

**Aus dem Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München**

**Vorstand
Prof. Dr. med.
Thomas Kirchner**

**Intraduktales Frühstadium des Karzinoms ex pleomorphes Adenom:
Histologische, immunhistologische und molekularpathologische
Charakterisierung in 74 Fällen**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Agnes Wolf**

**Geburtsort
Wien**

**Jahr
2017**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Ihrler

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Georgios Psychogios
Prof. Dr. Thomas Knösel**

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2017

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1. Definition	6
1.2. Allgemeines, Häufigkeit, Alter, Geschlecht, Lokalisation	6
1.3. Die Mehrschrittkanzerogenese des Karzinom ex pleomorphes Adenom (CEPA)	7
1.4. Karzinom ex primäres PA versus ex rezidiertes PA	11
1.5. Molekularpathologische Befunde beim CEPA	12
1.6. Fragestellung und Zielsetzung	12
2. Material	13
2.1. Patientenkollektiv	13
2.1.1. Gesamtes Patientenkollektiv	13
2.1.2. Kollektiv mit rein intrakapsulären CEPA	13
2.1.3. Kollektiv mit extrakapsulär-invasiven CEPA	14
2.1.4. Kollektiv des myoepithelialen Typs des CEPA	14
3. Methode	15
3.1. Fixierung und Einbettung der Gewebeproben	15
3.2. Immunhistologie	15
3.2.1. Grundlagen der Immunhistologie	15
3.2.2. Vorbehandlung und Antigendemaskierung	16
3.3. Histomorphologische und immunhistologische Marker und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) und deren Auswertungssysteme	17
4. Ergebnisse	21
4.1. Lokalisation	28
4.2. intraduktales CEPA	30
4.3. extrakapsulär – invasives CEPA	34
5. Diskussion	35
6. Literaturverzeichnis	38
Danksagung	42

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A	Amplifiziert
Abb.	Abbildung
ADENO	Adenokarzinom
ASCO/CAP	The American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists
c-erbB2(-Gen)	cellular avian erythroblastosis homologue B2
Ca	Karzinom
Ca-Typ	Karzinomtyp
CEPA	Karzinom ex pleomorphes Adenom
CK	Zytokeratin
DCIS	duktales Karzinom in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	extrakapsuläres CEPA
EDIC	extraduktales intrakapsuläres CEPA
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Her2Neu	Human epidermal growth receptor 2
ID	intraduktales CEPA
IH	Immunhistologie
K	kleine Speicheldrüsen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lok.	Lokalisation
NA	nicht amplifiziert
Ø	Durchschnitt
P	Parotis
PA	pleomorphes Adenom
PE-CA	Plattenepithelkarzinom
Prim. PA	primäres pleomorphes Adenom
Rez. PA	rezidiertes pleomorphes Adenom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Glandula Submandibularis
Sal. Duct	Speichelgangkarzinom
Sex	Geschlecht
T	Tränendrüse

TNM (System)

TRIS (Puffer)

UNDIFF

WHO

μm

Tumor-Nodus-Metastasen (System)

Trishydroxymethylaminomethan (Puffer)

undifferenziertes Karzinom

Weltgesundheitsorganisation

Mikrometer

Intraduktales Frühstadium des Karzinoms ex pleomorphes Adenom: Histologische, immunhistologische und molekularpathologische Charakterisierung in 74 Fällen

1. Einleitung

1.1. Definition

Die WHO klassifiziert das Karzinom ex pleomorphes Adenom (CEPA) als einen Tumor, der definitive Zeichen von Malignität, wie zytologische Atypie, Mitosen und/oder infiltratives Wachstum aufweist und sekundär in einem vorbestehenden pleomorphen Adenom (PA) entstanden ist (1)(2). CEPA können aus einem primären PA oder deutlich seltener aus einem rezidierten, fast immer multiknotigen PA entstehen.

Ein Problem liegt für die histologische Diagnostik dann vor, wenn das pleomorphe Adenom nicht oder nicht sicher nachweisbar ist, da entweder das PA völlig von Karzinom zerstört ist, bei großen Karzinomen das PA nur schwer auffindbar ist, das PA histologisch vom Karzinom schwer zu unterscheiden ist oder das gesamte PA durch Sklerosierung devitalisiert ist. Auf der Basis der oben genannten Probleme kann man davon ausgehen, dass bis zu 1/3 der Fälle nicht korrekt als CEPA diagnostiziert werden (3)(4)(5).

Die vorliegende Arbeit basiert auf der größten je untersuchten Serie von CEPA.

1.2. Allgemeines, Häufigkeit, Alter, Geschlecht, Lokalisation

Das CEPA macht 4% der Speicheldrüsenneoplasien und 12-25% der Speicheldrüsenkarzinome aus. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, etwa 10 Jahre später als für Patienten mit PA (6). Geographische Unterschiede wurden in Studien festgestellt. In Großbritannien waren 1997 25% aller primären malignen Parotisneoplasien CEPA, während es 1988 in den USA nur 12% waren. In der Schweiz wurde ein Wert von 14% erhoben (6).

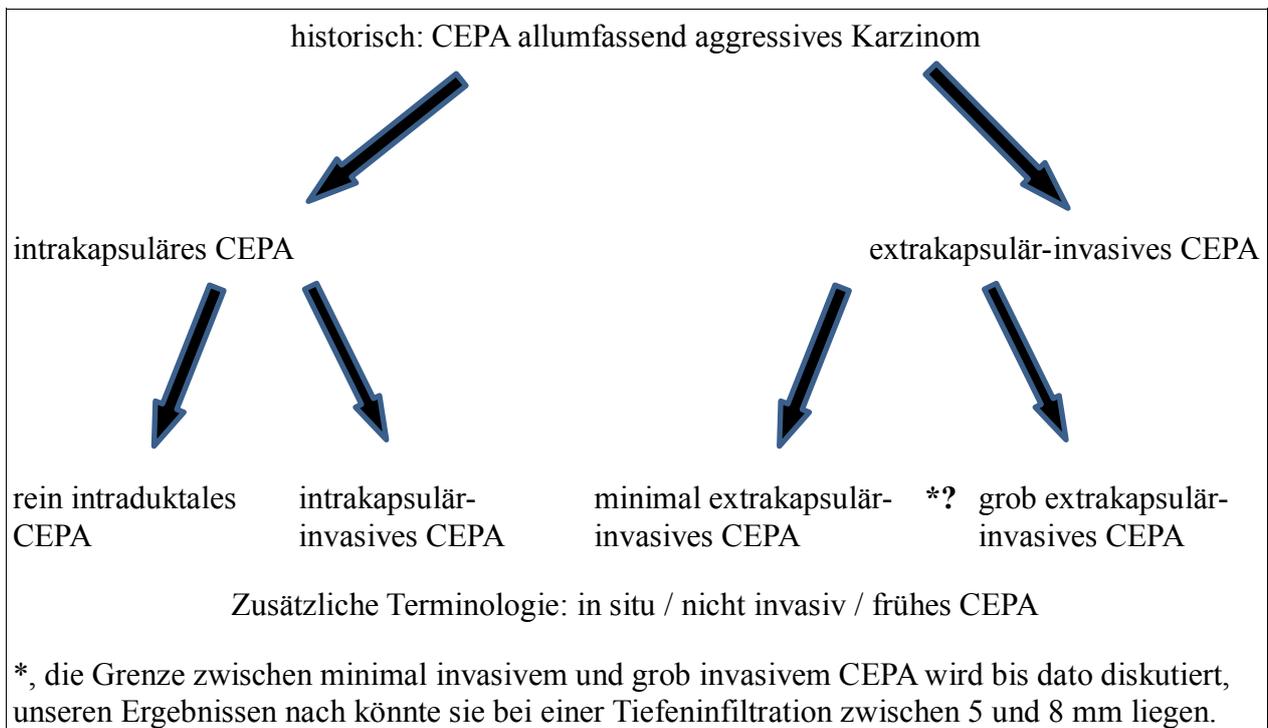
Das CEPA ist bei den meisten Patienten (81,7%) in der Glandula Parotis lokalisiert, gefolgt von der Glandula submandibularis (18%) und der Glandula sublingualis (0,3%) (1). Die kleinen Speicheldrüsen, vor allem am harten und weichen Gaumen sind auch häufiger befallen.

1.3. Die Mehrschrittkanzerogenese des CEPA

Ursprünglich wurde das CEPA als invasives, häufig fortgeschrittenes und aggressives Karzinom definiert. Das Konzept des nicht invasiven, intrakapsulären Stadiums des CEPA mit besserer Prognose wurde als erstes 1977 von LiVolsi und Perzin postuliert (7). Bereits 1984 sprach Tortoledo et.al. die Problematik der verwirrenden Terminologie an und postulierte in seiner Publikation anhand von 40 Fällen erstmals eine Infiltrationsgrenze von extrakapsulär invasiven CEPA mit häufig letalem Ausgang von 8 mm (8). 1997 publizierten Brandwein et al. anhand von 12 Fällen die Prognose von nicht-invasivem und minimal-invasivem CEPA (9). 2005 publizierte Altemani et al. eine Studie bezüglich der Progression des CEPA (10). Die Karzinome wurden in 3 Subgruppen unterteilt. In rein intrakapsuläre CEPA, in minimal-invasive CEPA mit einer Tiefeninfiltration von $\leq 1,5\text{mm}$ und in grob invasive CEPA. Die Gruppe der intrakapsulären CEPA wurde hier als „in situ“ bezeichnet.

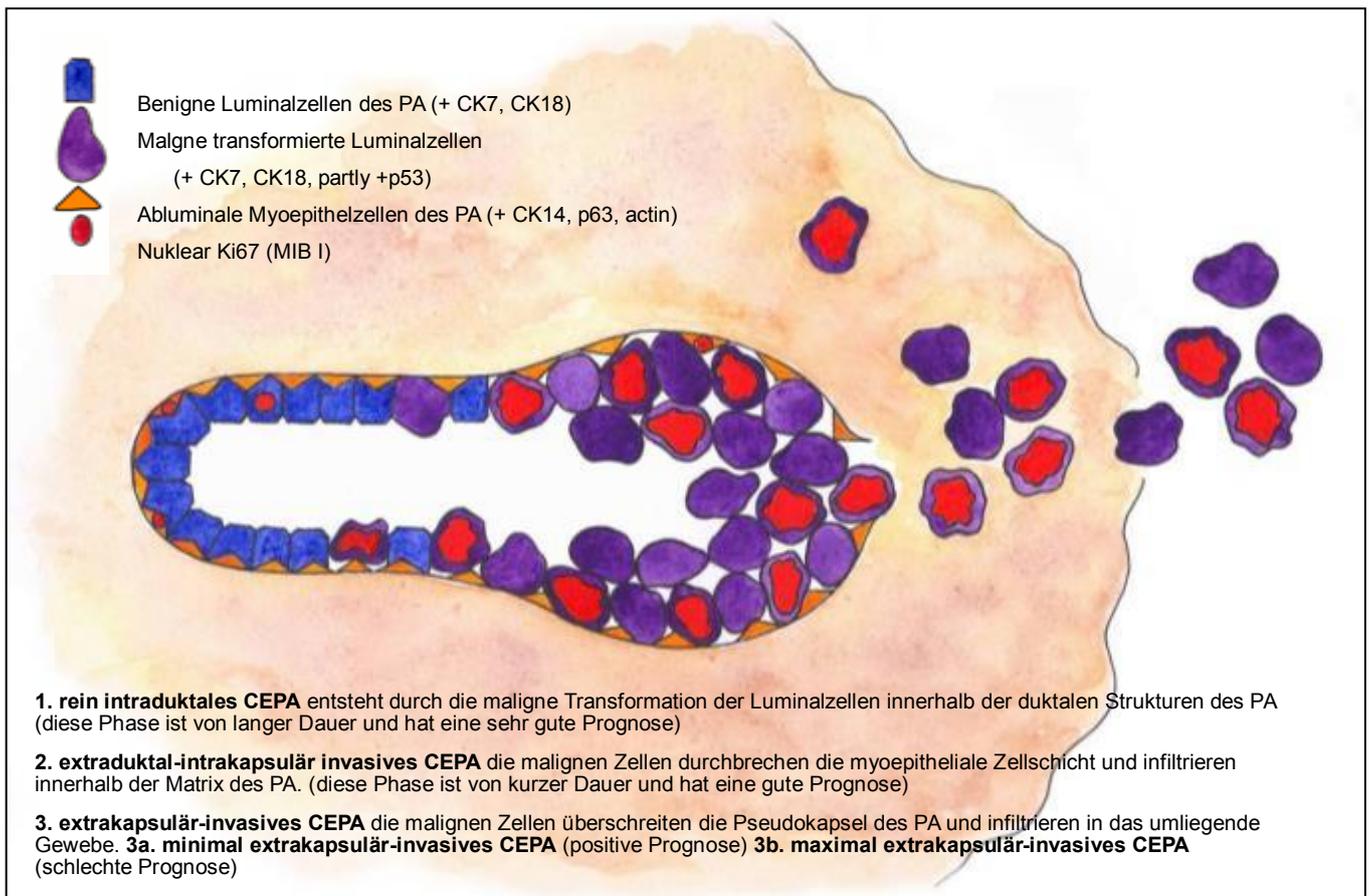
Anhand der histomorphologischen Schritte wird heute eine Mehrschrittkanzerogenese postuliert. Das CEPA wird in ein intraduktales Frühstadium, ein extraduktal-intrakapsuläres Stadium und in ein extrakapsulär-invasives Stadium unterteilt (4)(11)(Abb. 1 und Abb. 2).

