektion erhielten, konnte bei einem Patienten außerplanmäßig keine adjuvante Bestrahlung stattfinden, da er noch im Krankenhaus an einer Lungenarterienembolie verstarb. Sechs Patienten lehnten eine adjuvante Therapie ab und bei zwei Patienten konnte der Grund für eine nicht durchgeführte adjuvante Radiotherapie aus den Akten nicht ermittelt werden.

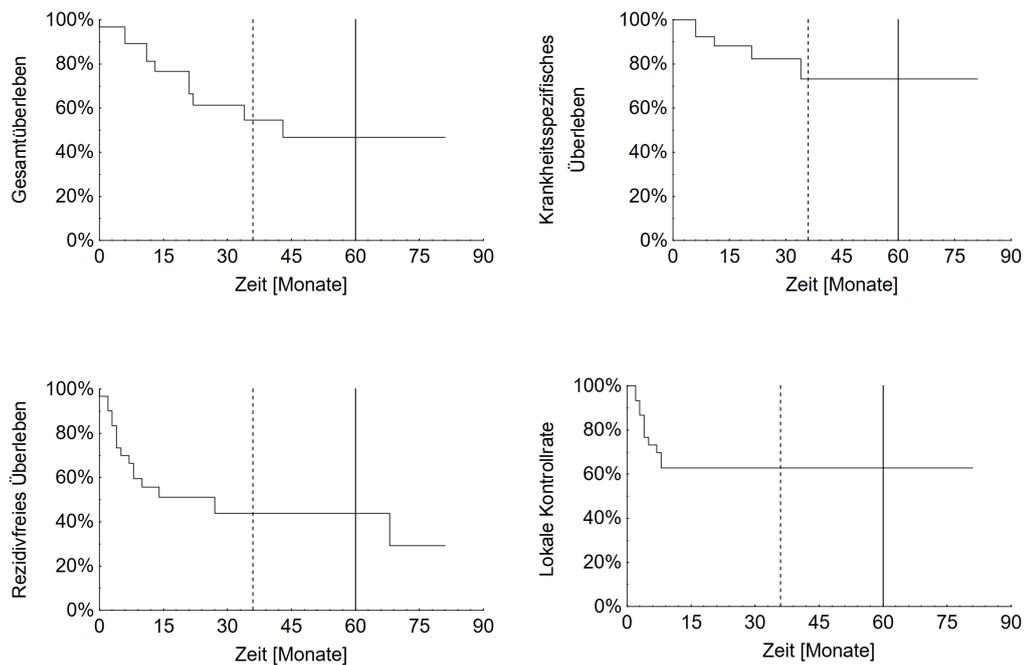
**Tabelle 13: Klinisch-pathologische Parameter des PECA-Kollektivs**

	n	%
<b>Geschlecht</b>		
männlich	19	61,3
weiblich	12	38,7
<b>Lokalisation</b>		
Parotis	27	87,1
Submandibularis	4	12,9
<b>Hautmetastase</b>		
Ja	13	42
Nein	18	58
<b>Histologisches Grading</b>		
G1	2	6
G2	26	84
G3	3	10
<b>R-Status</b>		
R0	20	65
R1	10	32
Rx	1	3
<b>Therapie</b>		
Tumorresektion	2 <sup>a</sup>	6
Tumorresektion + ND	11 <sup>b</sup>	35
Tumorresektion + RT	2	6
Tumorresektion + ND + RT	16	52
<b>Rezidiv</b>	16	51,5

ND, Neck Dissection; n, Fallzahl; RT, Radiotherapie; pn, perineurale Infiltration; R, Resektionsstatus; a: 1x keine Indikation für Neck Dissection + Radiotherapie (RT), 1x Z.n. Bestrahlung (Technisch nicht möglich); b: 1x keine Indikation für RT, 1x noch im Krankenhaus an Lungenarterienembolie verstorben, 1x wegen schlechtem Allgemeinzustand RT nicht durchführbar, 6x RT abgelehnt, 2x Indikation für RT (Grund des Ausbleibens unklar)

### 3.3.2 Überlebenszeiten

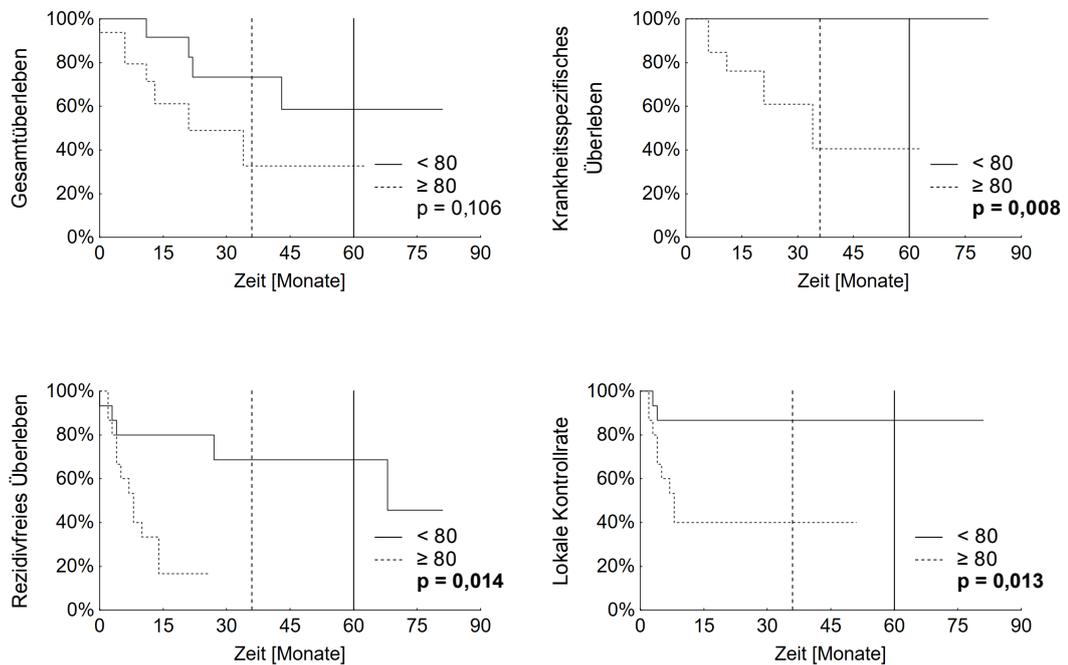
Für die Patienten, bei denen ein PECA der Speicheldrüse diagnostiziert wurde, errechnete sich ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 46,8 % und ein krankheitsspezifisches 5-Jahres-Überleben von 73,1 %. Das rezidivfreie 5-Jahres-Intervall lag bei 43,8 % und die lokale 5-Jahres-Kontrollrate bei 62,7 % (Tab. 14, Abb. 22).



**Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse des Kollektivs der Plattenepithelkarzinome.** Es wurden mittels der Kaplan-Meier-Analyse das Gesamtüberleben, das krankheitsspezifische Überleben, das rezidivfreie Überleben und die lokale Kontrollrate von 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse berechnet.

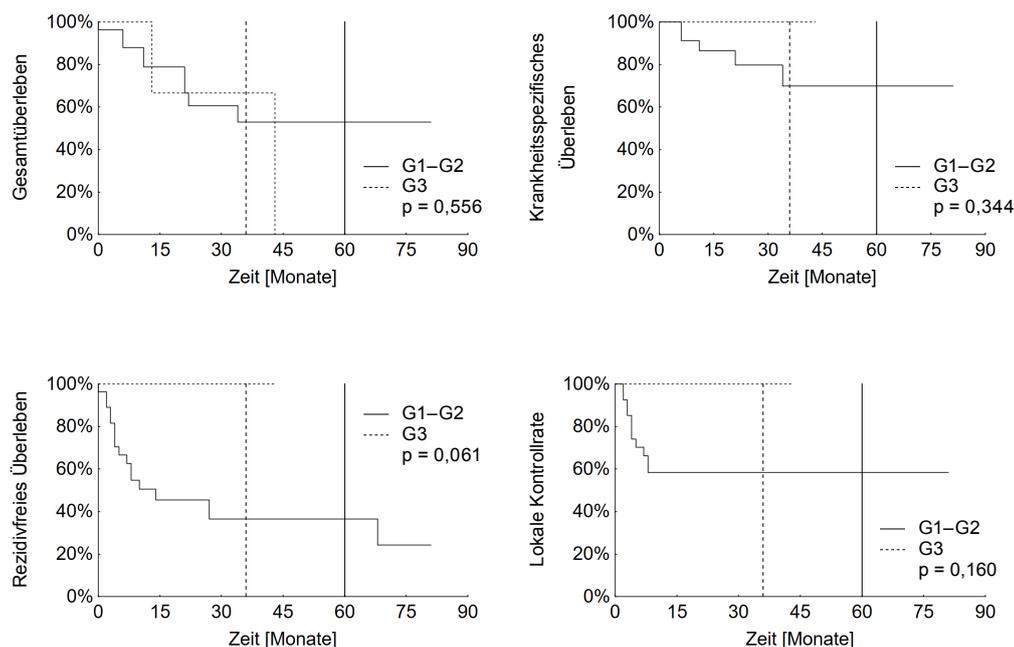
Die Betrachtung des Geschlechts und der Tumorlokalisierung mittels der Kaplan-Meier-Analyse erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Tab. 14).

Die Überlebensraten korrelierten mit dem Patientenalter, wobei ein Vergleich der Gruppen der < 80-Jährigen und > 80-Jährigen erfolgte. Patienten > 80 Jahre zeigten ein geringeres krankheitsspezifisches Überleben ( $p = 0,008$ , Log-Rank-Test), ein geringeres rezidivfreies Überleben ( $p = 0,014$ , Log-Rank-Test) und eine niedrigere lokale Kontrollrate ( $p = 0,013$ , Log-Rank-Test) (Tab. 14, Abb. 23).



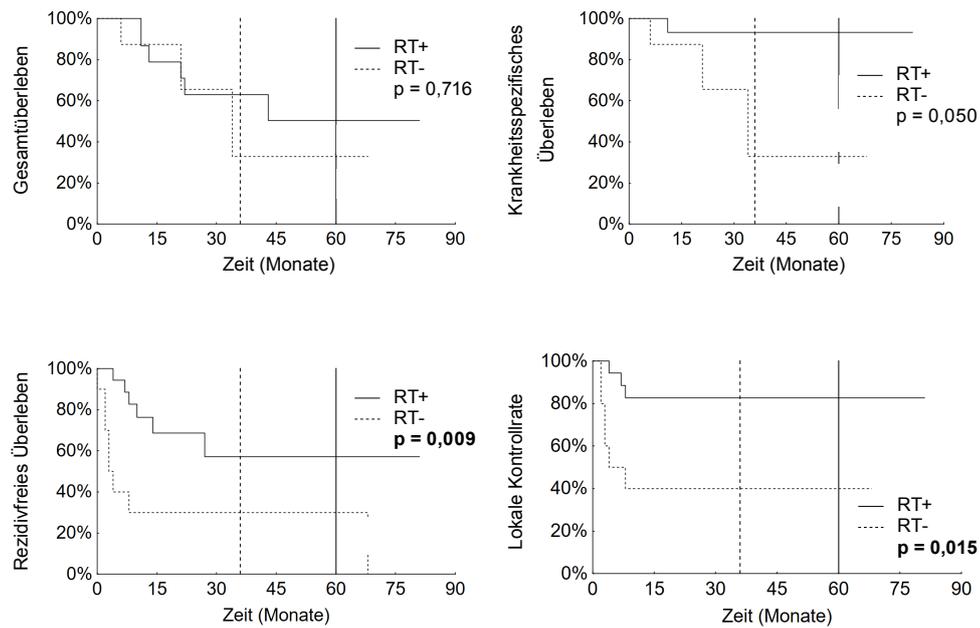
**Abbildung 23: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom Patientenalter.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des krankheitsspezifischen Überlebens, des rezidivfreien Überlebens und der lokalen Kontrollrate. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Die Abbildung 24 zeigt geringere Überlebenszeiten für Low-grade PECA, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.



**Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit vom histologischen Grading des Tumors.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

Um den Einfluss der adjuvanten Radiotherapie zu analysieren, wurden Patienten, die eine Radiotherapie erhielten ( $n = 18$ ), mit Patienten verglichen, bei denen trotz Indikation keine Radiotherapie durchgeführt wurde ( $n = 10$ ). Es ließ sich ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen im Verlauf des krankheitsspezifischen Überlebens ( $p = 0,050$ , Log-Rank-Test) und der lokalen Kontrollrate ( $p = 0,015$ , Log-Rank-Test) errechnen (Abb. 25). Den stärksten positiven Einfluss hatte eine adjuvante Radiotherapie auf das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben ( $p = 0,009$ , Log-Rank-Test). So betrug das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben mit Radiotherapie 57,2 % und ohne Radiotherapie 30,0 % (Tab. 14).