Abb. 1: Entwicklung der Terminologie



nach Ihrler 2016 eingereicht

Abb. 2: Schematische Darstellung der Mehrschrittkanzerogenese

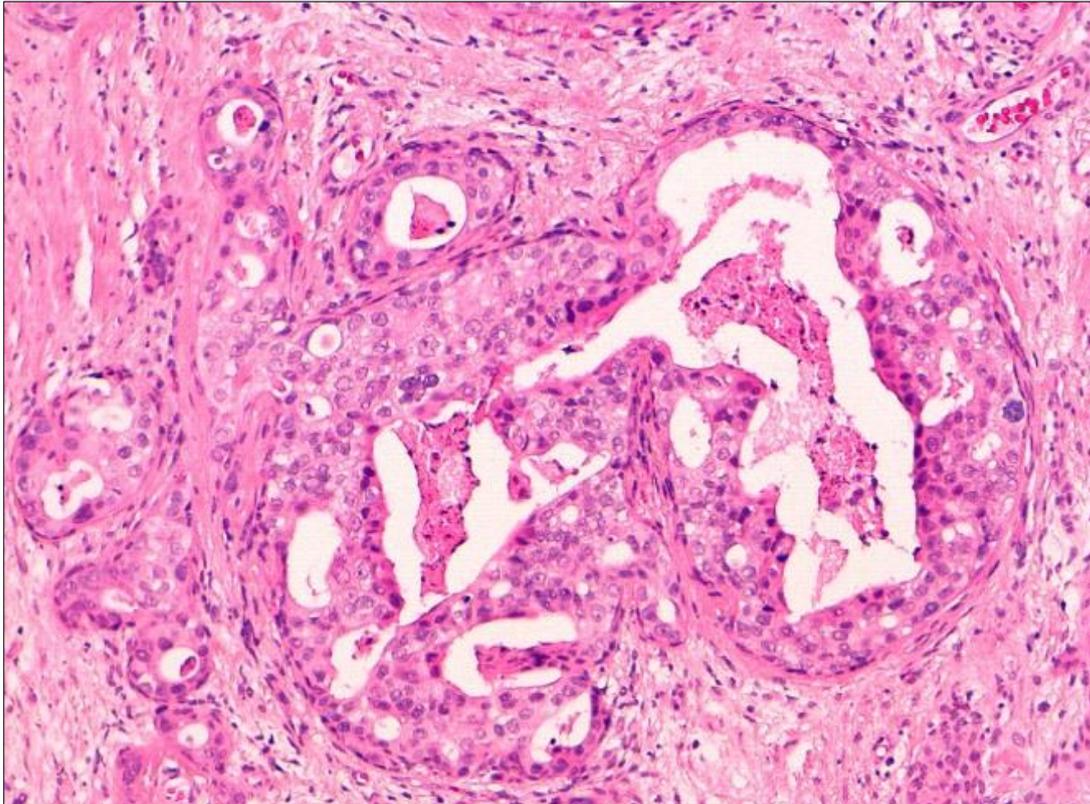


nach Ihrler 2007

Intraduktales Frühstadium

Im Anfangsstadium kommt es mutmaßlich als Folge einer weiteren Mutation zu einer Vermehrung von luminalen Duktalzellen des PA mit unterschiedlich stark ausgeprägten zellulären Atypien und zunehmender Zellproliferation. Die Neoplasie findet innerhalb der tubulären Strukturen des PA statt und wird von nicht-atypischen äußeren Myoepithelzellen des PA begrenzt (4)(11)(Abb. 2). Komedonekrosen mit zum Teil assoziierten Verkalkungen können vorhanden sein. Sklerosen, die das PA zum Teil hochgradig bis subtotal devitalisieren und assoziierte Verkalkungen können vorkommen.(Abb. 3)

Abb. 3: Darstellung eines intraduktalen CEPA – HE Färbung



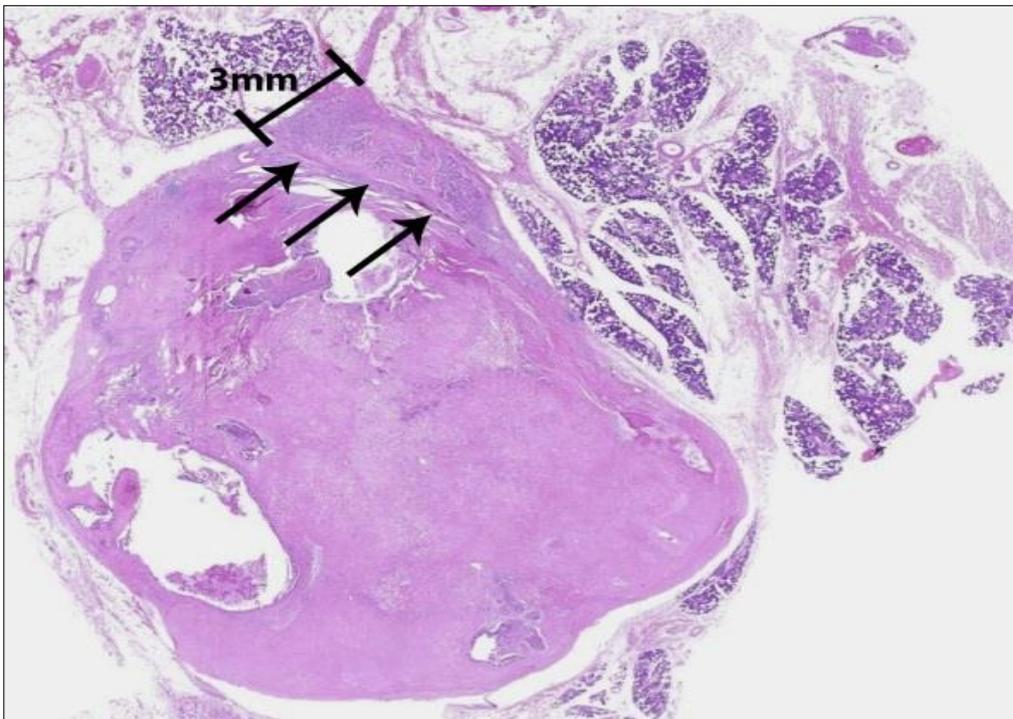
Extraduktales-intrakapsuläres Stadium

Vermutlich erst nach Jahren durchbrechen die intraduktalen malignen Zellen die myoepitheliale Zellschicht und infiltrieren innerhalb der Matrix des PA. Das Karzinom (Ca) ist damit noch auf den Bereich des pleomorphen Adenoms beschränkt und damit noch dem Konzept des intrakapsulären CEPA zugehörig. Die Wahrscheinlichkeit einer hämatogenen Metastasierung ist hier sehr gering.

Extrakapsulär-invasives Stadium

Das extrakapsulär-invasive CEPA stellt das letzte Progressionsstadium dar. Die intrakapsulär-invasiven malignen Karzinomzellen überschreiten dabei die Pseudokapsel des PA und können daraufhin in das sie umgebende Gewebe infiltrieren und bekommen dadurch die Möglichkeit lymphogen und hämatogen zu metastasieren (Abb. 4).

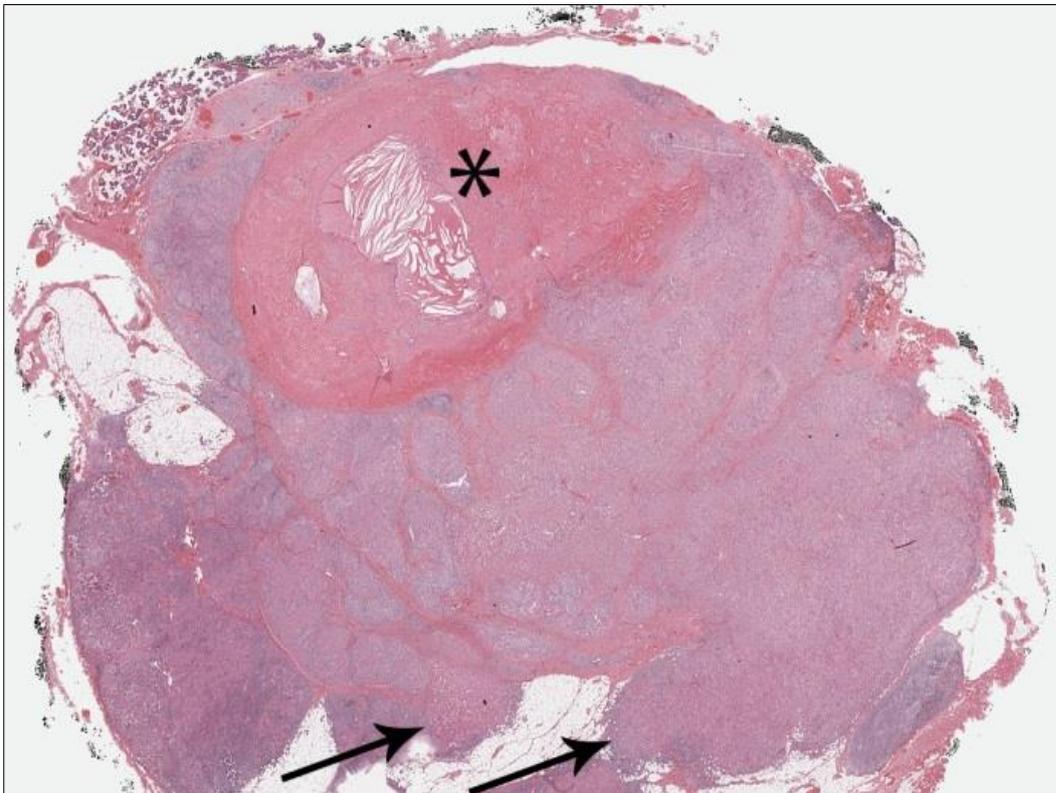
Abb. 4: Darstellung eines minimal extrakapsulär - invasiven CEPA mit einer Tiefeninfiltration von 3mm außerhalb der Kapsel des PA (Pfeile) – HE Färbung.



Das invasive CEPA manifestiert sich in unterschiedlichen Karzinomtypen und ist häufig groß, aggressiv infiltrierend und hat eine schlechte Prognose (Abb. 5).

Man unterscheidet zwischen Adenokarzinom, undifferenziertem Karzinom, Speicheldrangkarzinom, Plattenepithelkarzinom, myoepitheliales Karzinom, sowie weiteren seltenen Typen. Da in Voruntersuchungen die myoepithelialen Typen des CEPA sich als stark divergierend von den anderen Karzinomtypen erwiesen haben, haben wir uns entschlossen, sie in eine separate Gruppe einzuteilen.

Abb.5: Darstellung eines grob invasiven CEPA mit einer stark ausgedehnten Gewebeeinfiltration (Pfeile), der präexistente PA Knoten ist durch einen Asterisk gekennzeichnet – HE Färbung



Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Ausmaß der Tiefeninfiltration des extrakapsulär-invasiven Karzinoms klinisch von großer Bedeutung ist. Je geringer sie ausfällt, desto besser ist die Prognose. Spiro et al. setzt die Infiltrationstiefe, ab der es zu einer stark sinkenden Überlebensrate kommt, bei 6mm fest (12), während Tortoledo et al. ab 8mm einen stark negativen Verlauf dokumentieren (8). Lewis et al. definieren die Grenze der Infiltrationstiefe bei 5mm. Alle Fälle, bei denen das CEPA stärker infiltriert war, hatten einen ungünstigen Verlauf (13). Weiler et al. aus unserer Arbeitsgruppe bestimmten die Grenze der Tiefeninfiltration zwischen guter und schlechter Prognose zwischen 5 und 8mm (11).

1.4. Karzinom ex primäres PA versus Karzinom ex rezidiertes PA

Das CEPA kann häufiger aus einem primären PA oder seltener aus einem rezidierten PA entstehen. Der prozentuale Anteil an CEPA, die aus einem rezidierten PA entstehen liegt in der Literatur zwischen 10% und 30% (4)(11). Rezidierte PA haben fast immer multiknotige

Rezidivmanifestationen. Die einzelnen Knoten sind in der Regel klein und eher zellarm. Diese Knoten weisen häufig eine fehlende Kapselbildung und ein pseudoinfiltratives Wachstumsmuster auf.

Der beim rezidierten PA meist kleine maligne transformierende Adenomknoten ist wegen Überwachung durch das invasive Karzinom häufig nicht zu identifizieren (4)(11). Frühere eigene Untersuchungen (11) konnten zeigen, dass die Prognose des Ca ex rezidiertes PA ungünstiger ist als die des Ca ex primäres PA.

1.5. Molekularpathologische Befunde beim CEPA

Erschwerend für die molekularpathologische Diagnostik ist, dass das Karzinom multiple Mutationen aufweist. Ein Hinweis dafür ist unter anderem die hohe Zellpleomorphie, die durch Ploidiestudien bestätigt wurde. Zellen können den doppelten, 4-fachen oder 8-fachen Chromosomensatz enthalten, als Hinweis auf eine hohe chromosomale Instabilität. Das häufige Vorhandensein von p53 Genmutationen wird von diversen Publikationen bestätigt. Im Schnitt zeigen zwischen 30% und 40% der Fälle p53 Mutationen.

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung mit Fokussierung auf die intraduktale Phase des CEPA.

- Charakterisierung des intraduktalen CEPA hinsichtlich konventioneller Histologie, Immunhistologie und molekularer Marker anhand einer großen Serie (74 Fälle mit CEPA)
- Identifizierung von Fakten, welche die Hypothese der Mehrschrittkanzerogenese unterstützen, Vergleich zwischen der intraduktalen Phase und der invasiven Phase des CEPA
- Diskussion der prognostischen und therapeutischen Bedeutung der intraduktalen Frühphase
- Vergleich der intraduktalen Frühphase des CEPA mit dem intraduktalen Mamma-Karzinom.
- Diskussion der optimalen Terminologie der Frühphasen des CEPA

2. Material

2.1. Patientenkollektiv

2.1.1. Gesamtes Patientenkollektiv

Das gesamte Patientenkollektiv setzt sich aus 74 Fällen zusammen. Von den 74 Patienten sind 33 weiblich und 41 männlich. Das durchschnittliche Alter liegt bei 59 Jahren, wobei der jüngste Patient in unserem Kollektiv 32 und der älteste 89 Jahre alt ist. Das Karzinom ist primär zu 73% in der Glandula Parotis und zu 27% in anderen Drüsen lokalisiert. Am zweithäufigsten finden wir das Karzinom in der Glandula submandibularis mit 16%, gefolgt von den kleinen Speicheldrüsen mit 7% und der Tränendrüse mit 4 %. Bei 56 der 74 Fälle (75,7%) entstand das Karzinom aus einem primären pleomorphen Adenom, während bei 18 der 74 Fälle (24,3%) das Karzinom aus einem rezidierten pleomorphen Adenom entstand. Die Diagnose rezidiertes PA wird anhand der klinischen Anamnese und/oder durch das Vorhandensein von multifokalen Adenomknoten gestellt.

Bei der Auswertung wird zunächst eine Einteilung nach den oben definierten Progressionsstadien vorgenommen.

2.1.2. Kollektiv mit rein intrakapsulärem CEPA (intraduktal/ extraduktal)

Das Kollektiv setzt sich aus 25 Fällen zusammen. Es besteht aus 23 rein intraduktalen und 2 intraduktal-extraduktalen Fällen. Da die extraduktal-intrakapsuläre Fallzahl so gering ist, werden sie nicht als eigenes Kollektiv geführt, sondern bilden mit den rein intraduktalen Fällen ein gemeinsames Kollektiv.

Es besteht aus 12 weiblichen und 13 männlichen Patienten. Das durchschnittliche Alter beträgt 58 Jahre. Die Altersspanne zwischen dem jüngsten Patienten mit 35 Jahren und dem ältesten Patienten mit 85 Jahren beträgt 50 Jahre. Das rein intraduktale Karzinom ist mit 88% am häufigsten in der Glandula Parotis und mit 12% in anderen Drüsen lokalisiert. Zu jeweils 4% befindet sich das CEPA in der Glandula submandibularis, den kleinen Speicheldrüsen und der Tränendrüse. Bei 20 Fällen entstand das Karzinom aus einem primären pleomorphen Adenom und bei 5 Fällen aus einem rezidierten pleomorphen Adenom.

2.1.3. Kollektiv mit extrakapsulär-invasivem CEPA

Die Gruppe der extrakapsulären CEPA stellt mit 34 Patienten die größte Unterfraktion dar. Sie besteht aus 13 weiblichen und 21 männlichen Patienten. Das durchschnittliche Alter beträgt 63 Jahre, wobei die Altersspanne zwischen dem jüngsten Patienten mit 32 Jahren und dem ältesten Patienten mit 89 Jahren, 57 Jahre beträgt und damit größer ist, als die bei den rein intrakapsulären Karzinomen. Mit 79% ist die Glandula Parotis die häufigste Lokalisation des CEPA, gefolgt von der Glandula submandibularis mit 12%, den kleinen Speicheldrüsen mit 6% und der Tränendrüse mit 3%. 25 Fälle stammen aus einem primären und 9 Fälle aus einem rezidierten pleomorphen Adenom.

2.1.4. Kollektiv des myoepithelialen Typs des CEPA

Teilweise in früheren Publikationen bereits publiziert (4)(11) und in der vorliegenden Untersuchung bestätigt, unterscheiden sich die CEPA des myoepithelialen Typs in vielen Aspekten gravierend von anderen histologischen Typen des CEPA. Als wichtigstes Unterscheidungskriterium besitzen diese Tumore keine intraduktale Komponente und werden zum besseren Verständnis als separate Gruppe geführt.

Es handelt sich um ein Kollektiv von 15 Fällen mit 8 weiblichen und 7 männlichen Patienten. Das Durchschnittliche Alter liegt bei 57 Jahren, die Altersspanne zwischen dem jüngsten Patienten mit 18 Jahren und dem ältesten Patienten mit 88 Jahren ist mit 70 Jahren die Größte des gesamten Patientenkollektivs. Das myoepitheliale CEPA unterscheidet sich von anderen CEPA auch anhand der Lokalisation. So sind 60% der Fälle nicht in der Glandula Parotis lokalisiert. Mit einer Häufigkeit von 40% sind sowohl die Glandula Parotis als auch die Glandula Submandibularis gleichmäßig betroffen, gefolgt von den kleinen Speicheldrüsen mit 13% und der Tränendrüse mit 7%. Von den 15 Fällen entstanden 11 myoepitheliale Karzinome aus einem primären und 4 aus einem rezidierten pleomorphen Adenom.

3. Methode

3.1. Fixierung und Einbettung der Gewebeproben

Die Fälle stammen aus dem Kollektiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), im Rahmen von Kooperationen aus den Archiven der Universität zu Köln, des Universitätsklinikums Erlangen, dem Uniklinikum Dresden, sowie aus Konsilzusendungen an das pathologische Institut der LMU bzw. ab 2010 an das Labor für Dermatohistologie und Oralpathologie München (Prof. Dr. S. Ihrler).

Für die Fixierung wurden die Gewebeproben unmittelbar nach ihrer Entfernung mit gepuffertem 4-10%igen Formaldehyd (Formalin) für 24 -28 Stunden behandelt und daraufhin in Paraffin (Paraplast, Vogel, Giessen, Deutschland) eingebettet (Fowler, O'Leary, & Mason, 2013).

Von den vorhandenen Blöcken wurden die jeweils benötigten Schnitte hergestellt. Die Schnitte haben eine Dicke von 2-3 μ m. Sie wurden mit Schlittenmikrotomen und Einmal-Stahlklingen angefertigt und auf silanisierte Objektträger (SuperFrost/Plus, Mentzel) aufgezogen.

3.2. Immunhistologie

3.2.1. Grundlagen der Immunhistologie

Die Immunhistologie dient der Darstellung antigener Strukturen. So können zum Beispiel Proteine in Gewebsschnitten durch die Anwendung von Antikörper-Farbkomplexen exakt topographisch dargestellt werden. Die immunhistologische Färbung kann auf einem 2 Schritt Prinzip basieren. Zuerst wird ein primärer Antikörper verwendet, dessen Aufgabe es ist, sich spezifisch an das Epitop eines gesuchten Antigens im Gewebe oder einer Zelle zu binden. Als Antikörper werden polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper eingesetzt.

Die Antiseren werden von Tieren gewonnen. Kaninchen, Ziegen, Schafe oder Schweine werden mit gereinigtem Antigen immunisiert und ihre Seren, die gegen das Antigen gerichtete Antikörper produziert haben, werden periodisch gewonnen.

Da polyklonale Antikörper gegen mehrere Epitope gerichtet sind, weisen sie eine hohe Avidität auf. Unerwünschte Hintergrundreaktionen können auftreten. Monoklonale Antikörper hingegen sind nur gegen ein einzelnes Epitop gerichtet, wodurch es zu einer Steigerung der Spezifität der immunhistochemischen Reaktion kommt. Sie entstehen durch Fusion von in Kultur gezüchteten Tumorzellen mit immunglobulinproduzierenden Milzzellen immunisierter Tiere. Die dadurch entstandene Zellkultur aus immortalisierten Zellhybriden wird in Reagenzflaschen gehalten und kann selektioniert gewünschte Antikörper produzieren.

Die Antikörper können praktisch aus dem Überstand des Kulturmediums in unlimitierten Mengen gewonnen werden. Während des zweiten Schritts kommt es zur Lokalisierung und der damit verbundenen Visualisierung der Antigen-Antikörper Bindungsstelle. Dies kann durch zwei verschiedene Methoden erreicht werden. Bei der direkten Methode wird ein Markermolekül, zum Beispiel ein Enzym verwendet. Dieses koppelt sich an den primären Antikörper und kann ihn damit direkt nach dem ersten Inkubationsschritt darstellen. Die indirekte Methode stellt die Antigen-Antikörper Reaktion im Gewebe durch die zusätzliche Verwendung von immunologischen oder chemischen Reaktionen dar. Sekundäre Antikörper, die entweder mit Markermolekülen ausgestattet oder in der Lage sind mit Markermolekülen oder Enzymen einen Komplex zu bilden, werden gegen die primären Antikörper gerichtet. Es handelt sich hierbei um ein mehrstufiges Detektionssystem (14).

3.2.2. Vorbehandlung und Antigendemaskierung

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die 2-3 µm dicken und auf Objektträger aufgezogenen Schnitte in Xylol entparaffiniert (2x15 Minuten) und anschließend rehydriert (Ethanol 100% 2x5 Minuten; Ethanol 96% 2x5 Minuten; Ethanol 70% 2x5 Minuten; Aqua dest. 3x5 Minuten). Bei vielen Gewebsantigenen kann es durch die vorausgegangene Formalinfixierung zu einer sterischen Konformationsänderung kommen. Durch Inkubation mit verschiedenen Vorbehandlungen (TRS6, Citrat, Protease XXIV) in Mikrowellengeräten

(Panasonic NN-4241, Japan) kommt es zu einer optimalen Antigenerkennung. Die Schnitte werden, abhängig vom gesuchten Antigen bzw. den verwendeten Antikörpern, in mikrowellenfesten Plastikkuvetten (TPX, Brand, Deutschland) für 15 bis 30 Minuten bei 750 Watt gekocht. Die dabei verdampfte Flüssigkeit wird jeweils ersetzt. Danach werden die Schnitte abgekühlt (20 Minuten RT). Schließlich werden die Schnitte zwei mal für jeweils fünf Minuten in 50mmol TRIS-Puffer gewaschen.

3.3 Histomorphologische und immunhistologische (IH) Marker und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) und deren Auswertungssysteme

Die histomorphologischen und immunhistochemischen Befunde setzen sich aus dem Karzinomtyp, der Größe des jeweiligen PA, dem Karzinomanteil des intrakapsulären CEPA am PA, dem histologischen Wachstumstyp, dem histologischen Grading, dem Grad der Devitalisierung des PA, der Expression von p53, der Proliferation anhand von Ki67, der Bestimmung des Hormonrezeptors Her2Neu mittels Immunhistologie und FISH, der Expression des Androgenrezeptors und der Expression von CK 7,14,18 und p63 zusammen.

Beim histologischen Typ des invasiven Karzinoms wird zwischen Adenokarzinom, undifferenziertem Karzinom, Speicheldrangkarzinom, Plattenepithelkarzinom und myoepitheliale Karzinom unterschieden. Beim Wachstumstyp des intraduktalen Karzinoms wird zwischen solid, linear und papillär (ein Fall) unterschieden, wobei für die Auswertung der papilläre Fall gemeinsam mit den linearen Fällen gewertet wird. Das histologische Malignitätsgrading des intraduktalen und invasiven CEPA orientiert sich am „Nottingham grading system“, einem 3-Schritt Klassifizierungssystem von G1-G3 für Mamma-Karzinome (DiPalma et al., 2012). Das eventuelle Vorhandensein von intraduktalen Komedonekrosen, intraduktalen Verkalkungen und interstitiellen Sklerosen wird mit Hilfe eines 3 Schrittsystems quantifiziert. Es wird zwischen nicht (0), schwach (I) und stark (II) vorhanden unterschieden.