**Abbildung 25: Kaplan-Meier-Analyse in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie.** Es wurden die Überlebenszeiten von insgesamt 28 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in der Speicheldrüse mit einer Indikation für eine adjuvante Radiotherapie, die diese erhielten oder nicht erhielten, mittels des Log-Rank-Tests verglichen. Statistisch signifikante Resultate sind fett gedruckt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des krankheitsspezifischen Überlebens, des rezidivfreien Überlebens und der lokalen Kontrollrate.

**Tabelle 14: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
Gesamt	31	54,5	46,8		73,1	73,1		43,8	43,8		62,7	62,7	
Geschlecht													
weiblich	12	66,3	66,3	0,356	90,9	90,9	0,353	29,2	29,2	0,844	66,7	66,7	0,743
männlich	19	48,5	36,4		63,8	63,8		46,6	46,6		59,8	59,8	
Alter													
< 80	15	73,3	58,7	0,106	100,0	100,0	<b>0,008</b>	68,6	68,6	<b>0,014</b>	86,7	86,7	<b>0,013</b>
≥ 80	16	32,6	32,6		40,6	40,6					40,0	40,0	
Lokalisation													
Parotis	27	48,0	36,0	0,239	69,1	69,1	0,975	51,0	51,0	0,202	64,8	64,8	0,493
Submandibularis	4	75,0	75,0		75,0	75,0		25,0	25,0		50,0	50,0	
Grading													
G1-2	28	53,0	53,0	0,556	69,9	69,9	0,344	36,4	36,4	0,061	58,5	58,5	0,160
G3	3	66,7	00,0		100,0			100,0			100,0		
Radiotherapie (Indikation vorhanden)													
RT +	18	63,0	50,4	0,716	93,3	93,3	<b>0,050</b>	57,2	57,2	<b>0,009</b>	82,6	82,6	<b>0,015</b>
RT -	10	32,8	32,8		32,8	32,8		30,0	30,0		40,0	40,0	

G, Grading; RT, Radiotherapie; DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

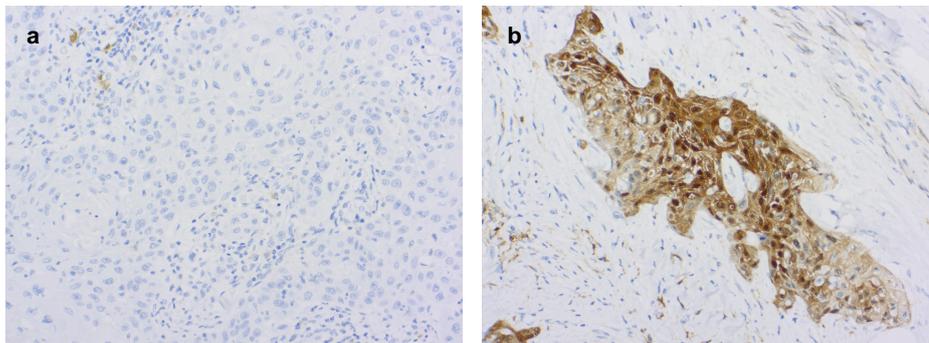
### 3.3.3 Immunhistochemische Auswertung

Die Expression der zu untersuchenden Marker wurde in den Biopsien der PECA immunhistochemisch dargestellt und in die Kategorien starke Expression und schwache Expression eingeteilt (Kapitel 2.3.2). Tabelle 15 zeigt die Verteilung der Tumorproben auf diese Kategorien für die einzelnen Marker.

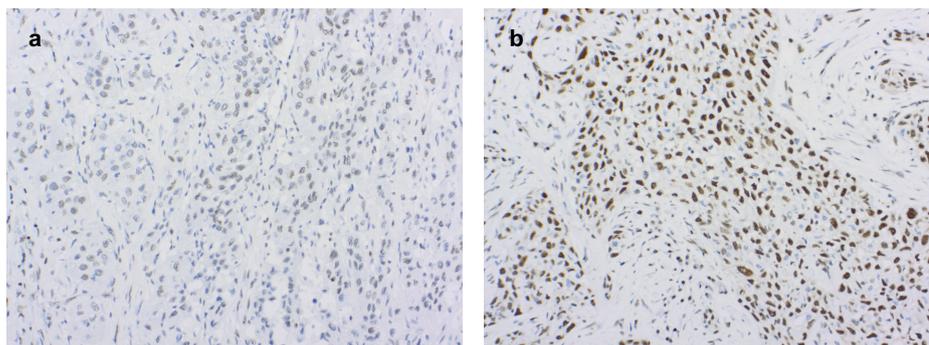
**Tabelle 15: Immunhistochemische Färbung im Kollektiv der PECA**

	schwach		stark	
	n	%	n	%
ALDH1	25	80,6	6	19,4
BMI-1	20	64,5	11	35,5
CD133	0	0	0	0
CD44	15	48,4	16	51,6
Nanog	0	0	0	0
Oct-3/4	0	0	0	0
SOX2	16	51,6	15	48,4
Vimentin	17	54,8	14	45,2

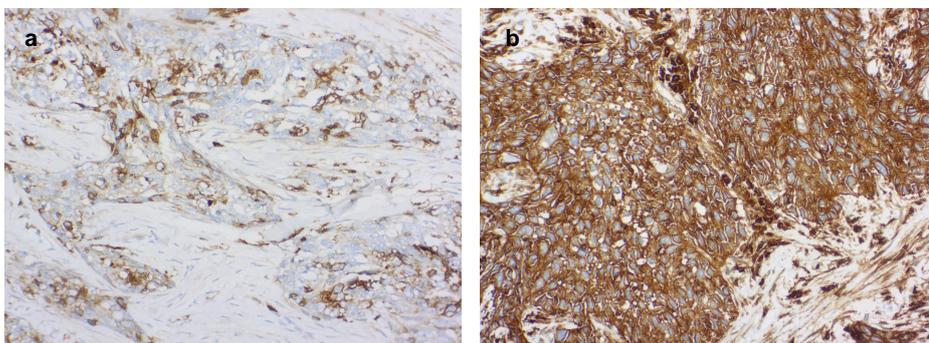
Die Abbildungen 26-30 zeigen beispielhaft die immunhistochemischen Färbungen der untersuchten Marker. Das Färbeverhalten der Tumorzellen der PECA war mit dem der Adenokarzinome zu vergleichen. Die Antikörper gegen BMI-1 und SOX2 färbten die Tumorzellen nukleär, der Antikörper gegen CD44 membranös und die Antikörper gegen ALDH1 und Vimentin zytoplasmatisch.



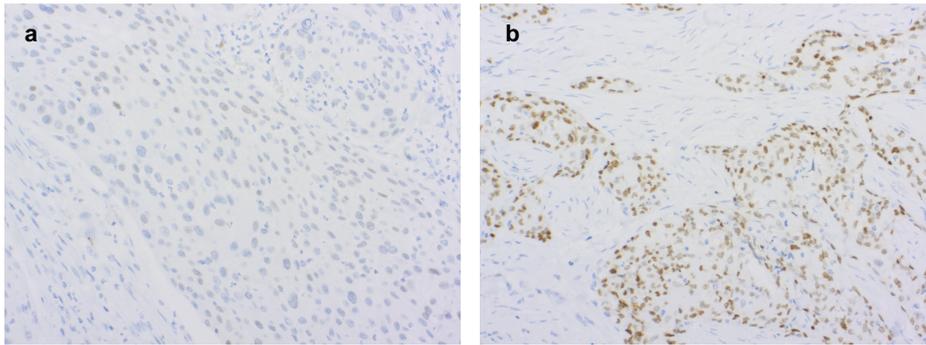
**Abbildung 26: ALDH1-Expression** (x200) im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome, a) mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) mit starker immunhistochemischer Färbung



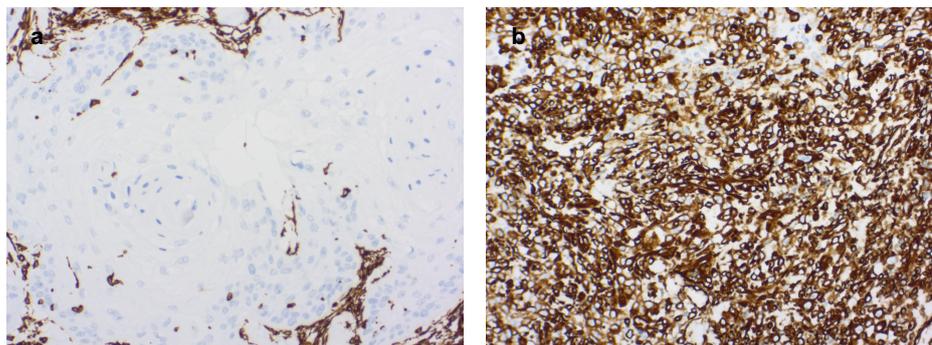
**Abbildung 27: BMI-1-Expression** (x200) im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome, a) mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) mit starker immunhistochemischer Färbung



**Abbildung 28: CD44-Expression** (x200) im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome, a) mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) mit starker immunhistochemischer Färbung



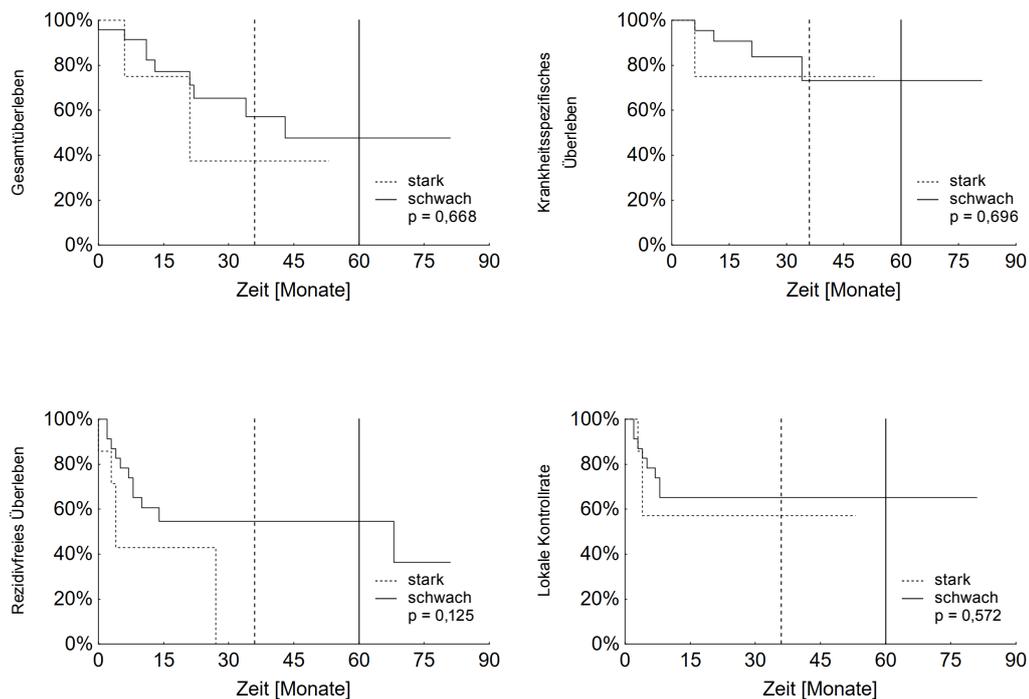
**Abbildung 29: SOX2-Expression** (x200) im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome, a) mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) mit starker immunhistochemischer Färbung



**Abbildung 30: Vimentin-Expression** (x200) im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome, a) mit schwacher immunhistochemischer Färbung und b) mit starker immunhistochemischer Färbung

### 3.3.3.1 ALDH1

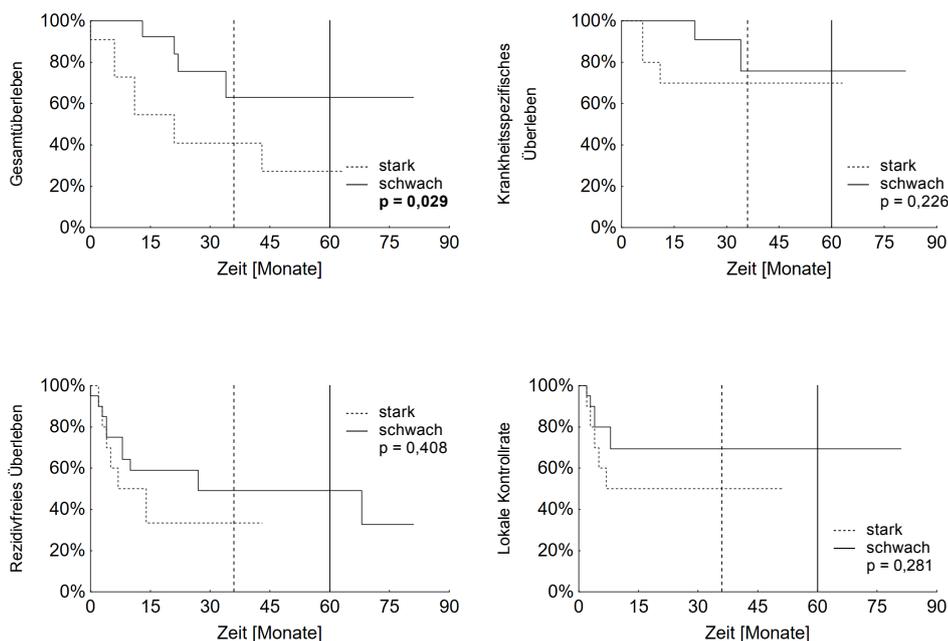
Der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven deuten an, dass Patienten mit einer starken ALDH1-Expression niedrigere Überlebenszeiten aufwiesen (Abb. 31). Dieser Unterschied erreicht jedoch in keinem der Fälle statistische Signifikanz. Statistisch signifikant war jedoch die Korrelation der ALDH1-Expression mit dem Ursprung des Tumors (Primärtumor oder Hautmetastase,  $p = 0,011$ , Chi-Quadrat-Test) (Tab. 17). Die Verteilung lässt vermuten, dass eine ALDH1-Überexpression wahrscheinlicher mit dem Vorliegen eines Primärtumors einherging. Für die weiteren klinisch-pathologischen Parameter konnten keine Korrelationen mit der ALDH1-Expression festgestellt werden.