Bei den in Prozent angegebenen Werten für Karzinomanteil, Devitalisierung und Ki67 handelt es sich jeweils um eine semiquantitative subjektive Einschätzung in 10 Prozent Schritten. Die einzige Ausnahme bilden hier die Werte des Proliferationsmarkers Ki67, wo bei Werten <10% auch 3 Prozent Schritte angewendet werden.

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker. Die Größe des Proliferationskompartiments

wird durch die Wachstumsfraktion bestimmt, welche der Einbaurate von 3H-Thymidin in die Tumorzellen entspricht. Ki67 wird in der G1-, der S-, der G2- und der M-Phase des Zellzyklus exprimiert. Zellen in der G0 Phase exprimieren das Antigen nicht, weshalb Ki67 Informationen über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors liefert (14)(15)

Die als Zytokeratine zusammengefassten Proteine werden von epithelialen Zellen gebildet. Sie sind maßgeblich an der intrazellulären Filamentbildung beteiligt und sind somit für das Zytoskelett verantwortlich. Sie sind unter anderem für die Formgebung und die mechanische Stabilisierung der Zelle verantwortlich. Während Breitspektrumzytokeratine alle epithelialen Zellelemente der Speicheldrüsen markieren, lassen sich durch Anwendung selektiver Zytokeratinantikörper einzelne Zellgruppen selektiv darstellen. Nach Moll (1987) unterscheidet man zwischen 20 verschiedenen Zytokeratinen, die sich in 2 Gruppen einteilen lassen. Gruppe 1 besteht aus den sauren Zytokeratinen, zu denen CK 9 bis CK20 gehören. Gruppe 2 besteht aus den neutral – basischen Zytokeratinen, zu denen CK1 bis CK 8 gehören. Die beiden Proteingruppen bilden miteinander Heterodimere, sodass von den Epithelien mindestens 2 Zytokeratine exprimiert werden. (16)(15)

p63 ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert für verschiedene Isoformen von p63- homologen Proteinen. Hauptsächlich reguliert p63 die Proliferation und Differenzierung von mehrschichtigen Plattenepithelien. Es wird angenommen, dass p63 auch bei der Transkription spezifischer Gene eine Rolle spielt, allerdings ist seine genaue Aufgabe bei diesem Vorgang noch unbekannt. (16)(15)

Für Zytokeratin 7,14 und 18, sowie für p63 wird dasselbe Auswertungssystem verwendet. Es handelt sich um ein 3 Schrittsystem (0,1+,2+) und umfasst Stärke und Anzahl der positiv exprimierten Zellen.

Die immunhistologischen Befunde bezüglich molekularer Aspekte setzen sich aus der eventuell vorhandenen Expression des Tumorsuppressorgens p53, des human epidermal growth receptor 2 (Her2Neu) und des Androgenrezeptors, einem Transkriptionsfaktor, zusammen.

Tumorsuppressorgene sind normale zelluläre Gene mit supprimierender Wirkung und regulieren unter anderem auch das Zellwachstum. Kommt es zum Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene können tumoröse Zellen ungehindert proliferieren. Das p53 Gen entscheidet über die DNA Reparaturmechanismen jeder Zelle. Ist der Schaden zu groß und die Zelle nicht mehr in der Lage ihre ursprüngliche DNA Sequenz wiederherzustellen, wird die

Apoptose der betroffenen Zelle eingeleitet. Bei Mutationen oder anders herbeigeführtem Fehlverhalten des Gens kann einerseits die ursprüngliche genetische Struktur nicht wieder hergestellt werden, andererseits kann der programmierte Zelltod auch nicht mehr ausgelöst werden. Durch die dadurch entstehende verlängerte Lebensdauer kommt es zu einer Anhäufung des p53-Proteins im Zellkern. Diese Ansammlung ist schließlich immunhistochemisch nachweisbar (14)(15)

Beim Auswertungssystem für p53 handelt es sich um ein modifiziertes Auswertungssystem von Remmele et al. (17). Es ist ein 12 Punktsystem, welches die Stärke der positiv exprimierten Zellen (0 = nicht, 1 = schwach, 2 = moderat und 3 = stark vorhanden) und deren Menge in Prozent (1 = 1-20%, 2 = 21 – 50%, 3 = 51 – 80% und 4 = 81 – 100%) beinhaltet. Die Ergebnisse der Stärke und Menge werden miteinander multipliziert und können so einen Wert zwischen 0 und 12 ergeben. Werte ab 6 werden als positiv angesehen.

Die Abkürzung Her2Neu steht für human epidermal growth receptor 2. Er regt die Zellproliferation an und hemmt die Apoptosefunktion. Es handelt sich um einen membranständigen Rezeptor, der tumorassoziiert überexprimiert werden kann. Her2Neu gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der Rezeptor ist somit in der Lage durch intrazelluläre Enzyme Phosphatgruppen an Tyrosinreste von intrazellulären Effektormolekülen zu koppeln. Das c-erbB2-Gen (cellular avian erythroblastosis homologue B2) kodiert Her2Neu. Kommt es zu einer Überexpression von Her2Neu ist diese meistens auf eine Gen-Amplifikation des c-erbB2 Gens zurückzuführen (15)(18)

Als Auswertungssystem für die immunhistologische Detektion von Her2Neu wird das „ASCO/CAP scoring system“ verwendet (19)(20)(21) Es ist ein 4 Schritt System von 0 – 3+. Das System beinhaltet die Stärke der Färbung, die Anzahl der positiven Zellen und die Lokalisation der Färbereaktion. Den Wert 0 erhält man, wenn keine membranöse Färbung zu erkennen ist oder weniger als 10% aller Zellen angefärbt werden. 1+ bedeutet dass eine inkomplette membranöse Färbung in mehr als 10% der Zellen zu erkennen ist. 2+ erhält man bei einer schwach bis moderat ausgeprägten kompletten membranösen Färbung bei mehr als 10 % der Zellen. 3+ bedeutet eine starke komplette membranöse Färbung von mehr als 30% der Zellen. Als eindeutig positiv werden nur Werte von 3+ angesehen.

FISH steht für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Durch sie können Nukleinsäuren, also DNA oder RNA nachgewiesen werden. Einsträngige markierte Nukleinsäuren werden als Sonden eingesetzt. Sowohl DNA wie RNA können als Sonden verwendet werden. Die Sonde

muss allerdings die komplementäre Sequenz der Zielstruktur enthalten, sodass sie sich spezifisch binden kann. Unter dem Begriff Hybridisierung versteht man die Bindung eines Nukleinstranges an einen komplementären Strang. Da die Sonde markiert ist, kann sie lokalisiert werden. Sobald die Sonde einen gewissen Bereich auf der Zell – DNA überspannt, kann sie auch direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt werden. Die fluoreszenzmarkierten Proteine sind mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops erkennbar oder können durch weitere Antikörpermarkierungen verstärkt und damit sichtbar gemacht werden (15). Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von Her2Neu (Her2Neu FISH), wird zwischen amplifiziert und nicht amplifiziert unterschieden.

Der Androgenrezeptor gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren und ist ein Steroidrezeptor. Das Androgenrezeptorgen ist am X-Chromosom lokalisiert. Es ist ein Transkriptionsfaktor und damit für die Transkription spezifischer Zielgene verantwortlich. Dies gelingt ihm über eine direkte Interaktion mit den regulatorischen Sequenzen in der DNA. Es kommt zu einer verstärkten Synthese von bestimmten Proteinen. Kommt es zu einer Störung des Androgenrezeptorgens, zum Beispiel durch eine Mutation, kann dies den Verlust seiner Bindungsfähigkeit bedeuten.(14)

Das hier verwendete Auswertungssystem für den Androgenrezeptor ist das „Allred scoring system for breast cancer“ (19)(22) Es handelt sich um ein 8 Punktsystem, welches ebenfalls die Stärke der Färbung, die Anzahl der positiven Zellen und die Lokalisation der positiven Zellen beinhaltet. Für die Stärke werden den exprimierenden Zellen Werte von 0 = nicht, 1 = schwach, 2 = moderat, und 3 = stark vorhanden, gegeben. Für die Anzahl der positiven Zellen wird deren Menge prozentual semiquantitativ subjektiv eingeschätzt und für Werte von 0 bis $\leq 1\%$ 1 Punkt, 1-10% 2 Punkte, 11-33% 3 Punkte, 34-66% 4 Punkte und 67-100% 5 Punkte vergeben. Die Werte der beiden Aspekte werden anschließend miteinander addiert. Der Endwert liegt so zwischen 0 und 8. Werte größer als 3 werden als positiv angesehen.

4. Ergebnisse

Alle 74 Fälle können anhand der oben beschriebenen Methode ausgewertet und in die Studie integriert werden. Aufgrund der Qualität und Beschaffenheit der Präparate ist es jedoch bei einem Präparat eines intrakapsulären Karzinoms ($1/25 = 4\%$), 23 Präparaten eines invasiven Karzinoms ($23/34 = 67,6\%$) und 13 Präparaten eines myoepithelialen Karzinoms ($13/15 = 86,7\%$) nicht möglich alle Kriterien zu erheben.

Die Ergebnisse der einzelnen Fälle sind in Tabelle 1, 2 und 3 dargestellt. Eine Gegenüberstellung der unterschiedliche Ergebnisse der einzelnen Subgruppen sind in den Tabellen 4,5 und 6 dargestellt.

Tabelle 1. rein intraduktales CEPA

Fall	Sex	Alter	Lok	pTNM	Prim (0) Rez (1)	ID (1) ICI (2)	Ca-Typ	Größe PA in mm	intraduktales Karzinom													
									CEPA in % von PA	Wachstumstyp	Grad	Komedonekrosen	Verkalkung intraduktal	Sklerose	Devitalisierung in %	Ki67 in %	p53 IH	Her2Neu IH	Her2Neu FISH	Androgenrezeptor IH	CK18/7	CK14
1	M	60	P	Tis,N0	0	1	DCIS	26	80	solid	G3	II	II	II	40	30	12	3+	A	4	2+	0
2	F	81	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	24	50	solid	G3	II	0	I	20	30	2	3+	A	4	2+	0
3	M	60	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	38	40	linear	G2	0	0	I	0	5	0	1+	NA	7	2+	0
4	M	40	P	Tis,N0	0	1	DCIS	42	60	solid	G3	I	0	I	20	30	6	3+	A	2	2+	0
5	M	35	P	Tis,Nx	1	1	DCIS	14	20	linear	G3	0	0	0	0	5	6	0	NA	4	2+	0
6	M	75	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	19	30	linear	G3	0	0	0	0	10	6	1+	NA	6	2+	0
7	M	51	P	Tis,Nx	1	1	DCIS	10	70	linear	G2	0	0	II	40	20	0	3+	A	7	2+	0
8	F	39	P	Tis,N0	0	1	DCIS	27	90	linear	G3	0	0	0	0	30	1	3+	A	7	2+	0
9	F	50	P	Tis,N0	0	1	DCIS	8	30	linear	G2	0	0	I	40	5	0	0	NA	7	2+	0
10	M	57	P	Tis,Nx	1	1	DCIS	8	90	linear	G2	0	0	0	0	20	12	0	NA	6	2+	0
11	M	75	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	17	90	papillär	G3	I	0	0	0	30	2	1+	NA	7	2+	0
12	F	62	P	Tis,Nx	1	1	DCIS	13	20	linear	G3	0	0	0	0	30	0	0	NA	0	2+	0
13	F	66	P	Tis,N0	0	1	DCIS	42	90	solid	G3	II	I	II	80	30	0	0	NA	4	2+	0
14	F	51	K	Tis,Nx	0	1	DCIS	8	20	linear	G2	0	0	0	0	10	0	3+	NA	7	2+	0
15	M	51	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	25	10	linear	G3	0	0	0	0	10	0	0	NA	7	2+	0
16	M	61	K	Tis,Nx	0	1	DCIS	45	70	linear	G3	0	0	II	20	40	6	1+	NA	4	2+	0
17	M	64	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	25	80	solid	G3	II	0	II	0	20	1	1+	NA	7	2+	0
18	F	82	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	28	90	solid	G3	II	0	I	20	10	1	1+	NA	7	2+	0
19	M	71	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	16	90	linear	G3	I	0	I	20	20	1	2+	NA	7	2+	0
20	M	34	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	10	90	solid	G3	II	0	I	60	30	2	3+	A	7	2+	0
21	F	58	P	Tis,Nx	1	1	DCIS	15	90	solid	G3	II	II	0	0	10	0	0	NA	7	2+	0
22	F	62	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	22	40	linear	G3	0	0	0	0	20	2	3+	A	7	2+	0
23	F	46	P	Tis,Nx	0	1	DCIS	17	100	linear	G2	0	0	0	0	10	2	3+	-	-	2+	0
24	F	61	P	T1,N1	0	1/2	Adeno	27	50	linear	G3	0	0	0	0	10	8	1+	NA	7	2+	0
25	F	61	S	T1,Nx	0	1/2	Adeno	45	20	linear	G3	0	0	0	0	10	12	0	NA	7	2+	0

Sex, Geschlecht; Lok, Lokalisation; P, Glandula Parotis; S, Glandula Submandibularis; K, kleine Speicheldrüsen; T, Tränendrüse; Prim, primäres pleomorphes Adenom; Rez, rezidiertes pleomorphes Adenom; ID, intraduktales CEPA; ICI, intrakapsuläres invasives CEPA; Ca-Typ, Karzinomtyp; DCIS, duktales Karzinom in situ; Adeno, Adenokarzinom; 0, negativ; I, schwach positiv; II, stark positiv -, nicht auswertbar; p53 IH: 0 - 12 Punkte; Her2Neu IH: 0 - 3+; Her2Neu FISH: A, Amplifiziert, NA, nicht amplifiziert; Androgenrezeptor : 0 - 8 Punkte; CK18/7/14: 1+,2+; gelb, positive Werte; rosa, CEPA mit einem linearen Wachstumsmuster; grün, CEPA mit einem soliden Wachstumsmuster; blau, CEPA ex rezidiertem PA;

Tabelle 2. Extrakapsulär-invasives CEPA

Fall	Sex	Alter	Lok.	pTNM	Prim (0) Rez (1)	ID (1) ICI (2) EC (3)	Ca-Typ	Größe PA in mm	CEPA in % von PA	intraduktales/intrakapsuläres Karzinom										extrakapsulär / invasives Karzinom									
										Wachstumstyp	Grad	Komedonekrose	Verkalzung	Sklerose	Devitalisierung in %	Ki67 in %	p53 IH	Her2Neu IH	Androgenrezeptor	CK18/7	CK14	Grad	Tiefe in mm	Ki67 in %	p53 IH	Her2Neu IH	Androgenrezeptor	CK18/7	CK14
26	M	65	P	T1,N0	0	1/3	Adeno	14	80	solid	G3	I	0	II	30	20	12	2+	8	1+	0	G3	1	-	-	-	-	-	-
27	M	62	P	T1,N2b	0	1/2/3	Adeno	32	70	solid	G3	I	I	II	30	30	0	3+	8	3+	0	G3	1	-	-	-	-	-	-
28	M	60	P	T1,N0	0	1/2/3	Undiff	18	90	solid	G3	II	I	II	60	20	12	3+	8	2+	0	G3	2	-	-	-	-	-	-
29	M	51	P	T1,Nx	0	1/2/3	Adeno	18	20	solid	G3	II	I	II	70	-	-	-	8	2+	0	G3	3	20	6	-	0	1	1
30	M	56	P	T1,Nx	0	1/2/3	Undiff	9	20	solid	G3	-	I	II	90	-	-	-	0	3+	0	G3	5	-	-	-	-	3+	0
31	F	74	P	T3,N2b	0	1/2/3	Undiff	19	70	solid	G3	II	0	II	60	40	12	0	0	3+	0	G3	8	40	12	0	0	3+	0
32	F	71	S	T1,N2b	1	1/2/3	Adeno	13	50	solid	G3	-	-	II	90	-	-	-	-	-	-	G3	9	30	12	3+	0	3+	0
33	F	67	P	T4a,N0	0	1/2/3	Undiff	7	100	solid	G3	II	II	II	90	-	-	-	-	-	-	G3	10	40	0	3+	8	3+	0
34	M	59	P	T2,N2b	0	1/2/3	Undiff	21	70	solid	G3	I	0	II	60	30	0	0	0	3+	0	G3	13	20	0	3+	5	1+	0
35	F	47	P	T2,N2	0	2/3	Undiff	17	-	-	G3	0	0	II	90	-	-	-	-	-	-	G3	14	-	-	-	-	-	-
36	F	73	P	T4a,N2b	0	1/2/3	Undiff	20	40	solid	G3	II	I	II	70	20	0	3+	5	1+	0	G3	15	20	0	3+	3	0	0
37	M	72	P	T4a,N2b	0	1/2/3	Undiff	43	80	solid	G3	II	I	II	30	20	12	1+	8	0	2+	G3	15	-	-	-	-	-	-
38	F	61	S	T4a,N1	1	1/3	Sal duct	8	90	linear	G3	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	G3	15	-	-	-	-	-	-
39	M	57	P	T2,N1	1	3	Sal duct	2	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G3	15	40	12	2+	7	2+	0
40	F	86	P	T2,N2	0	1/2/3	Undiff	17	100	solid	G3	I	II	II	80	-	9	3+	0	2+	0	G3	20	-	9	3+	0	2+	0
41	M	56	P	T3,Nx	1	3	Sal duct	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G3	22	10	0	3+	6	2+	0
42	F	35	S	T3,N2c	1	1/2/3	Undiff	12	100	solid	G3	II	I	II	50	-	-	-	-	-	-	G3	24	20	4	3+	6	0	1+/2+
43	M	32	P	T4a,N2b	0	1/2/3	Undiff	28	30	solid	G3	II	II	II	80	70	12	3+	6	3+	0	G3	70	70	12	3+	6	3+	0
44	F	85	P	T3,N0	1	3	Car Sar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G3	100	10	9	0	0	0/1+	0/1+
45	M	56	P	T4a,Nx	0	1/2/3	Car Sar	60	90	solid	G3	II	I	II	60	40	12	0	5	3+	0	G3	120	40	12	0	5	3+	0
46	F	47	P	T4a,N0	0	1/2/3	Pe Ca	-	0	solid	G3	-	I	II	90	-	-	-	-	0/1+	2+	G3	18	50	6	0	0	0/1+	2+
47	M	61	T	T1,Nx	0	1/2/3	Adeno	12	20	solid	G3	II	II	II	80	5	0	3+	7	2+	0	G3	7	5	0	3+	8	2+	0

Fall	Sex	Alter	Lok.	pTNM	Prim (0) Rez. (1)	ID (1) ICI (2) EC (3)	Ca-Typ	Größe PA in mm	CEPA in % von PA	Wachstumstyp	Grad	Komedonekrose	Verkalkung	Sklerose	Devitalisierung in %	Ki67 in %	p53 IH	Her2Neu IH	Androgenrezeptor	CK18/7	CK14	Grad	Tiefe in mm	Ki67 in %	p53 IH	Her2Neu IH	Androgenrezeptor	CK18/7	CK14
48	M	69	K	T3,Nx	0	1/2/3	Undiff	13	60	solid	G3	II	I	II	60	40	12	3+	0	2+	0	G3	14	70	12	3+	3	2+	0/1+
49	M	49	P	T4a,N1	0	1/2/3	Undiff	20	80	solid	G3	II	I	II	70	40	-	-	8	1+	1+	G3	7	20	2	-	-	2+	0/1+
50	M	53	P	T3,N1	0	1/2/3	Undiff	10	90	solid	G3	I	0	II	80	30	1	3+	8	3+	0	G3	16	20	12	3+	8	3+	0
51	M	48	P	T4,N2	0	1/2/3	Undiff	11	0	solid	G3	II	II	II	90	10	-	-	-	-	0	G3	>40	10	12	3+	8	1+/2+	0
52	M	70	P	T2,Nx	0	1/2/3	Undiff	15	100	solid	G3	II	II	II	90	20	0	3+	7	2+	0	G3	>4	40	-	-	-	-	-
53	M	74	P	T3,N0	1	2/3	Sal duct	-	-	solid	G3	-	I	II	70	-	-	-	0	2+	0	G3	>30	70	0	0	7	0	0
54	F	73	S	T3,pN2b,	0	2/3	Sal duct	11	80	solid	G3	II	II	II	60	30	0	3+	0	2+	0	G3	9	30	0	3+	0	2+	0
55	M	74	P	T4a,N2b	1	1/2/3	Sal duct	14	100	solid	G3	I	I	II	80	30	12	3+	8	1+	0	G3	9	40	12	3+	8	1+	0
56	F	72	K	T2,Nx	1	3	Car Sar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G3	10	3	0	0	0	0	0/1+
57	F	57	P	T1,Nx	0	1/2/3	Pe Ca	19	90	squamös	G2	II	-	-	10	3	2	0	0	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	
58	M	70	P	T1,Nx	0	1/2/3	Sal duct	13	80	solid	G3	II	I	II	50	20	0	3+	8	2+	0	G3	5	10	0	3+	8	2+	0
59	M	89	P	T4,Nx	0	1/2/3	Adeno	35	90	solid	G3	II	II	II	40	-	-	0	-	0	2+	G3	16	10	2	0	6	0	1+

Sex, Geschlecht; Lok, Lokalisation; P, Glandula Parotis; S, Glandula Submandibularis; K, kleine Speicheldrüsen; T, Tränenrüse; Prim, primäres pleomorphes Adenom; Rez, rezidiertes pleomorphes Adenom; ID, intraduktales CEPA; ICI, intrakapsuläres invasives CEPA; Ca-Typ, Karzinomtyp; DCIS, duktales Karziom in situ; Adeno, Adenokarzinom; Undiff, Undifferenziertes Karzinom; Sal duct, Speichelgangkarzinom; Pe Ca, Plattenepithelkarzinom; Car Sar, Carzinosarkom; 0, negativ; I, schwach positiv; II, stark positiv; -, nicht auswertbar; p53 IH: 0 - 12 Punkte; Her2Neu IH: 0 - 3+; Her2Neu FISH: A, Amplifiziert, NA, nicht amplifiziert; Androgenrezeptor : 0 - 8 Punkte; CK18/7/14: 1+,2+,* , die kleine intrakapsulär-invasive Tumorkomponente erlaubt keine Karzinomtypisierung; gelb, positive Werte; rosa, CEPA mit einem linearen Wachstumsmuster; grün, CEPA mit einem soliden Wachstumsmuster; blau, CEPA ex rezidiertem PA

Tabelle 4. Gegenüberstellung der Ergebnisse der rein intraduktalen und extraduktal-intrakapsulären CEPA im Bezug auf ihr Wachstumsmuster

	Lineares Wachstumsmuster	Solides Wachstumsmuster
Grading	G2: 35,3% (6/17) G3: 64,7% (11/17)	G3: 100% (8/8)
Komedonekrosen	0% (0/17)	87,5% (7/8)
Interstitielle Sklerose	11,8% (2/17)	37,5% (3/8)
Ki67	10 – 20% (16,7%)	20 – 30% (23,8%)
p53	35,3% (6/17)	25% (2/8)
Her2Neu	23,5% (4/17)	50% (4/8)
Androgenrezeptor	93,8% (15/16)	87,5% (7/8)

Tabelle 5. Gegenüberstellung der rein intrakapsulären CEPA und der extrakapsulär invasiven CEPA hinsichtlich ihrer immunhistologischen und molekularpathologischen Ergebnisse

	Intraduktales CEPA	Extraduktal-invasives CEPA
Ki67	15 – 25% (19%)	20 – 30% (26,9%)
p53	32%	50%
Her2Neu	32%	65,2%
Androgenrezeptor	88%	66,7%

Tabelle 6. Intraduktales CEPA: Aneinanderreihung von Argumenten, die für eine obligate Vorform des intraduktalen CEPA sprechen

Große Prävalenz in allen Stadien des CEPA
Große Anzahl an rein intraduktalen Fällen
Gemeinsamer Vorläufer aller Stadien des invasiven CEPA (exklusive der myoepithelialen CEPA)
Molekulare Alterationen im Frühstadium des rein intraduktalen CEPA
Sehr ähnliche Ergebnisse in CEPA ex primären PA und CEPA ex rezidierten PA
Große Ähnlichkeit zu intraduktalen Karzinomen anderer Organe (z.B. Mamma-Karzinom)

4.1. Lokalisation

Die vom CEPA am häufigsten betroffene Drüse ist die Glandula Parotis gefolgt von der Glandula Submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen. In 55 von 74 Fällen ist die Glandula Parotis betroffen, gefolgt von der Glandula Submandibularis mit 11 Fällen, den kleinen Speicheldrüsen mit 6 Fällen und der Tränendrüse mit 2 Fällen. (Diagramm 1)

Während die Gruppe der rein intraduktalen-intrakapsulären CEPA (Diagramm 2) und die Gruppe der extrakapsulären-invasiven CEPA (Diagramm 3) diesem Verteilungsschema entsprechen, weicht die Gruppe der myoepithelialen CEPA (Diagramm 4) davon ab. Beim myoepithelialen Kollektiv sind die Glandula Submandibularis und die Glandula Parotis gleich häufig betroffen.