**Abbildung 31: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von ALDH1.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.3.3.2 BMI-1

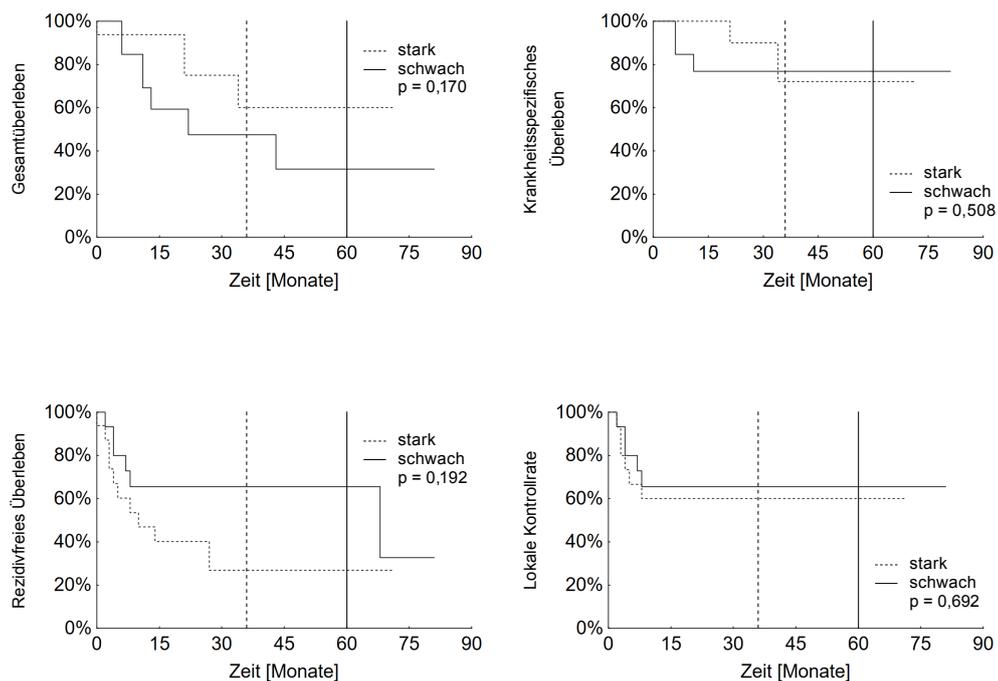
In der Kaplan-Meier-Analyse zeigten sich bei starker BMI-1-Expression durchweg niedrigere Überlebenszeiten (Abb. 32). Beim Vergleichen der Kurven erwies sich eine BMI-1-Überexpression als signifikant assoziiert mit einem niedrigeren Gesamtüberleben der Patienten ( $p = 0,029$ , Log-Rank-Test). Die Betrachtung mittels des Chi-Quadrat-Tests erbrachte keine Zusammenhänge für die BMI-1-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern (Tab. 17).



**Abbildung 32: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.3.3.3 CD44

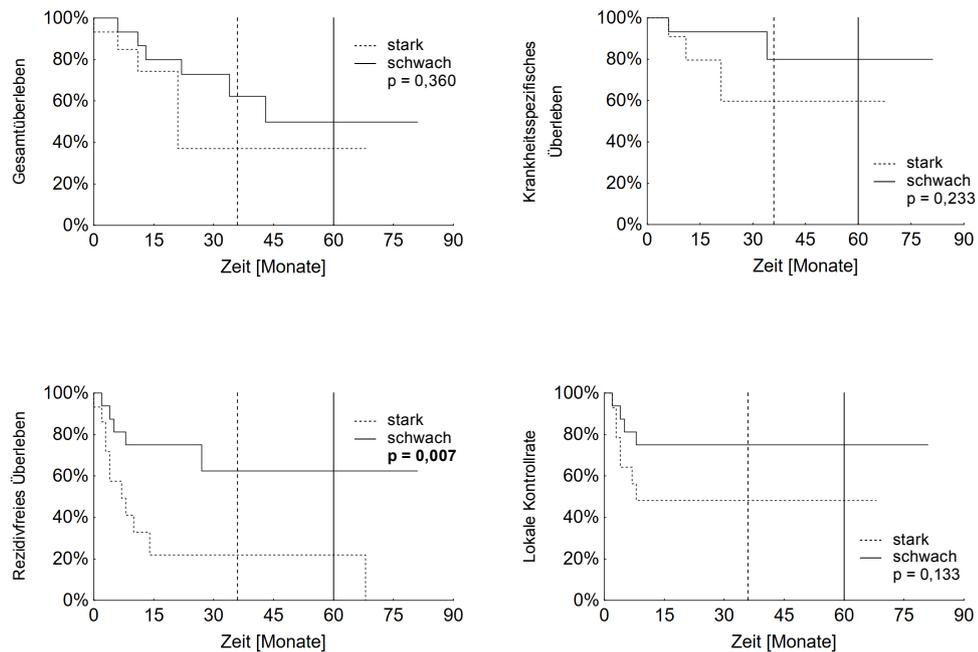
Anhand der Kaplan-Meier-Kurven scheint die CD44-Expression den stärksten Effekt auf das rezidivfreie Überleben zu haben (Abb. 33). Bei CD44-Überexpression berechnete sich ein rezidivfreies 5-Jahres-Überleben von 26,8 % im Vergleich zu einem rezidivfreien 5-Jahres-Überleben bei einem Expressions-Grad „schwach“ von 65,5 %. Für das Gesamtüberleben der Patienten zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis von niedrigem und hohem Gesamtüberleben in Bezug auf eine starke und schwache CD44-Expression. Die Kaplan-Meier-Analyse erbrachte jedoch für die CD44-Expression keine signifikanten Zusammenhänge. Die CD44-Expression korrelierte mit dem Ursprung des Tumors (Hautmetastase oder Primärtumor,  $p = 0,048$ , Chi-Quadrat-Test) (Tab. 17). Das Resultat der *Odd Ratio*, deutete darauf hin, dass eine niedrige CD44-Expression mit einem erhöhten Risiko für das Vorliegen einer Hautmetastase assoziiert war ( $p = 0,054$ ). Die anderen klinisch-pathologischen Parameter waren nicht signifikant mit der CD44-Expression korreliert.



**Abbildung 33: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von CD44.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.3.3.4 SOX2

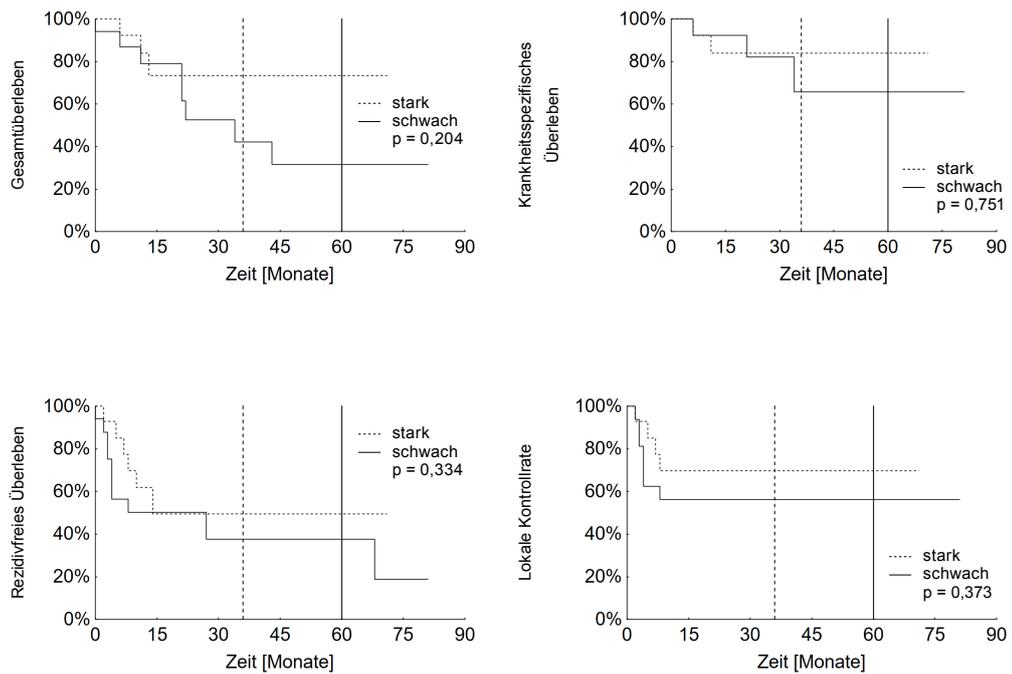
Abbildung 34 deutet daraufhin, dass eine SOX2-Überexpression mit niedrigeren Überlebensraten einhergeht. So erwies sich SOX2, mit einem rezidivfreien 5-Jahres-Überleben von 21,9 % bei starker Expression bzw. von 62,5 % bei schwacher Expression, als signifikanter negativer prognostischer Faktor ( $p = 0,007$ , Log-Rank-Test). Im Gegensatz dazu konnte im Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern keine prognostische Bedeutung für die SOX2-Expression evaluiert werden (Tab. 17).



**Abbildung 34: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des rezidivfreien Überlebens. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.3.3.5 Vimentin

Bei der Betrachtung von Vimentin fand sich eine Diskrimination der Überlebenszeiten ohne statistische Signifikanz (Abb. 35). Eine starke Vimentin-Expression ging mit hohen Überlebensraten einher, während eine schwache Expression mit niedrigen Überlebensraten assoziiert war. Ein signifikanter Zusammenhang der Vimentin-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern zeigte sich nicht (Tab. 17).



**Abbildung 35: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von Vimentin.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen. Insgesamt wurden 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der univariaten Überlebensanalyse der immunhistochemischen Färbungen der Tumorproben für die Patienten mit einem PECA zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 16: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die immunhistochemischen Färbungen für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
<b>ALDH1</b>													
stark	7	37,5		0,668	75,0		0,696	00,0	00,0	0,125	57,1		0,572
schwach	24	57,2	47,6		73,2	73,2		54,5	54,5		65,2	65,2	
<b>BMI-1</b>													
stark	11	40,9	27,3	<b>0,029</b>	70,0	70,0	0,226	33,3		0,408	50,0		0,281
schwach	20	62,9	62,9		75,8	75,8		49,1	49,1		69,3	69,3	
<b>CD44</b>													
stark	16	60,0	60,0	0,170	72,0	72,0	0,508	26,8	26,8	0,192	60,0	60,0	0,692
schwach	15	47,5	31,7		76,9	76,9		65,5	65,5		65,5	65,5	
<b>SOX2</b>													
stark	15	37,1	37,1	0,360	59,7	59,7	0,233	21,9	21,9	<b>0,007</b>	48,2	48,2	0,133
schwach	16	62,3	49,9		80,0	80,0		62,5	62,5		75,0	75,0	
<b>Vimentin</b>													
stark	14	73,4	73,4	0,204	83,9	83,9	0,751	49,5	49,5	0,334	69,6	69,6	0,373
schwach	17	42,1	31,6		65,6	65,6		37,7	37,7		56,3	56,3	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