Lokalisation des CEPA beim gesamten Patientenkollektiv

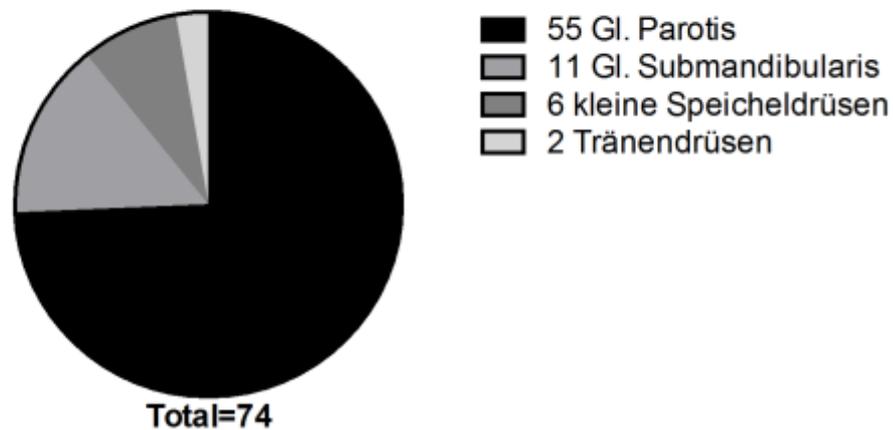


Diagramm 1

Lokalisation des CEPA beim intraduktal-intrakapsulären Patientenkollektiv

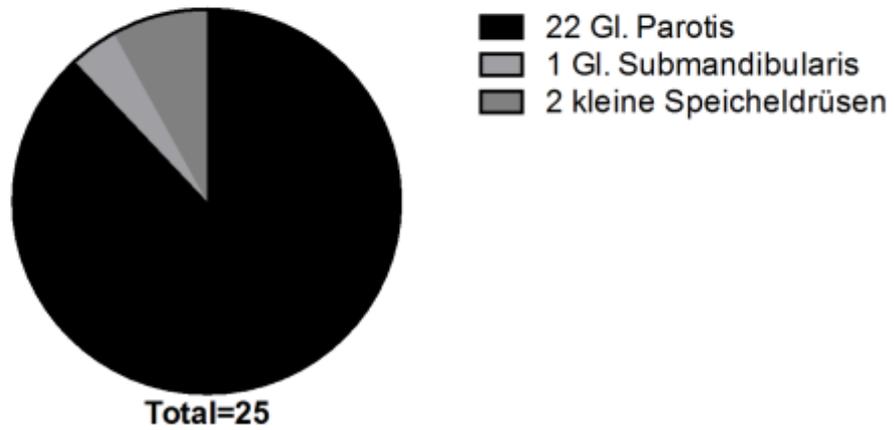


Diagramm 2

Lokalisation des CEPA beim extrakapsulär-invasiven Patientenkollektiv

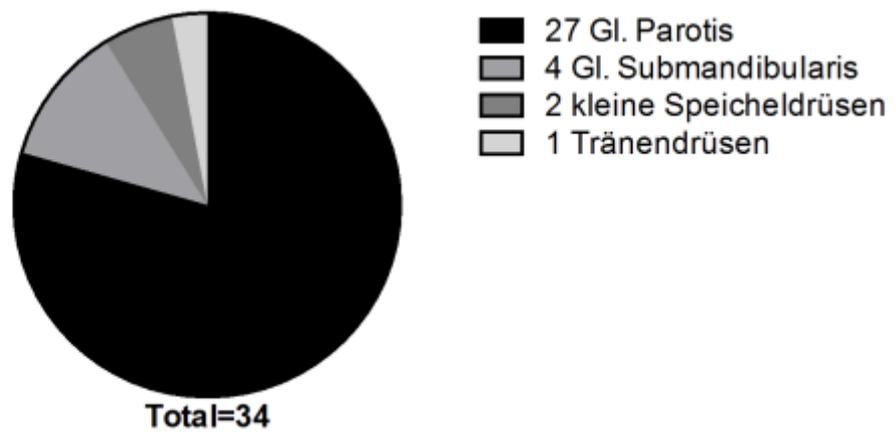


Diagramm 3

Lokalisation des CEPA beim myoepithelialen Patientenkollektiv

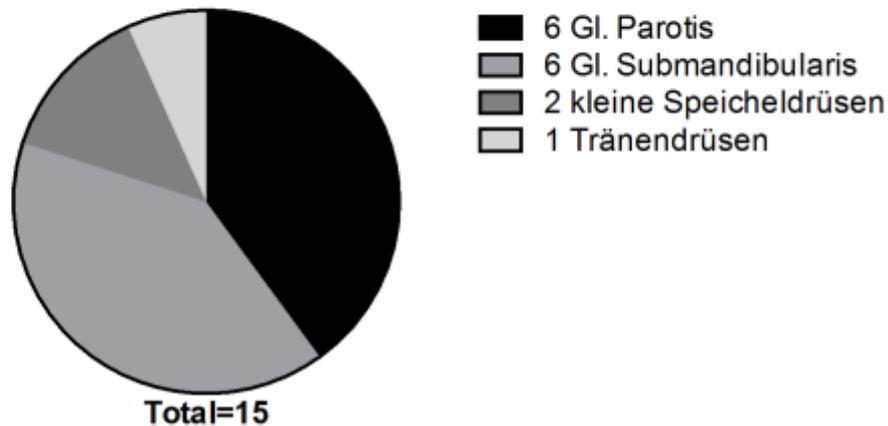


Diagramm 4

4.2. Intraduktales CEPA

Von den insgesamt 25 untersuchten Fällen der ersten Gruppe (rein intraduktales und extraduktal-intrakapsuläres CEPA) weisen alle eine intraduktales Komponente auf (100%). 23 dieser Fälle haben eine rein intraduktales Komponente ohne jegliche Anzeichen eines intrakapsulär-invasiven Anteils (23/25, 92%). Das intraduktales Karzinom nimmt flächenmäßig zwischen 10% und 100% des pleomorphen Adenoms ein, wobei es zellarme myxoide und/oder chondroide Areale des pleomorphen Adenoms in der Regel ausspart.

Das intraduktales Karzinom lässt sich bezüglich seines Wachstumstyps in 3 Gruppen einteilen: linear, solid und papillär. (Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8). Die linearen Fälle machen 16 der 25 Fälle aus (64%). Ein Fall (1/25, 4%) hat ein papilläres Wachstumsmuster. Er wird in der vorliegenden Arbeit der linearen Gruppe zugerechnet. Die linearen Fälle weisen keine signifikante intraduktales zelluläre Expansion auf.

Abb. 6: Intraduktales CEPA mit linearem Wachstumsmuster – HE-Färbung

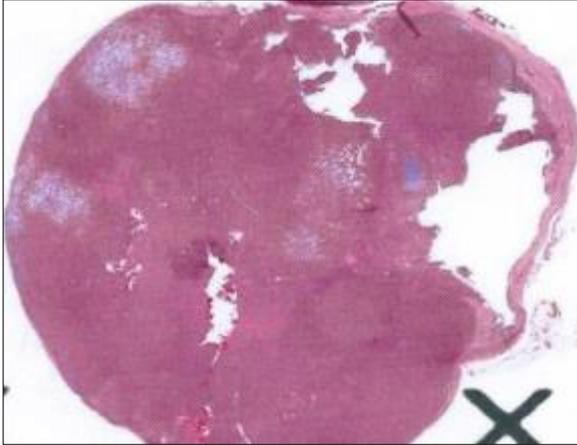
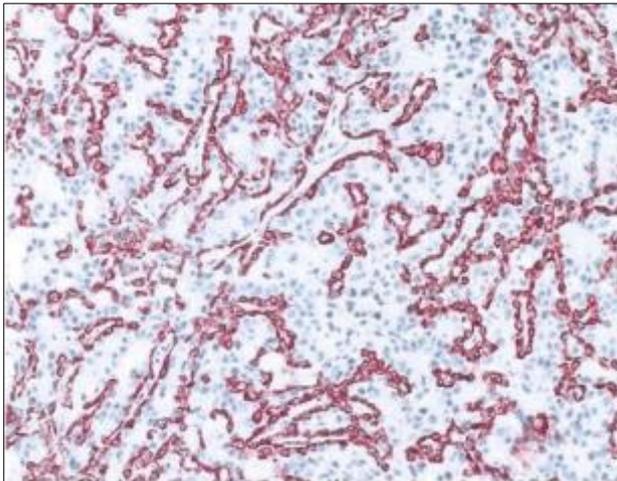
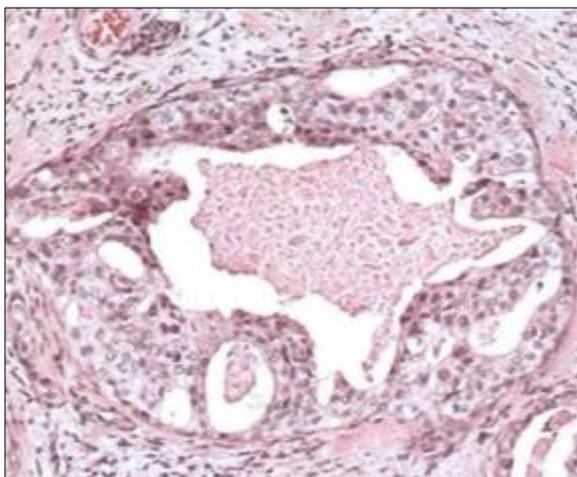


Abb. 7: Intraduktales CEPA mit linearem Wachstumsmuster – CK 14 Färbung



Die äußeren benignen Myoepithelialzellen werden durch CK14 hervorgehoben.

Abb. 8: Intraduktales CEPA mit solidem Wachstumsmuster – HE-Färbung



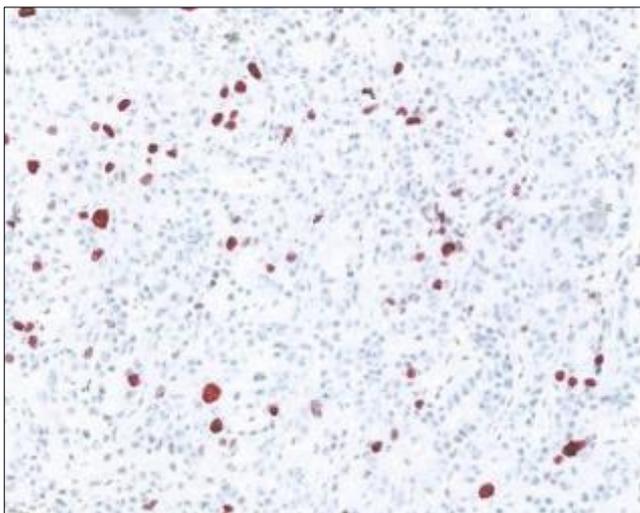
Die linearen Fälle sind entweder mäßig – G2 (6/17, 35,3%) oder „high grade“ – G3 (11/17, 64,7%) differenziert. Die linearen Fälle zeigen generell keine Komedonekrosen und lassen nur in 2 Fällen (2/17, 11,8%) hochgradige interstitielle Sklerosierungen erkennen. Beim linearen CEPA nehmen die maligne transformierten Duktalzellen 10-100 Prozent des Areals des pleomorphen Adenoms ein. Die Größe des maligne transformierten PA-Knotens beträgt zwischen 8 und 45mm (Ø = 21,1mm).

8 intraduktale Fälle haben einen soliden Wachstumstyp (8/25, 32%) (Fig. 7). Bei ihnen tritt eine signifikante zelluläre Expansion auf. Die soliden Fälle sind alle (100%) high-grade (G3) und weisen häufig Komedonekrosen auf (7/8, 87,5%). 2 der 8 soliden Fälle zeigen starke intraduktale Verkalkungen (2/8, 25%) und 3 sind interstitiell hochgradig sklerosiert (3/8, 37,5%).

Die transformierten Zellen des soliden CEPA nehmen zwischen 50-100 Prozent der Fläche des pleomorphen Adenoms ein, die Größe des maligne transformierten PA-Knotens beträgt zwischen 10 und 42mm (Ø = 26,5mm)

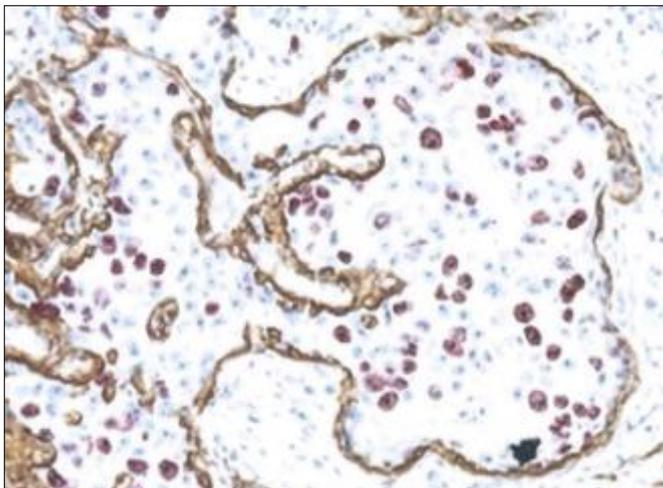
Die Auswertung der immunhistologischen Marker zeigt, dass die zelluläre Proliferation (Ki67) des intraduktalen Karzinoms gegenüber dem PA erhöht ist und einen Wert zwischen zwischen 5 und 40 Prozent beträgt. Die durchschnittliche Proliferation beträgt im rein intraduktalen CEPA im Mittel 20-30% Ki67. (Abb. 9, Abb. 10).

Abb. 9: Intraduktales CEPA mit linearem Wachstumsmuster – Ki67 Färbung



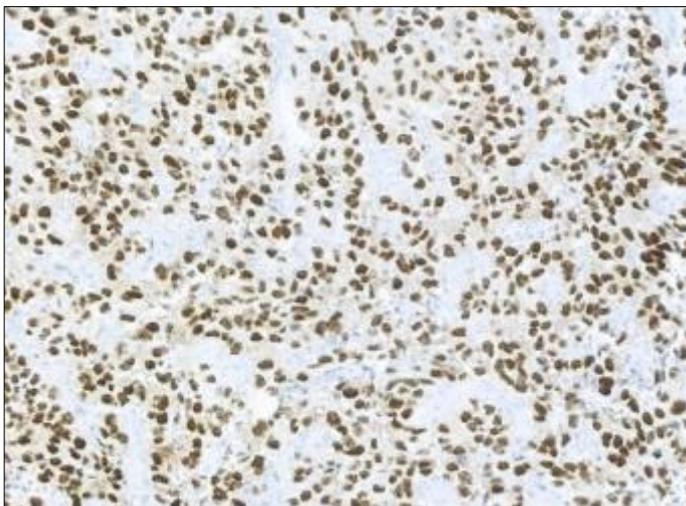
Die atypisch proliferierenden Karzinomzellen sind durch Ki67 rot markiert.

Abb. 10: Intraduktales CEPA mit solidem Wachstumsmuster – Doppelfärbung CK14 (braun) + Ki67 (rot)



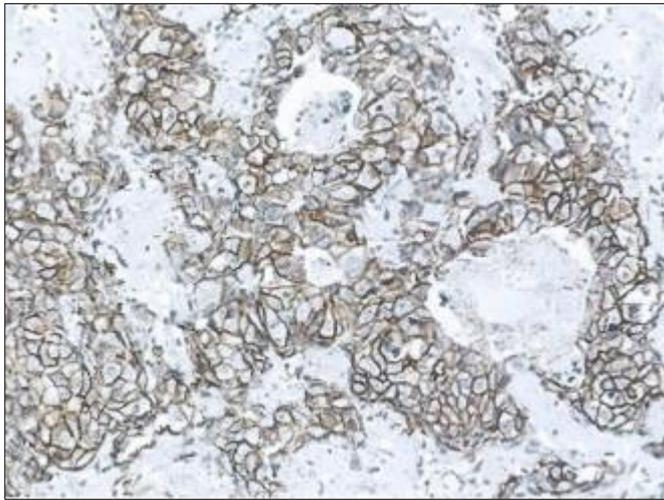
Die p53 induzierte Kernfärbung wird in 8 der 25 Fälle als positiv gewertet (8/25, 32%)(Abb. 11).

Abb. 11: Intraduktales CEPA mit linearem Wachstumsmuster – p53 Färbung (nur positiv in den intraduktalen, atypischen Zellen)



Bei der immunhistologischen Auswertung von Her2Neu sind 10 der 25 Fälle (10/25, 40%) positiv (Abb.12). Mit FISH sind 7 der 23 Fälle (7/23, 30,4%) positiv. In einem der 23 Fälle (1/23, 4,3%) ist die Immunhistologie von Her2Neu positiv, die FISH Analyse negativ. Weder eine positive noch eine negative Korrelation kann zwischen p53 und Her2Neu gezeigt werden.

Abb. 12: intraduktales CEPA mit solidem Wachstumsmuster – Her2Neu Färbung (positiv in den luminalen atypischen Zellen)



Die Werte des Androgenrezeptors sind in 23 der 25 Fälle positiv (23/25, 92%).

Die immunhistologischen Ergebnisse zeigen nur geringe Unterschiede zwischen linearem und solidem CEPA (siehe Tabelle 4).

Zwei der 25 Fälle zeigen sowohl intraduktales als auch intrakapsulär-invasive Anteile eines CEPA. In beiden Fällen sind die intrakapsulär-invasiven Anteile gering.

Bei der Auswertung der Ergebnisse von CEPA ex primärem versus ex rezidiertem PA sind außer der Größe des maligne transformierten PA-Knotens keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. (CEPA ex primärem PA= Ø 24,3mm, CEPA ex rezidiertem PA= Ø 12mm)

4.3. Extrakapsulär-invasives CEPA

Von den insgesamt 34 Fällen haben 30 Fälle sowohl eine intraduktales-intrakapsuläre als auch eine extrakapsulär-invasive Komponente. In den restlichen 4 Fällen, die alle aus einem rezidierten pleomorphen Adenom entstanden sind, konnte der transformierte PA Knoten nicht eindeutig identifiziert werden.

Während beim Kollektiv der rein intraduktalen CEPA die Mehrheit (64%) ein lineares Wachstumsmuster aufweist, haben 26 der extrakapsulär-invasiven Fälle ein solides (26/28, 92,9%), nur ein Fall ein lineares (1/28, 3,6%) und ein Fall ein squamöses (1/28, 3,6%) Wachstumsmuster der intraduktalen Karzinomkomponente. Von den soliden Fällen sind alle „high-grade“ - G3- differenziert und weisen häufig Komedonekrosen auf (18/23, 78,3%), wobei in 8 Fällen (8/23, 34,8%) zusätzlich massive intraduktales Verkalkungen erkennbar sind.

Mit Ausnahme eines Falles ist jeder Fall hochgradig sklerosiert (28/29, 96,6%).

Die Ergebnisse der histomorphologischen und immunhistologischen Marker im intraduktalen Anteil des extrakapsulär-invasiven CEPA sind sehr ähnlich zu den Ergebnissen des rein intraduktalen CEPA. Die zelluläre Proliferation (Ki67) der intraduktalen Anteile liegt bei Werten von 5 bis 70 Prozent (Durchschnitt im Mittel 20-30%), die p53 induzierte Kernfärbung ist in 9 von 18 Fällen stark erhöht (9/18, 50%). Positive Werte für Her2Neu weisen 12 von 19 Fällen auf (12/19, 66,7%). Auch hier konnte keine Korrelation zwischen p53 und Her2Neu gefunden werden. Die Werte des Androgenrezeptors sind in 14 der 22 Fällen positiv (14/22, 63,7%).

5. Diskussion

Die Ergebnisse der insgesamt 74 untersuchten Fälle bestätigen die Hypothese, dass es sich beim CEPA um eine Mehrschrittkanzerogenese handelt. Das aus dem benignen pleomorphen Adenom ausgehende Karzinom durchläuft die unterschiedlichen Stadien von rein intraduktal, extraduktal-intrakapsulär bis hin zum extrakapsulär-invasiven CEPA. Diese Prozesse laufen unabhängig davon ab, ob das CEPA aus einem primären pleomorphen Adenom, oder aus einem rezidierten pleomorphen Adenom entstanden ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass das intraduktale Karzinom der Ausgangspunkt für alle histologischen Typen des CEPA ist, mit Ausnahme des myoepithelialen CEPA. Die Hauptargumente, die diese Hypothese stützen sind, dass ohne Einbeziehung der myoepithelialen CEPA, 93,2% der CEPA (55/59) Anteile eines intraduktalen und/oder extraduktal-intrakapsulären Karzinoms haben und die rein intraduktalen Fälle 31,1% aller CEPA (23/74) ausmachen. Das Vorhandensein einer Mehrschrittkanzerogenese kann auch wegen der sehr ähnlichen Ergebnisse der immunhistologischen und molekularen Marker im rein intraduktal-intrakapsulären CEPA und im intraduktalen Anteil des extrakapsulär-invasiven CEPA postuliert werden. Frühere eigene Ergebnisse (11) und andere Studien (1)(3)(7)(10)(13)(23)(24) belegen zudem, dass die Prognose wesentlich durch die unterschiedlichen Progressionsstadien des CEPA bedingt sind. Welche Bedeutung der Tatsache zuzumessen ist, dass die Mehrheit der rein intraduktalen Karzinome ein lineares Wachstum aufweist, wohingegen der intraduktale Anteil der extrakapsulär-invasiven CEPA bis auf einen Fall ein solides Wachstum besitzen ist unklar.

Die oftmals sehr ausgedehnte intraduktale Expansion des Karzinoms innerhalb des PA deutet darauf hin, dass das Stadium der rein intraduktalen Expansion sehr lange andauert bevor

es zu einer Ruptur der Basalmembran kommt und die malignen Zellen beginnen die extraduktale, intrakapsuläre Matrix zu infiltrieren. Im Gegensatz zu dem rein intraduktalen CEPA, welches sich meistens großflächig im pleomorphen Adenom ausbreitet, nimmt das extraduktal-intrakapsuläre CEPA, welches nur in 2 Fällen diagnostiziert wurde, flächenmäßig nur einen geringen Anteil des pleomorphen Adenoms ein. Daraus lässt sich schließen, dass die maligne transformierten Zellen, sobald sie das rein intraduktale Stadium verlassen, vermutlich relativ rasch die PA-Kapsel durchbrechen. Dies könnte eine Erklärung für das Ergebnis der von Félix et al. (24) publizierten Studie sein, in der ein intrakapsuläres CEPA Metastasen gebildet hat. Laut dieser Studie ist nur das intraduktale CEPA nichtinvasiv, da es innerhalb des PA die Möglichkeit gäbe Metastasen zu bilden. Es empfiehlt sich daher die Unterteilung in rein intraduktale CEPA und extraduktal, intrakapsulär-invasive CEPA.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass sowohl CEPA, entstanden aus einem primären PA als auch CEPA aus einem rezidierten PA, initial ein intraduktales Stadium durchlaufen. Da primäre PA in der Mehrzahl viel größer sind als rezidierte PA, hat ein entsprechendes CEPA in diesen Fällen viel mehr Raum und Zeit sich innerhalb der duktaalen Strukturen auszubreiten. Da die transformierten Knoten des rezidierten PA deutlich kleiner sind, könnte man folgern, dass es bei Ihnen zu einer frühzeitigen extrapaksulären Invasion kommt. Stennert et al. (25) postulieren, dass es durch die erschwerte chirurgische Resektion des multiknotig rezidierten PA zu einem späteren Behandlungsbeginn komme, wodurch ein entstehendes CEPA in diesen Fällen mehr Zeit hätte um in das umliegende Gewebe zu infiltrieren. Diese Hypothese wird durch den früheren Nachweis unserer Arbeitsgruppe (11) unterstrichen, nachdem CEPA ex rezidiertes PA eine signifikant schlechtere Prognose zeigen als CEPA ex primäres PA.

In vielen Fällen kann die Diagnose eines intraduktalen Karzinoms innerhalb des pleomorphen Adenoms in HE-Färbungen eindeutig identifiziert werden. In einem Teil der Fälle sind jedoch zusätzliche immunhistologische Färbungen notwendig (vor allem CK14, CK5/6, p63), um die Existenz und Ausdehnung des intraduktalen Charakters eines intrakapsulären CEPA zu belegen. Zur exakten Differenzierung zwischen den Zellen des pleomorphen Adenoms und denen des CEPA sind immunhistochemische Doppelfärbungen sehr hilfreich. Sie ermöglichen eindeutig darzustellen, dass das intraduktale Karzinom aus luminalen Zellen der duktaalen Struktur des PA entstehen. Dies ist besonders interessant, da diese Zellen innerhalb der meisten PA einen quantitativ untergeordneten Stellenwert haben und dennoch für die Entstehung eines CEPA maßgeblich verantwortlich sind (3)(11)(26)(27).