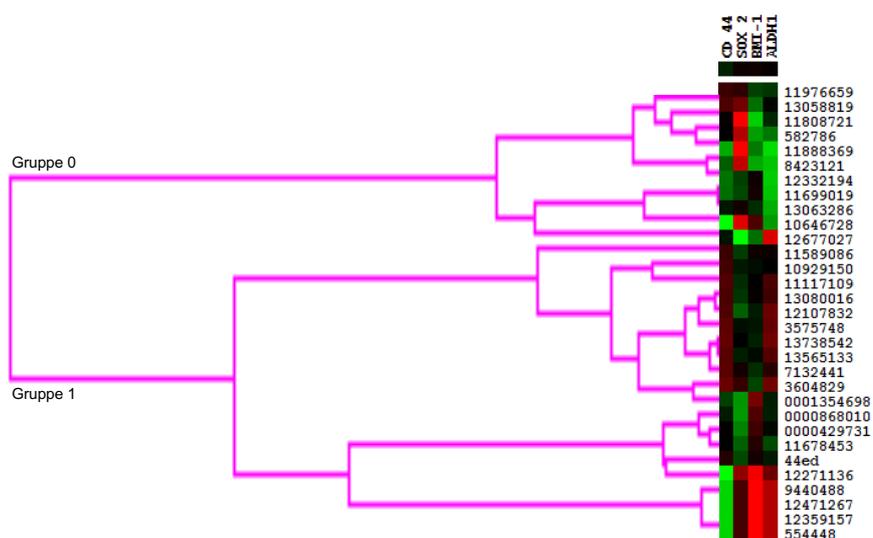
**Tabelle 17: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom**

	ALDH1			BMI-1			CD44			SOX2			Vimentin		
	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert	schwach	stark	p-Wert
<b>Geschlecht</b>															
weiblich	10	2	0,763	7	5	0,567	5	7	0,552	6	6	0,886	7	5	0,756
männlich	15	4		13	6		10	9		10	9		10	9	
<b>Alter</b>															
<80	12	3	0,930	11	4	0,320	8	7	0,594	10	5	0,104	10	5	0,200
≥80	13	3		9	7		7	9		6	10		7	9	
<b>Lokalisation</b>															
Parotis	21	6	0,294	18	9	0,516	13	14	0,945	13	14	0,316	15	12	0,835
Submandibularis	4	0		2	2		2	2		3	1		2	2	
<b>Grading</b>															
G1-2	22	6	0,372	18	10	0,935	13	15	0,505	15	15	0,078	16	12	0,431
G3	3	0		2	1		2	1		3	0		1	2	
<b>Grading</b>															
G1	2	0	0,474	1	1	0,657	2	0	0,131	1	1	0,962	0	2	0,107
G2-3	23	6		19	10		21	11		15	14		17	12	
<b>Hautmetastase</b>															
Nein	11	7	<b>0,011</b>	11	7	0,641	6	12	<b>0,048</b>	8	10	0,347	11	7	0,409
Ja	13	0		9	4		9	4		8	5		6	7	

G, Grading; Signifikanzen fett gedruckt

### 3.3.3.6 Heatmap

Abbildung 36 stellt die Gruppierung aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionen der einzelnen Markerproteine für das Kollektiv der PECA dar. Es ergab sich eine Einteilung in zwei Gruppen. Die rechte Spalte gibt die Patientennummern an. Ein rotes Feld entspricht einer starken Färbung des zugehörigen Markers, ein grünes Feld einer schwachen Färbung. Die beiden, durch die Clusteranalyse erstellten Gruppen, zeigten weder eine Korrelation mit den Überlebenszeiten noch eine Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern (Tab. 18, Tab. 19).



**Abbildung 36: Clusteranalyse bezogen auf die Expression von CD44, SOX2, BMI-1, ALDH1.** Es werden die Gruppierungen aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionen der einzelnen Marker von Insgesamt 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse abgebildet. Die entstandene *Heatmap* wurde mit der Software *Cluster 3.0* erstellt. Die rechte Spalte gibt die Patientennummern an. Ein grünes Feld spricht für eine schwache Färbung des zugehörigen Markers und ein rotes Feld für eine starke Färbung. Es ergab sich eine Gruppierung in zwei Gruppen.

**Tabelle 18: Daten der Kaplan-Meier-Analyse anhand der Clusterexpression für 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert									
Gruppe 0	10	31,5	31,5	0,206	70,0	70,0	0,372	33,8	33,8	0,136	55,5	55,5	0,699
Gruppe 1	21	61,7	51,4		76,3	76,3		49,5	49,5		66,0	66,0	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*

**Tabelle 19: Assoziation der Clusterexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 31 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom**

	Gruppe 0	Gruppe 1	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	5	7	0,373
männlich	5	14	
<b>Alter</b>			
< 80	3	12	0,157
≥ 80	7	9	
<b>Hautmetastase</b>			
Nein	7	11	0,353
Ja	3	10	
<b>Grading</b>			
G1/2	10	18	0,209
G3	0	3	
<b>Grading</b>			
G1	1	1	0,579
G2/3	9	20	
<b>Lokalisation</b>			
Parotis	9	18	0,739
Submandibularis	1	3	

G, Grading

### 3.4 Primäre Plattenepithelkarzinome

#### 3.4.1 Überlebenszeiten

Die Tabelle 20 zeigt die anhand der Kaplan-Meier-Analyse berechneten Überlebensraten für die klinisch-pathologischen Parameter im Kollektiv der primären PECA.

**Tabelle 20: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinischen-pathologischen Parameter für 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
Gesamt	18	51,7	51,7		61,9	61,9		37,1	37,1		53,4	53,4	
Geschlecht													
weiblich	8	70,0	70,0	0,234	87,5	87,5	0,161	31,3	31,3	0,961	62,5	62,5	0,432
männlich	10	30,0	30,0		33,3	33,3		40,0	40,0		40,0	40,0	
Alter													
< 80	7	80,0	80,0	0,086	100	100	<b>0,035</b>	64,3	64,3	0,067	85,7	85,7	<b>0,047</b>
≥ 80	11	28,4	28,4		31,3	31,3		30,0	30,0		30,0	30,0	
Lokalisation													
Parotis	14	29,7	29,7	0,299	40,0	40,0	0,595	51,9	51,9	0,306	51,9	51,9	0,815
Submandibularis	4	75,0	75,0		75,0	75,0		25,0	25,0		50,0	50,0	
Grading													
G1-2	17	49,6	49,6	0,451	61,5	61,5	0,604	32,1	32,1	0,197	48,1	48,1	0,317
G3	1												
Radiotherapie													
RT +	7	62,5	62,5	0,903	83,3	83,3	0,510	56,4	56,4	0,064	84,6	84,6	0,065
RT -	8	85,7	42,9		85,7	42,9		37,5	37,5		37,5	37,5	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

#### 3.4.2 Immunhistochemische Auswertung

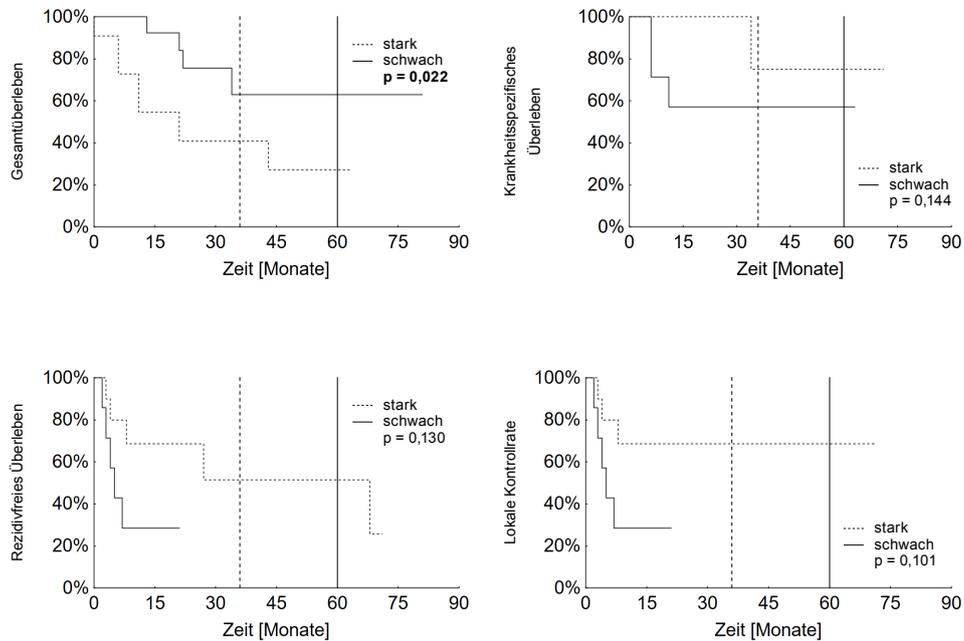
##### 3.4.2.1 ALDH1

Die Untersuchung auf einen Zusammenhang der ALDH1-Expression in primären PECA mit den Überlebenszeiten zeigte keine statistische Signifikanz (Tab. 21). Auch die klinisch-pathologischen Parameter ließen sich nicht mit dem Färbemuster von ALDH1 korrelieren (Tab. 22).

##### 3.4.2.2 BMI-1

Die Betrachtung der BMI-1-Expression ergab einen signifikanten Zusammenhang mit dem 5-Jahres-Gesamtüberleben ( $p = 0,022$ , Log-Rank-Test). So waren primäre PECA mit einem Expressions-Grad „stark“ von BMI-1 mit einem niedrigeren 5-Jahres-

Gesamtüberleben assoziiert (Tab. 21, Abb. 37). Es fanden sich keine Assoziationen der klinisch-pathologischen Parameter und der BMI-1-Expression (Tab. 22).



**Abbildung 37: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von BMI-1.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens. Insgesamt wurden 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

#### 3.4.2.3 CD44

Bei der Auswertung der CD44-Expression in primären PECA konnte weder eine Korrelation mit den Überlebensraten noch zu den klinisch-pathologischen Parametern evaluiert werden (Tab. 21, Tab. 22).

#### 3.4.2.4 SOX2

Die Expression von SOX2 der primären PECA zeigte keine signifikanten Zusammenhänge mit den Überlebenszeiten und klinisch-pathologischen Parametern (Tab. 21, Tab. 22).

### 3.4.2.5 Vimentin

Es wurden höhere 5-Jahres-Überlebenszeiten bei Patienten mit einem primären PECA beobachtet, bei denen eine starke Vimentin-Expression nachgewiesen wurde. Die Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen Patienten mit starker und schwacher Vimentin-Expression waren jedoch nicht signifikant (Tab. 21). Auch konnte kein signifikanter Zusammenhang der klinisch-pathologischen Parameter mit der Vimentin-Expression ermittelt werden (Tab. 22).

**Tabelle 21: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Tumorstammzellmarker-Expression für 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
ALDH1													
stark	6	33,3	33,3	0,576	66,7	66,7	0,820	00,0	00,0	0,343	50,0	50,0	0,654
schwach	12	56,3	56,3		61,4	61,4		54,5	54,5		54,5	54,5	
BMI-1													
stark	8	25,0	25,0	<b>0,022</b>	57,1	57,1	0,144	28,6	28,6	0,130	28,6	28,6	0,281
schwach	10	75,0	75,0		75,0	75,0		20,0	20,0		20,0	20,0	
CD44													
stark	11	58,4	58,4	0,340	75,0	75,0	0,083	33,3	33,3	0,926	50,0	50,0	0,931
schwach	7	50,0	50,0		50,0	50,0		53,6	53,6		53,6	53,6	
SOX2													
stark	10	30,0	30,0	0,142	66,7	66,7	0,578	41,7	41,7	0,311	41,7	41,7	0,360
schwach	8	65,6	65,6		65,6	65,6		41,7	41,7		62,5	62,5	
Vimentin													
stark	8	71,4	71,4	0,539	71,4	71,4	0,916	58,3	58,3	0,214	58,3	58,3	0,540
schwach	10	41,1	41,1		57,1	57,1		22,2	22,2		44,4	44,4	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

**Tabelle 22: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Daten von 18 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom**

	ALDH1			BMI-1			CD44			SOX2			Vimentin		
	schwach	stark	P-Wert	schwach	stark	P-Wert									
<b>Geschlecht</b>															
weiblich	5	3	0,737	3	5	0,168	3	5	0,914	3	5	0,596	6	2	0,138
männlich	7	3		7	3		4	6		5	5		4	6	
<b>Alter</b>															
< 80	4	3	0,494	5	2	0,280	2	5	0,474	3	4	0,914	4	3	0,914
≥ 80	8	3		5	6		5	6		5	6		6	5	
<b>Lokalisation</b>															
Parotis	9	5	0,689	8	6	0,800	5	9	0,605	5	9	0,163	8	6	0,800
Submandibularis	3	1		2	2		2	2		3	1		2	2	
<b>Grading</b>															
G1-2	11	6	0,467	9	8	0,357	7	10	0,412	7	10	0,250	10	7	0,250
G3	1	0		1	0		0	1		1	0		0	1	
<b>Grading</b>															
G1	1	0	0,467	0	1	0,250	1	0	0,197	1	0	0,250	0	1	0,250
G2-3	11	6		10	7		6	11		7	10		10	7	

G, Grading

### 3.5 Kutane in die *Glandula parotidea* metastasierte Plattenepithelkarzinome

#### 3.5.1 Überlebenszeiten

Die Berechnungen der Überlebenszeiten der Patienten mit einem kutanen, in die Parotis metastasierten PECA für die verschiedenen klinisch-pathologischen Parameter sind in Tabelle 23 dokumentiert.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Überlebensanalyse bezogen auf die klinischen-pathologischen Parameter für 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
Gesamt	13	51,9	34,6		79,1	79,1		46,9	46,9		71,4	71,4	
Geschlecht													
weiblich	4	50,0	50,0	0,805				50,0	50,0	0,890	75,0	75,0	0,914
männlich	9	58,3	38,9		83,3	83,3		53,3	53,3		77,8	77,8	
Alter													
< 80	8	33,3	33,3	0,670	100,0	100,0		75,0	75,0	0,106	87,5	87,5	0,274
≥ 80	5	33,3	33,3		50,0	50,0		00,0	00,0		60,0	60,0	
Grading													
G1-2	11	58,3	58,3	0,235	83,3	83,3		42,4	42,2	0,198	72,7	72,7	0,420
G3	2	50,0	00,0		100,0	00,0		100,0	00,0		100,0	00,0	
Radiotherapie													
RT +	11	64,6	46,1	0,408				59,4	59,4	<b>0,043</b>	80,0	80,0	0,281
RT -	2	00,0	00,0					00,0	00,0		00,0	00,0	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

#### 3.5.2 Immunhistochemische Auswertung

##### 3.5.2.1 ALDH1

Anhand der Kaplan-Meier-Analyse und des Chi-Quadrat-Tests konnte dargestellt werden, dass die Färbung von ALDH1 in metastasierten PECA weder mit den Überlebensraten noch mit den klinisch-pathologischen Parametern korrelierte (Tab. 24, Tab. 25).

##### 3.5.2.2 BMI-1

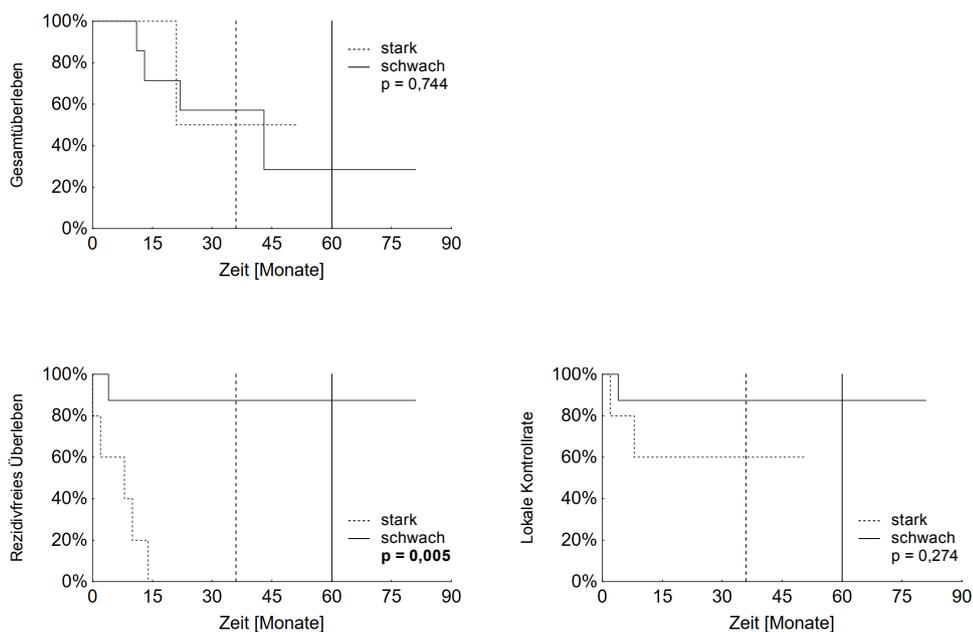
Die univariaten Analysen und die Berechnungen mittels des Chi-Quadrat-Tests dokumentierten keine Zusammenhänge für die BMI-1-Expression bei Patienten mit einem metastasierten PECA (Tab. 24, Tab.25).

### 3.5.2.3 CD44

Keine signifikanten Ergebnisse ergaben die Berechnungen für die CD44-Expression in dem Patientenkollektiv der metastasierten PECA (Tab. 24, Tab. 25).

### 3.5.2.4 SOX2

Die Expression des Antikörpers gegen SOX2 in kutanen, in die Glandula parotidea metastasierten PECA zeigte sich als signifikanter negativer prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben ( $p = 0,005$ , Log-Rank-Test). Entsprechend fand sich ein rezidivfreies 5-Jahres-Überleben von 0 % bei starker SOX2-Expression und von 87,5 % bei schwacher Färbung von SOX2 (Tab. 24, Abb. 38). Bei der Untersuchung der klinisch-pathologischen Parameter zeigte sich die Expression von SOX2 signifikant mit dem Patientenalter korreliert ( $p = 0,015$ , Chi-Quadrat-Test). Die Verteilung lässt vermuten, dass eine geringe SOX2-Expression mit einem niedrigeren Patientenalter ( $< 80$ ) und eine SOX2-Überexpression mit einem höheren Alter ( $\geq 80$ ) assoziiert war (Tab. 25).



**Abbildung 38: Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Expression von SOX2.** Zur Berechnung einer Diskrimination beider Kurven wurde der Log-Rank-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Resultate fett gedruckt sind. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des rezidivfreien Überlebens. Insgesamt wurden 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom der Speicheldrüse eingeschlossen.

### 3.5.2.5 Vimentin

Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Überlebenszeiten und der Vimentin-Expression in metastasierten PECA (Tab. 24). Jedoch ergab die Betrachtung der Vimentin-Expression im Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parameter mittels des Chi-Quadrat-Tests einen Unterschied im Hinblick auf das Patientenalter, welcher jedoch mit einem p-Wert von 0,053 knapp unter dem Signifikanzniveau lag. Die Verteilung lässt schlussfolgern, dass ein niedriges Patientenalter (< 80) mit einer geringeren Vimentin-Expression und ein hohes Patientenalter ( $\geq 80$ ) mit einer starken Expression assoziiert war (Tab. 25).

**Tabelle 24: Daten der Kaplan-Meier-Analyse bezogen auf die Tumorstammzellmarker-Expression für 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom**

	n	OS (%)			DSS (%)			RFS (%)			LCR (%)		
		3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert	3 Jahre	5 Jahre	p-Wert
<b>ALDH1</b>													
stark	1			1,000						0,150			0,585
schwach	12	56,3	37,5		85,7	85,7		54,7	54,7		75,0	75,0	
<b>BMI-1</b>													
stark	3	66,7	33,3	0,854	100,0		0,481	50,0	50,0	0,530	100,0		0,300
schwach	10	50,0	50,0		80,0	80,0		50,0	50,0		70,0	70,0	
<b>CD44</b>													
stark	5	66,7	66,7	0,454	66,7	00,0		20,0	20,0	0,088	80,0	80,0	0,923
schwach	8	51,4	25,7		100,0	100,0		75,0	75,0		75,0	75,0	
<b>SOX2</b>													
stark	5	50,0		0,744	50,0			00,0	00,0	<b>0,005</b>	60,0		0,274
schwach	8	57,1	28,6		100,0	100,0		87,5	87,5		87,5	87,5	
<b>Vimentin</b>													
stark	6	75,0	75,0	0,232	100,0			44,4	44,4	0,847	83,3	83,3	0,556
schwach	7	40,0	20,0		75,0	75,0		57,1	57,1		71,4	71,4	

DSS, *disease specific survival*; LCR, *local control rate*; n, Fallzahl; OS, *overall survival*; RFS, *recurrencefree survival*; Signifikanzen fett gedruckt

**Tabelle 25: Assoziation der Tumorstammzellmarker-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern von 13 Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom**

	ALDH1			BMI-1			CD44			SOX2			Vimentin		
	schwach	stark	P-Wert	schwach	stark	P-Wert									
<b>Geschlecht</b>															
weiblich	4	0	0,488	4	0	0,188	2	2	0,569	3	1	0,506	1	3	0,164
männlich	8	1		6	3		6	3		5	4		6	3	
<b>Alter</b>															
< 80	7	1	0,411	6	2	0,835	6	2	0,207	7	1	<b>0,015</b>	6	2	0,053
≥ 80	5	0		4	1		2	3		5	6		1	4	
<b>Grading</b>															
G1-2	10	1	0,657	9	2	0,326	6	5	0,224	5	5	0,224	6	5	0,906
G3	2	0		1	1		2	0		2	0		1	1	
<b>Grading</b>															
G1	1	0	0,764	1	0	0,569	1	0	0,411	0	1	0,188	0	1	0,261
G2-3	11	1		9	3		6	5		7	4		7	5	

G, Grading; Signifikanzen fett gedruckt

## 4 Diskussion

Speicheldrüsenmalignome weisen eine geringe Inzidenz von 2,5 bis 3,0 Fällen pro 100.000 Personen pro Jahr auf (Eveson *et al.* 2005). Zudem bilden sie ein breites Spektrum von mehr als 20 histologischen Subtypen (El-Naggar 2017). Die Etablierung von Tumorstammzellmarkern in Speicheldrüsenmalignomen ist ein Ansatz, um prognostische Marker und neue Therapiemöglichkeiten zu ermitteln. Bislang existieren nur wenige Studien über die Expression von Tumorstammzellmarkern in Speicheldrüsenkarzinomen – mit zudem divergierenden Ergebnissen. Um die prognostische Bedeutung von Tumorstammzellmarkern weiter zu untersuchen, wurden die Überlebensraten von Patienten mit einem Adenokarzinom oder PECA der großen Kopfspeicheldrüsen in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter sowie auf die Expression der Tumorstammzellmarker ALDH1, BMI-1, CD133, CD44, Nanog, Oct-3/4, SOX2 und Vimentin analysiert.

Die von uns untersuchte Kohorte der Adenokarzinome bestand aus einer vergleichbaren Stichprobengröße, wie andere Studien über Tumorstammzellmarker in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen (Soave *et al.* 2013; Seifi *et al.* 2016; Destro Rodrigues *et al.* 2017). Darüber hinaus zeigte sich, in Bezug auf die klinischen und pathologischen Parameter, Übereinstimmung sowohl mit den Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID 2019), als auch mit dem Hamburger Speicheldrüsenregister (Seifert 1996). Auch das berechnete 5-Jahres-Gesamtüberleben, das krankheitsspezifische und das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben war mit dem anderer großer Tumorregister vergleichbar (Terhaard *et al.* 2004; Terhaard *et al.* 2005; Bjørndal *et al.* 2012). Die vorliegende Kohorte der Adenokarzinome kann somit als repräsentativ gewertet werden.

Bezüglich der prognostischen Bedeutung der TNM-Klassifikation zeigte sich in unserer Studie keine Signifikanz, auch wenn in anderen Arbeitsgruppen immer wieder der TNM-Klassifikation eine bedeutende Rolle als prognostischer Parameter in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen zugesprochen wurde (Terhaard *et al.* 2004; Schwarz-Furlan 2011; Iqbal *et al.* 2014; Jegadeesh *et al.* 2015; Jang *et al.* 2017). Ein signifikanter Zusammenhang wurde hingegen in der vorliegenden Studie bei Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem UICC-Stadium ermittelt. Das vermehrte Auftreten von Rezidiven in höheren UICC-Stadien konnte auch von Jegadeesh *et al.* (2015) bei der Untersuchung von 112 Speicheldrüsenmalignomen beobachtet werden. Zudem wird die Graduierung des Tumors in mehreren Studien als Prognosefaktor aufgeführt (Koul

*et al.* 2007; Iqbal *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014). Entsprechend demonstrierte die eigene Studie eine starke negative Korrelation hochmaligner Tumore mit dem 5-Jahres-Gesamtüberleben, dem krankheitsspezifischen und dem rezidivfreien 5-Jahres-Überleben.

Zur postoperativen Therapie von Adenokarzinomen der Speicheldrüse wird bei High-grade-Tumoren, invasiv wachsenden Malignomen, tumorpositiven Lymphknoten und R1-Situationen eine adjuvante Strahlentherapie empfohlen (Safdieh *et al.* 2017; Cheraghlou *et al.* 2018; Aro *et al.* 2019). Entsprechend dieser Empfehlungen wurden auch die Patienten der eigenen Studie mit einem Adenokarzinom der Speicheldrüse behandelt und es erfolgte bei etwa der Hälfte eine adjuvante Radiotherapie. Da sechs Patienten trotz Indikation keine Adjuvanz erhielten, konnten sie mit den Daten bestrahlter Patienten, also mit ähnlich fortgeschrittenen Tumoren verglichen werden. Es errechneten sich bei durchgeführter Radiotherapie höhere 5-Jahres-Überlebensraten, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Letztendlich unterstützt das Ergebnis dieser Studie die Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie bei oben definierter Indikation.

In dem vorliegenden Kollektiv lagen die Überlebenszeiten für Frauen über denen für Männer. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten, dass das weibliche Geschlecht einen prognostisch günstigen Parameter darstellte (Terhaard *et al.* 2004; Koul *et al.* 2007).

Eine prognostische Relevanz von ALDH1 in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen konnte bislang in vorbeschriebenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. So konnten Zhou *et al.* (2013) und Seifi *et al.* (2016) keine Korrelationen zur Tumorgroße, Nerveninfiltration, Tumordifferenzierung, Tumorlokalisation, zum Überleben, Patientenalter und Geschlecht herstellen. Daraus schlussfolgerten sie, dass ALDH1 zwar eine Rolle in der Tumorgenese, jedoch nicht in der Morphogenese des Tumors spielt (Seifi *et al.* 2016). Interessanterweise fand sich in der vorliegenden Arbeit ein starker signifikanter Zusammenhang von Low-grade-Malignomen mit einer starken ALDH1-Expression. Weitere Forschungsarbeiten zum Thema sind daher anzustreben.

Im Hinblick auf BMI-1 zeigte sich in dieser Studie weder eine Korrelation mit den Überlebenszeiten noch mit den klinisch-pathologischen Parametern. Die Arbeitsgruppe um Yi *et al.* fand eine starke BMI-1-Expression mit einem ungünstigeren metastasenfrem Überleben bei der Untersuchung von 102 adenoidzystischen Karzinomen assoziiert (Yi *et al.* 2016). Die Resultate von Destro Rodrigues *et al.* (2017) an 28 Mukoepidermoidkarzinomen entsprachen denen der vorliegenden Arbeit. Sie beobachteten keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern. Schließlich kann aufgrund der geringen Studienanzahl und einer zum Teil niedrigen Fallzahl die genaue Bedeutung von

BMI-1 als prognostischer Marker in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen nicht abschließend geklärt werden.

Eine Korrelation der CD44-Überexpression mit einer schlechteren Prognose in Speicheldrüsenkarzinomen wurde bisher in verschiedenen Studien nachgewiesen. Signifikante Resultate wurden bei der Kombination mehrerer Marker erzielt. Soave *et al.* korrelierten eine hohe T-Kategorie und einen positiven Lymphknotenstatus mit einer CD44-Überexpression bei gleichzeitig starker Expression von CD24 (Soave *et al.* 2013). Auch Xu *et al.* beobachteten bei der kombinierten Auswertung von CD44, SOX2 und CD133 ein schlechteres Gesamtüberleben bei Mukoepidermoidkarzinomen bei starker Expression der Marker (Xu *et al.* 2017). In der eigenen Untersuchung hingegen konnten, unter alleiniger Berücksichtigung der Färbung von CD44, signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Eine starke CD44-Expression korrelierte mit einem positiven Lymphknotenstatus, einer hohen T-Kategorie und einem hohen UICC-Stadium. Hohe CD44-Expression für sich genommen, zeigte zwar Tendenz zur Assoziation mit hochmalignen Tumoren und dem Auftreten von Metastasen oder Rezidiven bei Mukoepidermoidkarzinomen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Binmadi *et al.* 2016). Diese Resultate weisen darauf hin, dass die CD44-Expression für sich genommen durchaus eine prognostische Bedeutung in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen besitzt.

In der eigenen Arbeit bestätigte sich, ähnlich der Studie von Destro Rodrigues *et al.* (2017), eine Tendenz hin zu einem Zusammenhang der Nanog-Expression mit einer positiven perineuralen Infiltration. Weitere Korrelationen mit den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern fanden sich nicht, was mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmte (Destro Rodrigues *et al.* 2017; Xu *et al.* 2017). Somit scheint es lohnenswert der prognostischen Bedeutung der Nanog-Expression im Zusammenhang mit der perineuralen Infiltration nachzugehen.

Beim Vergleichen der prozentualen Anteile der detektierten Tumorstammzellen mittels SOX2 entsprechen die vorliegenden Ergebnisse den Resultaten von Xu *et al.* (2017), jedoch nicht den Resultaten von Dai *et al.* (2014), welche deutlich mehr Tumorstammzellen dokumentierten. Als möglicher Grund kommen Unterschiede im Studiendesign und -kollektiv in Frage: In der Studie von Xu *et al.* (2017) wurden ausschließlich Mukoepidermoidkarzinome der kleinen Speicheldrüsen betrachtet und bei Dai *et al.* (2014) wurde sich auf adenoidzystische Karzinome beschränkt. Bezüglich der prognostischen Relevanz der SOX2-Expression fand sich in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zu den Überlebenszeiten, jedoch korrelierte eine starke SOX2-Expression mit einer negativen perineuralen Infiltration. Im Gegensatz dazu wurde in vorangegangenen Studien über adenoidzystische Karzinome (Dai *et al.* 2014) sowie Karzinome ex pleo-

morphen Adenoms (Sedassari *et al.* 2017) eine SOX2-Überexpression mit einer hohen T-Kategorie, mit High-grade-Tumoren, mit dem Auftreten von Fernmetastasen und mit geringeren Überlebensraten assoziiert. In Mukoepidermoidkarzinomen wiederum konnten keine Korrelationen beobachtet werden (Xu *et al.* 2017). Unter Berücksichtigung der Kohortengröße, stellen die jeweils untersuchten unterschiedlichen Subtypen eine mögliche Erklärung der abweichenden Ergebnisse dar. Somit könnte der Vergleich der publizierten Daten darauf hinweisen, dass die prognostische Bedeutung von SOX2 von den histologischen Entitäten der Tumore abhängig ist.

Das vorliegende Kollektiv der PECA entsprach in der Anzahl der dokumentierten primären und metastasierten PECA sowie in der ermittelten Alters- und Geschlechterverteilung weitgehend den Kollektiven anderer Studien über PECA der Speicheldrüsen (Ying *et al.* 2006; Makki *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015). Zudem ist das in dieser Arbeit beschriebene krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben und das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben mit anderen Studien vergleichbar (Makki *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015). In Konkordanz mit bereits publizierten Daten ist zu vermerken, dass die Überlebenszeiten von Patienten mit einem PECA der Speicheldrüsen unter den Überlebenszeiten der Patienten mit einem Adenokarzinom lagen (Bhattacharyya und Fried 2005). Jedoch waren Patienten mit einem PECA der Speicheldrüsen, entsprechend den Daten von Chen *et al.* (2015), älter als bei Diagnose anderer Parotismalignome, welches einen negativen Einflussfaktor auf die Prognose darstellen könnte.

Die prognostische Bedeutung des Patientenalters bei Diagnose eines PECA wurde von Lee *et al.* (2001) und Chen *et al.* (2015) an zwölf respektive 2.104 primären PECA beschrieben. Mit einem Alter von über 60 Jahren (Lee *et al.* 2001) bzw. von über 85 Jahren (Chen *et al.* 2015) bei Diagnose wiesen Patienten mit einem primären PECA der Parotis ein schlechteres krankheitsspezifisches Überleben auf als jüngere Patienten. Interessanterweise dokumentierten Makki *et al.* (2013) eine inverse Korrelation, weshalb eine geringere Aggressivität des metastasierten PECA im Alter diskutiert wurde. Die eigenen Ergebnisse stehen, unabhängig vom Ursprung des PECA, in Übereinstimmung mit den Resultaten aus den Untersuchungen von Lee *et al.* (2001) und Chen *et al.* (2015).

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich wesentlich bei der Betrachtung des bereits etablierten prognostischen Einflusses einer adjuvanten Radiotherapie von Studien ähnlicher Fragestellung (Audet *et al.* 2004; Ying *et al.* 2006; Chen *et al.* 2015). Diese schlossen Patienten ohne Indikation zur Radiotherapie in die Kohorte der nicht bestrahlten Patienten ein. Somit war die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Aggressivität der Tumore nicht gegeben. Es wurde in unserer Studie ein negativer signifikanter Einfluss auf das krankheitsspezifische Überleben, auf das rezidivfreie Überleben und auf die

lokale Kontrollrate beobachtet. Zudem fiel bei der Unterteilung in primäres und metastasiertes PECA auf, dass im Kollektiv der metastasierten PECA deutlich weniger Patienten eine adjuvante Radiotherapie ablehnte, als im Kollektiv der primären PECA. Ein erhöhtes Bewusstsein für die Bedeutung einer umfangreichen Krebstherapie nach vorausgegangenem Hauttumor könnte die Ursache hierfür sein.

Ein hervorzuhebendes Resultat dieser Studie ist die Assoziation einer starken CD44- oder ALDH1-Expression mit dem Vorliegen eines primären PECA und somit potentieller Abgrenzung zu einem in die Parotis metastasierten PECA. Anhand bisheriger pathologischer Kriterien und Methoden ist die Unterscheidung eines primären PECA von einem in die *Glandula parotidea* metastasierten PECA nicht möglich. Deshalb wurde, gemäß der Studie von Ying *et al.* (2006), bei einem vorausgegangenem kutanen PECA klinisch die Diagnose eines metastasierten Hauttumors gestellt. In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass primäre PECA eine signifikant schlechtere Prognose im Vergleich zu metastasierten PECA zeigten (Lee *et al.* 2001; Barzilai *et al.* 2005). In Zukunft könnte die Differenzierung zwischen primären PECA und metastasierten PECA durch eine Färbung der Tumorproben mit CD44 und ALDH1 unterstützt werden.

Für PECA des Kopf-Hals-Bereiches wird ALDH1 als Tumorstammzellmarker beschrieben, seit die Implantation in vivo von wenigen ALDH1-positiven Zellen zur Tumorneubildung geführt hat (Prince *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten bei PECA der Speicheldrüsen unabhängig vom Ursprung tendenziell niedrigere 3-Jahres-Gesamtüberlebenszeiten bei starker ALDH1-Expression beobachtet werden. Ähnliches konnte in anderen Studien über PECA des Kopf-Hals-Bereiches dokumentiert werden. So korreliert eine ALDH1-Überexpression mit höherer T-Kategorie, N-Kategorie, höherem Grading und niedrigerem Gesamtüberleben (Hildebrand *et al.* 2014; Qian *et al.* 2014). Auch der Anteil an Tumorproben mit einer Färbung von ALDH1 der vorliegenden Studie zeigte sich passend zu den Ergebnissen von de Moraes *et al.* (2017) über oropharyngeale PECA. Diese Arbeit ergänzt schließlich das bereits bekannte prognostische Potential von ALDH1 in PECA des Kopf-Hals-Bereiches um die Bedeutung in PECA der Speicheldrüsen.

Eine starke BMI-1-Expression konnte in oropharyngealen PECA mit tumorpositiven Lymphknoten und niedrigerem Gesamtüberleben, krankheitsspezifischem und rezidivfreiem Überleben assoziiert werden (Huber *et al.* 2011; Allegra *et al.* 2012). Interessanterweise fand sich unter den publizierten Daten auch eine zu den erwähnten Ergebnissen inverse Aussage der Arbeitsgruppe um Häyry (2010). Es wurde eine schwache BMI-1-Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert und mit den unterschiedlichen Aufgaben der Polycomb-Proteine begründet. Die vorliegende Studie unterstreicht dies nicht, sondern schließt sich der Aussage von Huber *et al.* (2011) an und dokumen-

tiert eine Korrelation eines niedrigen Gesamtüberlebens bei BMI-1-Überexpression in PECA der Speicheldrüsen. Diese Resultate legen nicht nur nahe, dass BMI-1 ein geeigneter Marker ist, um Patienten mit erhöhter Mortalität und mit einem aggressiven Tumor zu identifizieren, BMI-1 wird aktuell auch als potentielles therapeutisches Ziel angesehen. Die Inhibition von BMI-1 mittels PCT-209 ist in Studien über PECA des Kopf-Hals-Bereiches eine effektive Methode um die Chemotherapieresistenz der Tumorzellen und somit das Auftreten eines Tumorrezidivs zu reduzieren (Chen *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Die bereits etablierte Chemotherapie in Kombination mit PCT-209 birgt vielversprechende Hoffnungen. Auch CD44 und ALDH1 werden bezüglich einer zielgerichteten Tumortherapie untersucht (Colnot *et al.* 2000; Kim *et al.* 2017). Die für Rezidive und Metastasen verantwortlichen Tumorstammzellen gezielt anzugreifen, wäre eine neue Behandlungsoption um die Prognose der PECA im Kopf-Hals-Bereich endgültig zu verbessern.

Aktuell wird die Bedeutung von CD44 als Tumorstammzellmarker stark diskutiert. Während in vielen Krebsarten CD44 eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung, der Metastasierung und der Aufrechterhaltung der Tumorgenese zugesprochen wird (Visvader und Lindeman 2008; Leung *et al.* 2010), kann dieses Phänomen dagegen in anderen Tumorgeweben nicht bestätigt werden (Gao *et al.* 1997; Lopez *et al.* 2005). Davon abgesehen zeigte eine umfassend angelegte Metaanalyse bezüglich PECA des Kopf-Hals-Bereichs, dass CD44-Überexpression mit tumorpositiven Lymphknoten, höherem Grading und niedrigeren Überlebensraten korrelierte (Chen *et al.* 2014). In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation zu den Überlebensraten beobachtet werden. Dies mag durch die kleine Fallzahl dieser Arbeit oder möglicherweise durch den unterschiedlichen Ursprung der PECA bedingt sein. Jedoch wird wie bereits erwähnt ebenso, wie bei BMI-1, aktuell die Verwendung von CD44 als therapeutisches Ziel diskutiert (Colnot *et al.* 2000).

Die SOX2-Expression stellte sich in der vorliegenden Arbeit als starker negativer prognostischer Parameter für das rezidivfreie Überleben dar und entsprach damit bereits publizierten Studien über PECA des Kopf-Hals-Bereiches (Tang *et al.* 2013; Lee *et al.* 2014). Dieses Resultat weist darauf hin, dass SOX2 in PECA ein Indikator für vermehrte Tumorstammzellaktivität ist. Bezüglich der klinisch-pathologischen Parameter zeigten einige Arbeiten an PECA des Kopf-Hals-Bereiches eine Korrelation mit der SOX2-Expression (Tang *et al.* 2013; Züllig *et al.* 2013). Schröck *et al.* (2013), González-Márquez *et al.* (2014) und Bayo *et al.* (2015) fanden wiederum keinen Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Parametern. In der eigenen Studie konnte einzig in metastasierten PECA das Patientenalter mit der SOX2-Expression korreliert werden. Somit kann die Bedeutung der SOX2-Expression im Zusammenhang mit den klinisch-

pathologischen Parametern nicht abschließend geklärt werden, jedoch scheint speziell in primären PECA der Speicheldrüsen keine Assoziation vorhanden zu sein.

In diesem Kollektiv fanden sich ungefähr doppelt so viele Tumorproben mit einer starken Vimentin-Expression, wie in der Studie von Liu *et al.* (2017) über PECA der Zunge. Der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven zeigt, dass eine schwache Vimentin-Expression mit einem niedrigeren 5-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten einherging, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Dieses Ergebnis steht mit dem in der Literatur an PECA des Kopf-Hals-Bereiches dokumentierten Resultaten im Widerspruch, in der sich eine schlechtere Prognose bei starker Vimentin-Expression zeigte (Zhou *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017). Ob die unterschiedliche Lokalisation der PECA diese abweichenden Resultate erklärt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnten den Kenntnisstand über die prognostische Bedeutung von Tumorstammzellmarkern in Speicheldrüsenmalignomen erweitern. Die Resultate bezüglich der Adenokarzinome dokumentierten CD44 in Konkordanz mit vorausgegangenen Studien als Indikator für das Tumorstadium und Nanog für das Vorliegen einer Nerveninfiltration. ALDH1 hingegen ist als Tumorstammzellmarker in Speicheldrüsenmalignomen in Frage zu stellen. Die vorliegende Arbeit enthält erstmalig eine separate Analyse von Tumorstammzellmarkern in PECA der Speicheldrüsen und erweitert somit die Erkenntnisse und potentiellen therapeutischen Ansätze bei Speicheldrüsenmalignomen. Um in PECA der Speicheldrüsen eine Expression von CD44 und ALDH1 als Indikator des Tumorsprungs, sowie eine starke SOX2- und BMI-1-Expression als prognostischen Marker zu verifizieren, wären weitere Forschungsanstrengungen mit größeren Kollektiven notwendig. Dennoch könnten die vorliegenden Resultate einen aggressiveren therapeutischen Ansatz in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen mit starker Expression von CD44 und Nanog sowie in PECA der Speicheldrüsen mit starker Expression von SOX2 und BMI-1 rechtfertigen. Letztendlich zeigte sich, dass Tumorstammzellmarker neben bereits etablierten klinisch-pathologischen Parametern zur Prognoseeinschätzung beitragen können. Inwiefern sie sich für Therapieansätze eignen ist noch weiter zu erforschen.

## 5 Zusammenfassung

Speicheldrüsenkarzinome zeigen eine geringe Inzidenz mit einer großen pathologischen Entitätenvielfalt und einer schlechten Prognose im fortgeschrittenem Stadium. Daher gestaltet sich die Etablierung neuer prognostischer Marker schwierig. Bislang untersuchten nur wenige Studien die Expression von Tumorstammzellmarker in Adenokarzinomen der Speicheldrüsen mit voneinander abweichenden Ergebnissen. Eine separate Analyse von Tumorstammzellmarkern in Plattenepithelkarzinomen (PECA) der Speicheldrüsen ist bislang noch nicht durchgeführt worden. In der vorliegenden Studie sollten daher geeignete Prognoseparameter evaluiert und die Relevanz von Tumorstammzellmarkern untersucht werden. Dazu erfolgte neben der Analyse klinisch-pathologischer Parameter auch die der Tumorstammzellmarker in entsprechenden Tumorproben.

Tumorproben von 40 Adenokarzinomen und 31 PECA der großen Speicheldrüsen wurden mit dem Tumorstammzellmarkern ALDH1, BMI-1, CD133, CD44, Nanog, Oct-3/4, SOX2 und Vimentin immunhistochemisch gefärbt. Die Expression der genannten Marker wurde mit den klinisch-pathologischen Parametern und den Überlebensraten korreliert.

Im Patientenkollektiv der Adenokarzinome zeigten sich die klinisch-pathologischen Parameter, Differenzierungsgrad und UICC-Stadium von negativer prognostischer Bedeutung. Hinsichtlich der Tumorstammzellmarker konnte keine Assoziation mit den Überlebensraten beobachtet werden. Bei Betrachtung der immunhistochemischen Marker in Verbindung mit den klinisch-pathologischen Parametern korrelierte eine schwache ALDH1-Expression mit hohem Grading und eine starke CD44-Expression mit hohem UICC-Stadium, hoher T- und N-Kategorie und der Lokalisation in der *Glandula parotidea*. Weiterhin war eine starke SOX2-Expression mit einer negativen perineuralen Infiltration und eine starke Nanog-Expression mit einer positiven perineuralen Infiltration assoziiert. In der Auswertung der durchgeführten Clusteranalyse korrelierten die erstellten Gruppen signifikant mit dem Grading. Das Expressionsmuster CD44 und BMI-1 „stark“ sowie SOX2, Nanog und ALDH1 „schwach“, präsentierte sich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines High-grade-Tumors.

Für das Kollektiv der PECA konnte einem hohen Patientenalter und dem Ablehnen einer adjuvanten Radiotherapie eine signifikante schlechtere prognostische Relevanz zugesprochen werden. Bezogen auf die Tumorstammzellmarker korrelierte eine BMI-1-Überexpression mit einem niedrigeren Gesamtüberleben und eine starke SOX2-

Expression mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben. Bei der gesonderten Betrachtung primärer und in die Parotis metastasierten PECA zeigte sich nur in primären PECA eine Assoziation von starker BMI-1-Expression mit einem niedrigeren Gesamtüberleben. Bei PECA-Metastasen in der Parotis war eine SOX2-Überexpression mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben assoziiert. Im Kollektiv der metastasierten PECA korrelierte eine SOX2-Überexpression mit einem höheren Patientenalter. Zudem korrelierte eine ALDH1- und CD44-Überexpression mit dem Vorliegen eines primären PECA der *Glandula parotidea*, wohingegen bei metastasiertem PECA eine schwache Expression dieser Markerproteine verzeichnet wurde.

Bei Adenokarzinomen der Speicheldrüsen mit starker Expression von CD44 und Nanog, sowie bei PECA der Speicheldrüsen mit starker Expression von SOX2 und BMI-1 könnte somit eine aggressivere Therapie gerechtfertigt sein. Außerdem könnte in Zukunft eine Differenzierung zwischen PECA-Primarius und -Metastase mittels CD44 und ALDH-1 möglich sein. Letztendlich zeigte sich, dass Tumorstammzellmarker neben bereits etablierten klinisch-pathologischen Parametern zur Prognoseeinschätzung beitragen können. Inwiefern sie sich für Therapieansätze eignen sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY (2012): Biology and management of salivary gland cancers. *Semin Radiat Oncol* 22, 245–253

Alfred G. Knudson J (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820

Allegra E, Puzzo L, Zuccalà V, Trapasso S, Vasquez E, Garozzo A, Caltabiano R (2012): Nuclear BMI-1 expression in laryngeal carcinoma correlates with lymph node pathological status. *World J Surg Oncol* 10, 206

Aro K, Ho AS, Luu M, Kim S, Tighiouart M, Yoshida EJ, Mallen-St Clair J, Shiao SL, Leivo I, Zumsteg ZS (2019): Survival impact of adjuvant therapy in salivary gland cancers following resection and neck dissection. *Otolaryngol Neck Surg* 160, 1048–1057

Audet N, Palme CE, Gullane PJ, Gilbert RW, Brown DH, Irish J, Neligan P (2004): Cutaneous metastatic squamous cell carcinoma to the parotid gland: analysis and outcome. *Head Amp Neck* 26, 727–732

Barzilai G, Greenberg E, Cohen-Kerem R, Doweck I (2005): Pattern of regional metastases from cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 132, 852–856

Bayo P, Jou A, Stenzinger A, Shao C, Gross M, Jensen A, Grabe N, Mende CH, Rados PV, Debus J et al. (2015): Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Oncol* 9, 1704–1719

Bhattacharyya N, Fried MP (2005): Determinants of survival in parotid gland carcinoma: a population-based study. *Am J Otolaryngol* 26, 39–44

Binmadi N, Elsissi A, Elsissi N (2016): Expression of cell adhesion molecule CD44 in mucoepidermoid carcinoma and its association with the tumor behavior. *Head Face Med* 12, 1–5

Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, Homøe P, Sørensen CH, Andersen E, Bundgaard T et al. (2012): Salivary gland carcinoma in Denmark 1990–2005: Outcome and prognostic factors. *Oral Oncol* 48, 179–185

- Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730–737
- Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Monch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC et al. (2007): The polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* 21, 525–530
- Canis M, Lechner A, Mack B, Zengel P, Laubender RP, Koehler U, Heissmeyer V, Gires O (2012): CD133 is a predictor of poor survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* 12, 97–105
- Chai L, Liu H, Zhang Z, Wang F, Wang Q, Zhou S, Wang S (2014): CD44 Expression Is predictive of poor prognosis in pharyngolaryngeal cancer: systematic review and meta-analysis. *Tohoku J Exp Med* 232, 9–19
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655
- Chaukar D, Vaidya AD, Walvekar R, Laskar SG, Prabhash K: Major salivary glands. In: O'Sullivan B, Brierley J, D'Cruz AK, Fey MF, Pollock R, Vermorken JB, Huang SH (Hrsg.): *UICC Manual of Clinical Oncology*. 9. Auflage; John Wiley & Sons, Chichester 2015, 571–585
- Chen D, Wu M, Li Y, Chang I, Yuan Q, Ekimyan-Salvo M, Deng P, Yu B, Yu Y, Dong J et al. (2017): Targeting BMI1 + cancer stem cells overcomes chemoresistance and inhibits metastases in squamous cell carcinoma. *Cell Stem Cell* 20, 621–634
- Chen J, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, Gong L (2014): Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 14, 15
- Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL (2015): Prognostic factors for squamous cell cancer of the parotid gland: an analysis of 2104 patients. *Head Amp Neck* 37, 1–7
- Cheraghlou S, Kuo P, Mehra S, Agogo GO, Bhatia A, Husain ZA, Yarbrough WG, Burtness BA, Judson BL (2018): Adjuvant therapy in major salivary gland cancers: analysis of 8580 patients in the National Cancer Database. *Head Neck* 40, 1343–1355
- Chinn SB, Darr OA, Peters RD, Prince ME (2012): The role of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells in tumorigenesis, metastasis, and treatment failure. *Front Endocrinol* 3, 90

- Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF (2008): Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 4085–4095
- Cichy J, Puré E (2003): The liberation of CD44. *J Cell Biol* 161, 839–843
- Cohnheim J: Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. In: Lubarsch O (Hrsg.): *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. Band 65; Springer, Berlin 1875, 64–69
- Colnot DR, Quak JJ, Roos JC, Lingen A van, Wilhelm AJ, Kamp GJ van, Huijgens PC, Snow GB, Dongen GAMS van (2000): Phase I therapy study of 186Re-Labeled chimeric monoclonal antibody U36 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med* 41, 1999–2010
- Dai W, Tan X, Sun C, Zhou Q (2014): High expression of SOX2 is associated with poor prognosis in patients with salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Int J Mol Sci* 15, 8393–8406
- de Moraes FPP, Lourenço SV, Ianez RCF, de Sousa EA, Silva MM da C, Damascena AS, Kowalski LP, Soares FA, Coutinho-Camillo CM (2017): Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 123, 113–122
- Destro Rodrigues MFS, Sedassari BT, Esteves CM, de Andrade NP, Altemani A, de Sousa SCOM, Nunes FD (2017): Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med* 46, 112–120
- Drenckhahn D: Mundhöhle. In: Drenckhahn D, Benninghoff A (Hrsg.): *Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem (Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie)*. 17. Auflage; © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München 2008, 594–624
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863
- El-Naggar AK: Tumours of salivary glands. In: Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ, El-Naggar AK (Hrsg.): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 004 Auflage; IARC Press, Lyon 2017, 160–162

- Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK: Tumours of the salivary gland. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005, 209–281
- Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT (1997): CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 57, 846–849
- GEKID: Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert Koch-Institut, Berlin 2019
- Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee D, Li CJ (2012): Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLOS ONE* 7, e43628
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S (2007): ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567
- Goksuluk D, Korkmaz S, Zararsiz G, Karaagaoglu A Ergun (2016): easyROC: An interactive web-tool for ROC curve analysis using R language environment. *R J* 8, 213
- González-Márquez R, Llorente JL, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Álvarez-Marcos C, Suárez C, Hermsen MA (2014): SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 45, 851–857
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003): SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765
- Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, Weeks L, Costello R, Posner M (2003): Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol* 39, 724–727
- Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J (2010): Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer* 102, 892–897
- Hellquist H, Skalova A: Histopathology of the Salivary Glands. 1. Auflage; Springer, Heidelberg 2014
- Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant’Ana Filho M (2014): Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 43, 499–506

- Huber GF, Albinger-Hegyí A, Soltermann A, Roessle M, Graf N, Haerle SK, Holzmann D, Moch H, Hegyí I (2011): Expression patterns of Bmi-1 and p16 significantly correlate with overall, disease-specific, and recurrence-free survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 117, 4659–4670
- Ihrler S, Reuschel W, Cornelius CP, Zimmermann F: Malignome der Kopfspeicheldrüsen. In: Mast G (Hrsg.): *MANUAL Kopf-Hals-Malignome*. 4. Auflage; W. Zuckschwerdt Verlag, München 2009, 284–291
- Iqbal H, Bhatti ABH, Hussain R, Jamshed A (2014): Ten year experience with surgery and radiation in the management of malignant major salivary gland tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 2195–2199
- Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H (2003): Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2309–2317
- Jaggupilli A, Elkord E (2012): Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin Dev Immunol* 2012, 1–11
- Jakob JA, Kies MS, Glisson BS, Kupferman ME, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR (2015): Phase II study of gefitinib in patients with advanced salivary gland cancers: Phase II study of gefitinib in advanced salivary gland cancers. *Head Neck* 37, 644–649
- Jang S, Patel PN, Kimple RJ, McCulloch TM (2017): Clinical outcomes and prognostic factors of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 37, 3045–3052
- Jegadeesh N, Liu Y, Prabhu RS, Magliocca KR, Marcus DM, Higgins KA, Vainshtein JM, Trad Wadsworth J, Beitler JJ (2015): Outcomes and prognostic factors in modern era management of major salivary gland cancer. *Oral Oncol* 51, 770–777
- Kaplan EL, Meier P (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53, 457–481
- Khan AJ, DiGiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter D, Son YH, Haffty BG (2001): Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 96, 149–158
- Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM (2013): The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50, 130827094923003

- Kim J, Shin JH, Chen C-H, Cruz L, Farnebo L, Yang J, Borges P, Kang G, Mochly-Rosen D, Sunwoo JB (2017): Targeting aldehyde dehydrogenase activity in head and neck squamous cell carcinoma with a novel small molecule inhibitor. *Oncotarget* 8, 52345
- Koul R, Dubey A, Butler J, Cooke AL, Abdoh A, Nason R (2007): Prognostic factors depicting disease-specific survival in parotid-gland tumors. *Int J Radiat Oncol* 68, 714–718
- Krishnamurthy S, Warner KA, Dong Z, Imai A, Nör C, Ward BB, Helman JI, Taichman RS, Bellile EL, McCauley LK et al. (2014): Endothelial Interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells: endothelial IL-6 and cancer stem cells. *STEM CELLS* 32, 2845–2857
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F (2012): Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *STEM CELLS* 30, 833–844
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J (2006): The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281, 33554–33565
- Lee S, Kim GE, Park CS, Choi EC, Yang WI, Lee CG, Keum KC, Kim YB, Suh CO (2001): Primary squamous cell carcinoma of the parotid gland. *Am J Otolaryngol* 22, 400–406
- Lee SH, Oh SY, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, Rho YS, Bae WJ, Lim YC (2014): SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 111, 2122–2130
- Leung ELH, Fiscus RR, Tung JW, Tin VPC, Cheng LC, Sihoe ADL, Fink LM, Ma Y, Wong MP (2010): Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLOS ONE* 5, e14062
- Lima RA, Tavares MR, Dias FL, Kligerman J, Nascimento MF, Barbosa MM, Cernea CR, Soares JR, Santos IC, Salviano S (2005): Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 133, 702–708
- Linke RP: Immunologische Techniken. In: Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.): *Bioanalytik*. 3. Auflage; Springer Spektrum, Berlin 2012, 77–124
- Liu PF, Kang BH, Wu YM, Sun JH, Yen LM, Fu TY, Lin YC, Liou HH, Lin YS, Sie HC (2017): Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial–mesenchymal transition-related proteins. *PLOS ONE* 12, e0178581

- Liu S, Ow A, Ruan M, Yang W, Zhang C, Wang L, Zhang C (2014): Prognostic factors in primary salivary gland mucoepidermoid carcinoma: an analysis of 376 cases in an Eastern chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43, 667–673
- Liu S, Liu L, Ye W, Ye D, Wang T, Guo W, Liao Y, Xu D, Song H, Zhang L et al. (2016): High Vimentin expression associated with lymph node metastasis and predicted a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 6, 38834
- Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA (2005): CD44 Attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 65, 6755–6763
- Lu H, Sun HZ, Li H, Cong M (2012): The clinicopathological significance of Bmi-1 expression in pathogenesis and progression of gastric carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 3437–3441
- Mack B, Gires O (2008): CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLOS ONE* 3, e3360mast
- Makki FM, Mendez AI, Taylor SM, Trites J, Bullock M, Flowerdew G, Hart RD (2013): Prognostic factors for metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the parotid. *J Otolaryngol - Head Neck Surg* 42, 14
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA et al. (2007): Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625–635
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642
- Moch H, Höfler HK, Lax S, Moll R, Tannapfel A, Zimmermann D: Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H (Hrsg.): *Pathologie*. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2012, 123–170
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372
- Pfeffer MR, Talmi Y, Catane R, Symon Z, Yosepovitch A, Levitt M (2007): A phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncol* 43, 33–36

- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007): Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 973–978
- Qian X, Wagner S, Ma C, Coordes A, Gekeler J, Klussmann JP, Hummel M, Kaufmann AM, Albers AE (2014): Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 140, 1151–1158
- Ravindran G, Sawant SS, Hague A, Kingsley K, Devaraj H (2015): Association of differential  $\beta$ -catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis: Association of  $\beta$ -catenin, with Oct-4 and NANOG in OSCC. *Head Neck* 37, 982–993
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105
- Safdieh J, Givi B, Osborn V, Lederman A, Schwartz D, Schreiber D (2017): Impact of adjuvant radiotherapy for malignant salivary gland tumors. *Otolaryngol-Head Neck Surg* 157, 988–994
- Schröck A, Göke F, Wagner P, Bode M, Franzen A, Braun M, Huss S, Agaimy A, Ihrler S, Menon R et al. (2013): Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) amplification is an independent indicator of disease recurrence in sinonasal cancer. *PLOS ONE* 8, e59201
- Schwarz-Furlan S (2011): Speicheldrüsenkarzinome: Pathologie und Prognose. *Pathol* 32, 310–315
- Sedassari BT, Rodrigues MFSD, Conceição TS, Mariano FV, Alves VAF, Nunes FD, Altemani A, de Sousa SCOM (2017): Increased SOX2 expression in salivary gland carcinoma ex pleomorphic adenoma progression: an association with adverse outcome. *Virchows Arch* 471, 775–784
- Seifert G: Pathologie der Speicheldrüsen (Oralpathologie I). Springer, Berlin 1996
- Seifi S, Seyedmajidi M, Salehinejad J, Gholinia H, Aliakbarpour F (2016): Immunohistochemical expression of CD56 and ALDH1 in common salivary gland tumors. *Iran J Otorhinolaryngol* 28, 389–397
- Shideng Bao, Qiulian Wu, McLendon RE, Yueling Hao, Qing Shi, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760

- Shmelkov SV, St.Clair R, Lyden D, Rafii S (2005): AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715–719
- Soave DF, da Costa JPO, da Silveira GG, Ianez RCF, de Oliveira LR, Lourenço SV, Ribeiro-Silva A (2013): CD44/CD24 immunophenotypes on clinicopathologic features of salivary glands malignant neoplasms. *Diagn Pathol* 8, 29
- Sobin LH, Wittekind C: *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6. Auflage; John Wiley & Sons, New York 2002
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7. Auflage; John Wiley & Sons, Chichester 2009
- Stehelin D, Guntaka RV, Varmus HE, Bishop JM (1976): Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J Mol Biol* 101, 349–365
- Sun S, Wang Z (2010): ALDH high adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 843–848
- Tang X, Shen X, Li L, Zhang Y, Chen G (2013): SOX2 overexpression correlates with poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 40, 481–486
- Terhaard CHJ, Lubsen H, Van der Tweel I, Hilgers FJM, Eijkenboom WMH, Marres H a. M, Tjho-Heslinga RE, de Jong JMA, Roodenburg JLN (2004): Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head Amp Neck* 26, 681–693
- Terhaard CHJ, Lubsen H, Rasch CRN, Levendag PC, Kaanders HHÀM, Tjho-Heslinga RE, van Den Ende PLA, Burlage F (2005): The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary gland tumors. *Int J Radiat Oncol* 61, 103–111
- Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR (2000): Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 129, 1–19
- Veness MJ, Palme CE, Smith M, Cakir B, Morgan GJ, Kalnins I (2003): Cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to cervical lymph nodes (nonparotid): a better outcome with surgery and adjuvant radiotherapy. *The Laryngoscope* 113, 1827–1833
- Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Alea MP, Richel DJ, Stassi G, Medema JP (2008): Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci* 105, 13427–13432

- Virchow R: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. 1. Auflage; Hirschwald, Berlin 1855
- Visvader JE, Lindeman GJ (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755–768
- Wang Q, Li Z, Wu Y, Huang R, Zhu Y, Zhang W, Wang Y, Cheng J (2017): Pharmacological inhibition of Bmi1 by PTC-209 impaired tumor growth in head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int* 17, 107
- Wang S, Gao X, Liu X, Gao S, Fan Y, Jiang Y, Ma X, Jiang J, Feng H, Chen Q (2016): CD133+ cancer stem-like cells promote migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation. *Oncotarget* 7, 29051
- Watanabe (2009): Diagnostic importance of overexpression of Bmi-1 mRNA in early breast cancers. *Int J Oncol* 35, 511–515
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997): Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 94, 12425–12430
- Xu W, Wang Y, Qi X, Xie J, Wei Z, Yin X, Wang Z, Meng J, Han W (2017): Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: a retrospective analysis based on a double-center study. *Sci Rep* 7, 43907
- Yang Q, Liu Y, Huang Y, Huang D, Li Y, Wu J, Duan M (2013): Expression of COX-2, CD44v6 and CD147 and relationship with invasion and lymph node metastasis in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLOS ONE* 8, e71048
- Yi C, Li B, Zhou C-X (2016): Bmi-1 expression predicts prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma and correlates with epithelial-mesenchymal transition-related factors. *Ann Diagn Pathol* 22, 38–44
- Ying YLM, Johnson JT, Myers EN (2006): Squamous cell carcinoma of the parotid gland. *Head Amp Neck* 28, 626–632
- Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD (2010): A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* 289, 151–160
- Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D (2015): Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 3150

Zhou JH, Hanna EY, Roberts D, Weber RS, Bell D (2013): ALDH1 immunohistochemical expression and its significance in salivary adenoid cystic carcinoma. *Head Neck* 35, 575–578

Züllig L, Roessle M, Weber C, Graf N, Haerle SK, Jochum W, Stoeckli SJ, Moch H, Huber GF (2013): High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer* 49, 1915–1922

## Danksagung

Die Danksagung möchte ich nutzen, um mich im besonderem Maße bei meinem Doktorvater Professor Mark Jakob, für die Überlassung des Themas, für die Anregungen und Unterstützungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen zu bedanken.

Darüber hinaus bin ich meinen BetreuerInnen Dr. Mattis Bertlich, Dr. Julia Kitz, Dr. Jennifer Spiegel und Dr. Bernhard Weiß zu großem Dank verpflichtet, für die Bereitstellung aller benötigten Materialien, die Unterstützung beim Umsetzen der Verschriftlichung und der geduldigen Beantwortung meiner Fragen zu jeder Zeit

Herzlich bedanke ich mich auch bei Frau Bruhse für die großartige Unterstützung bei der Kontaktaufnahme zu den Hausärzten.

Weiterhin möchte ich mich für all die wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche sowie die hieraus entstehende Motivation, mit meiner Mitpromovenden Mina Mohammadpour von ganzem Herzen bedanken. Du hast mit einem nicht unwesentlichen Teil zur erfolgreichen Entstehung der Dissertation beigetragen.