Das intraduktale Karzinom zeigt eine hohe Prävalenz für molekulare Veränderungen, wie eine erheblich erhöhte p53 Akkumulation in 32% der Fälle (8/25) (bei Ihrler et al. 2007 (4) Mutation des p53 –Gens in 33%), eine Her2Neu Expression in 32% der Fälle (8/25) und eine

Androgenrezeptorexpression in 88% der Fälle (22/24) . Die Bedeutung einer Mutation des p53 Gens im Zusammenhang mit der malignen Transformation des PA zum CEPA wurde in mehreren Studien belegt (28)(29)(30)(31). Der Zusammenhang der p53 Genmutation und die immunhistologische Akkumulation des p53 Proteins wird durch komplexe genetische, epigenetische und technische Gründe beeinflusst (32). Während ein Drittel (32%) der rein intraduktalen CEPA in unserer Studie positive Werte für p53 aufweist, exprimiert die Hälfte (50%) der extrakapsulär invasiven CEPA stark positive Werte für p53. Frühere eigene Untersuchungen an Teilen des vorliegenden rein intraduktalen Patientenkollektivs weisen eine Mutation des p53 Gens bei 5 Fällen nach (5/15, 33,3%)(4). 6 der 10 Fälle (6/10, 60%), welche keine p53 Mutation aufwiesen, zeigten eine deutliche Zunahme des p53 Proteins. Das dysfunktionale p53 Gen trat generell schon bei den intraduktalen CEPA auf. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation des p53 Gens ein wichtiger Faktor bereits während der ersten Entwicklungsphase des CEPA aus dem PA ist.

Die vorliegende Studie kann erstmals 2 unterschiedliche Wachstumstypen des intraduktalen Vorstadiums des CEPA differenzieren. CEPA, die ein lineares Wachstum aufweisen, haben keine Anzeichen einer zellulären Expansion, sind mäßig bis niedrig differenziert, weisen keine Komedonekrosen auf und sind selten oder geringfügig sklerosiert. CEPA, die ein solides Wachstum aufweisen, haben eine signifikante zelluläre Expansion, sind generell niedrig differenziert und weisen häufig Komedonekrosen, interstitielle Sklerosen und Devitalisierungen auf (Tabelle 1,2,3,4). Das Wachstumsmuster des CEPA weist somit Parallelen zum Wachstumsmuster des intraduktalen Mammakarzinoms auf, bei dem zwischen linearem-mikropapillärem und solidem Typ unterschieden wird (19). Diese 2 Typen des intraduktalen CEPA weisen keine wesentlichen Unterschiede betreffend den molekularen Veränderungen auf.

Zusammenfassend belegt unsere Untersuchung, dass das Prinzip eines rein intraduktalen, präinvasiven Karzinoms, welches bereits in diversen anderen Karzinomen wie z.B. beim Mammakarzinom, etabliert ist und vor kurzem auch bei anderen Speicheldrüsenkarzinomen, wie dem Speichelgangkarzinom und dem Speicheldrüsenadenokarzinom publiziert wurde (13) auch beim CEPA zutreffend ist.

Die hier vorgestellte Untersuchung an 74 Fällen eines CEPA ist von der Fallzahl größer als jede bislang international publizierte Arbeit über CEPA. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden kürzlich von unserer Arbeitsgruppe als englischsprachige Publikation für die Zeitschrift *Histopathology* eingereicht; die Arbeit befindet sich aktuell im Review-Prozess (33). Zudem wurde unsere Arbeitsgruppe in der Person von Prof. Stephan Ihrler kürzlich von der WHO zur

Mitarbeit an der neuen WHO-Klassifikation von Kopf- und Hals-Tumoren eingeladen und hat das Kapitel 7-20, Carcinoma ex pleomorphic adenoma mitbearbeitet (34).

Literaturverzeichnis:

1. Di Palma S, Skálová A, Vanièek T, Simpson RHW, Stárek I, Leivo I. Non-invasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal carcinoma by HER-2/neu and MIB1 immunohistochemistry. *Histopathology* [Internet]. 2005 Feb [cited 2016 Jun 29];46(2):144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15693886>
2. Seifert G. Histological Classification of Salivary Gland Tumours. In: *Histological Typing of Salivary Gland Tumours* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1991 [cited 2016 Jul 16]. p. 9–10. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-84506-2_2
3. Auclair PL, Ellis GL. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. *Mod Pathol* [Internet]. 1996 Jun [cited 2016 Jun 29];9(6):652–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782203>
4. Ihrler S, Weiler C, Hirschmann A, Sendelhofert A, Lang S, Guntinas-Lichius O, et al. Intraductal carcinoma is the precursor of carcinoma ex pleomorphic adenoma and is often associated with dysfunctional p53. *Histopathology* [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Jun 29];51(3):362–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593217>
5. Skálová A, Stárek I, Vanecek T, Kucerová V, Plank L, Szépe P, et al. Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* [Internet]. 2003 Apr [cited 2016 Jun 29];42(4):348–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12653946>
6. Antony J, Gopalan V, Smith RA, Lam AKY. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a comprehensive review of clinical, pathological and molecular data. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Jun 29];6(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744105>
7. LiVolsi VA, Perzin KH. Malignant mixed tumors arising in salivary glands. I. Carcinomas arising in benign mixed tumors: a clinicopathologic study. *Cancer* [Internet]. 1977 May [cited 2016 Jun 29];39(5):2209–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/192443>

8. Tortoledo ME, Luna MA, Batsakis JG. Carcinomas ex pleomorphic adenoma and malignant mixed tumors. Histomorphologic indexes. Arch Otolaryngol [Internet]. 1984 Mar [cited 2016 Jun 29];110(3):172–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6322732>
9. Brandwein M, Huvos AG, Dardick I, Thomas MJ TN. Noninvasive and minimally invasive carcinoma ex mixed tumor: a clinicopathologic and ploidy study of 12 patients with major salivary tumors of low (or no?) malignant potential. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996 Jun;81(6):655-64.
10. Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. Histopathology [Internet]. 2005 Jun [cited 2016 Jun 29];46(6):635–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910594>
11. Weiler C, Zengel P, van der Wal JE, Guntinas-Lichius O, Schwarz S, Harrison JD, et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma with special reference to the prognostic significance of histological progression: a clinicopathological investigation of 41 cases. Histopathology [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Jun 29];59(4):741–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22014054>
12. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Malignant mixed tumor of salivary origin: a clinicopathologic study of 146 cases. Cancer [Internet]. 1977 Feb [cited 2016 Jun 29];39(2):388–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/189890>
13. Lewis JE, Olsen KD ST. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. Hum Pathol 2001 Jun;32(6):596-604.
14. Böcker W (Werner), Heitz PU. Pathologie.
15. <http://www.pathologen-luebeck.de/methoden-in-der-pathologie/antikoerper/>. 2015.
16. Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Santa Clara Singapur Tokio Seifert Oralpathologie I BG, Doerr W, Seifert Professor Seifert GG. Springer. Gerhard Seifert] -Berlin New York ; Barcelona; Budapest ; Hongkong; London ; Mail ; Paris; St Cl ; Singapur. 1(1).
17. Rummele W SH. Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis im Mammakarzinomgewebe. Pathologie 8 (1987), 138-140. Pathologie. 1987;
18. Hashimoto K, Yamamoto H, Shiratsuchi H, Nakashima T, Tamiya S, Nishiyama K, et al. HER-2/neu gene amplification in carcinoma ex pleomorphic adenoma in relation to progression and prognosis: a chromogenic in-situ hybridization study. Histopathology [Internet]. 2012 May [cited 2016 Jun 29];60(6B):E131–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486195>

19. Di Palma S, Simpson RHW, Marchiò C, Skálová A, Ungari M, Sandison A, et al. Salivary duct carcinomas can be classified into luminal androgen receptor-positive, HER2 and basal-like phenotypes. *Histopathology* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Jun 29];61(4):629–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882517>
20. Hammond MEH, Hicks DG. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing Clinical Practice Guideline Upcoming Modifications: Proof That Clinical Practice Guidelines Are Living Documents. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Jul 16];139(8):970–1. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2015-0074-ED>
21. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Jul 16];138(2):241–56. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2013-0953-SA>
22. Allred scoring system [Internet]. [cited 2016 Feb 17]. Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Allred+scoring+system>">Allred scoring system
23. Gnepp DR. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathol Annu* [Internet]. 1993 [cited 2016 Jun 29];28 Pt 1:279–328. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380049>
24. Felix A, Rosa-Santos J, Mendonça ME, Torrinha F SJ. Intracapsular carcinoma ex pleomorphic adenoma. Report of a case with unusual metastatic behaviour. *Oral Oncol* 2002 Jan;38(1)107-10.
25. Stennert E, Wittekindt C, Klassemann JP, Arnold G G-LO. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: a prospective histopathological and immunohistochemical study. *Laryngoscope*. 2004;
26. Di Palma S. Carcinoma ex pleomorphic adenoma, with particular emphasis on early lesions. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2016 Jun 29];7 Suppl 1:S68–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821206>
27. Griffith CC, Thompson LDR, Assaad A, Purgina BM, Lai C, Bauman JE, et al. Salivary duct carcinoma and the concept of early carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Histopathology* [Internet]. 2014 Dec [cited 2016 Jun 29];65(6):854–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804831>
28. Righi PD, Li YQ, Deutsch M, McDonald JS, Wilson KM, Bejarano P, et al. The role of the p53 gene in the malignant transformation of pleomorphic adenomas of the parotid gland.

- Anticancer Res [Internet]. [cited 2016 Jun 29];14(5B):2253–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840532>
29. Yamamoto Y, Kishimoto Y, Wistuba II, Virmani AK, Vuitch F, Gazdar AF, et al. DNA analysis at p53 locus in carcinomas arising from pleomorphic adenomas of salivary glands: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int* [Internet]. 1998 Apr [cited 2016 Jun 29];48(4):265–72. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9648154>
 30. Rosa JC, Fonseca I, Félix A, Soares J. Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Histopathology* [Internet]. 1996 Mar [cited 2016 Jun 29];28(3):247–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8729044>
 31. El-Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna MA, Batsakis JG. Molecular genetic alterations in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a putative progression model? *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2000 Feb [cited 2016 Jun 29];27(2):162–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612804>
 32. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2002 [cited 2016 Jul 16];4(2):70–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879567>
 33. Stephan Ihrler, Orlando Guntinas-Lichius, Abbas Agaimy, Agnes, Wolf, Martin Mollenhauer. Intraductal precursor of carcinoma ex pleomorphic adenoma: Histological, immunohistological, and molecular characterization of a multistep carcinogenesis in 85 cases , eingereicht (Stand 2016.07.21)
 34. Williams Michelle D., Ihrer Stephan SR. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors, 7-20: Carcinoma ex pleomorphic adenoma (specify malignant component). El-Naggar Adel K., editor. befindet sich im Druck (Stand 2016.07.21)

Danksagung

Das Verfassen dieser Doktorarbeit war für mich ein intensiver und anstrengender Lernprozess, der auch meine persönliche Entwicklung positiv beeinflusst hat. Sie stellt den Abschluss eines sehr interessanten, lehrreichen, manchmal aber auch schwierigen Lebensabschnittes in Deutschland dar. Als Österreicherin, die erst 1 Jahr vor ihrem Abitur erfuhr, dass sie wahrscheinlich nicht zu Hause in Wien Zahnmedizin studieren wird können, möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die mich so liebevoll und nett in dem „fremden“ Land aufgenommen haben und mich von Anfang an freundschaftlich unterstützten. Dadurch sind das anfängliche Heimweh und die Trauer ob des Abschiedes von vertrauten Freunden und Bekannten rasch verfliegen und ich konnte mich bald in die neue Kultur und Lebensart einfügen, lernte viele Freundinnen und Freunde kennen, was für mich eine große Bereicherung bedeutete.

Bei der Suche nach einem Thema für die Doktorarbeit stieß ich auf Prof. Dr. Stephan Ihrler vom Pathologischen Institut der medizinischen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität zu München, der mit seinen spannenden und kurzweiligen Vorlesungen mein Interesse für Histologie weckte. Ich möchte mich sehr herzlich bei ihm bedanken, dass er sich nach anfänglicher kurzer Skepsis gegenüber „ÖSIS“ doch auf mich eingelassen hat. Mit großer Geduld und großem Einsatz hat er mich gelehrt, wie eine wissenschaftliche Arbeit geplant und durchgeführt wird, hat beharrlich meine „Absatzkultur“ verändert, nahm sich viel Zeit für mich und ließ mich nie lange auf Korrekturen warten. Sehr geschätzt habe ich sein kollegiales Verhalten, durch das ich mich immer sehr ernstgenommen gefühlt habe, wodurch das Interesse am Thema der Arbeit ständig stieg und das Schreiben der Arbeit mir bis zum Schluss Freude bereitete .

Mein Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der medizinischen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität zu München die mich bei der Aufbereitung der histologischen Präparate unterstützt haben.

Nur so war es mir möglich, mein Studium mit dieser wertvollen Arbeit abzuschließen.

Vielen, vielen Dank!

Wien am 13.7.2016

Eidesstattliche Versicherung

Wolf, Agnes

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Intraduktales Frühstadium des Karzinoms ex pleomorphes Adenom: Histologische, immunhistologische und molekularpathologische Charakterisierung in 74 Fällen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wien, 21.07.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand