

Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Direktor: Prof. Dr. Rainald Knecht

**Rad51 als Prognosefaktor für das Überleben  
von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren:  
- Eine immunhistochemische Studie -**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

**Nicole Klein, geb. Mahler**

aus Aschersleben

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 23.04.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. R. Knecht

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. G. Rune

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. K. Borgmann

Gewidmet meinen Eltern Dietmar und Angelika Mahler

## Inhaltsverzeichnis:

	Abkürzungsverzeichnis	5
<hr/>		
	Abbildungsverzeichnis	6
<hr/>		
	Tabellenverzeichnis	8
<hr/>		
1	Einleitung	10
<hr/>		
1.1	Allgemeine Beschreibung von Kopf-Hals-Tumoren	10
1.2	Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren	11
1.3	Therapie	15
1.3.1	Chirurgische Therapie	15
1.3.2	Radiotherapie	16
1.3.3	Chemotherapie	17
1.3.4	Radiochemotherapie	17
1.3.5	Induktionschemotherapie	18
1.4	Prognose von Kopf-Hals Tumoren	19
1.5	Rad51	20
1.6	p53	21
1.7	Ki67	24
1.8	Tissue Microarrays (TMA)	26
1.8.1	Entwicklung der Tissue Microarray-Technik	26
1.8.2	Prinzip der Tissue-Microarray-Technik	28
1.8.3	Anwendungsgebiete der Tissue-Microarray-Technik	29
1.9	Zielsetzung	32
2	Material und Methoden	33
<hr/>		
2.1	Patientenkollektiv	33
2.2	TMA-Herstellung	33
2.3	Immunhistochemie	35
2.3.1	Manuelle Vorbereitung	35
2.3.2	Entparaffinisierung	36
2.3.3	Färbeprotokoll	36
2.4	Statistische Auswertung	38
2.4.1	SPSS	39
2.4.2	Kaplan-Meier-Schätzer	39
2.4.3	Log-Rank-Test	41
3	Ergebnisse	42
<hr/>		
3.1	Patientenkollektiv	42
3.2	Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Rad51-Expression	46
3.3	Überlebenszeitanalyse	48

4	Diskussion	61
<hr/>		
5	Zusammenfassung	65
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis	67
<hr/>		
7	Anhang	82
<hr/>		
8	Danksagung	86
<hr/>		
19	Lebenslauf	87
<hr/>		
10	Erklärung	88
<hr/>		

## Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Grading
HE	Hämatoxin-Eosin
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
KMS	Kaplan-Meier-Schätzer
LKM	Lymphknotenmetastasen
mdm2	Mouse double minute 2
p	Signifikanzniveau
R	R-Status
RNA	Ribonukleinsäure
TBS-Puffer	Tris-buffered Saline
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
UICC	Union Internationale Contre Cancer

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Möglichkeiten der p53-Aktivierung und Formen der p53 induzierten Zellantwort	24
Abbildung 2:	Das Auftreten des Ki67 Antigens während des Zellzyklus	25
Abbildung 3:	MTA-1 Manual Tissue Arrayer	28
Abbildung 4:	Tumor Array Herstellung	29
Abbildung 5:	prozentuale Verteilung männlich/ weiblich	43
Abbildung 6:	Altersverteilung bei Diagnosestellung	44
Abbildung 7:	Verteilung der Tumorstadien	44
Abbildung 8:	Verteilung der T-Stadien	45
Abbildung 9:	Verteilung der N-Stadien	45
Abbildung 10:	Verteilung der M-Stadien	46
Abbildung 11:	Verteilung des Grading	46
Abbildung 12:	Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren	49
Abbildung 13:	Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren	50
Abbildung 14:	Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen	51
Abbildung 15:	Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen	52
Abbildung 16:	Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Larynxkarzinomen	53
Abbildung 17:	Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen	54
Abbildung 18:	Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-	55

- moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen
- Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51- 56  
negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-  
moderten/starken Larynxkarzinomen
- Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in 57  
Abhängigkeit von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren
- Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit 58  
von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren
- Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von p53- 59  
positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren
- Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von p53- 60  
positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	TNM-Stadieneinteilung für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereichs	12
Tabelle 2:	Stadieneinteilung der Kopf-Hals-Karzinome	13
Tabelle 3:	Standard-Kontrollgewebe	34
Tabelle 4:	Zusammensetzung des TEC - Puffers	37
Tabelle 5:	Erstellung des Datenarrays	40
Tabelle 6:	Daten des Patientenkollektivs	42
Tabelle 7:	Altersverteilung nach Diagnosestellung	43
Tabelle 8:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren	49
Tabelle 9:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren	50
Tabelle 10:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen	51
Tabelle 11:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen	52
Tabelle 12:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Larynxkarzinomen	53
Tabelle 13:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen	54
Tabelle 14:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen	55
Tabelle 15:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Larynxkarzinomen	56

Tabelle 16:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren	57
Tabelle 17:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren	58
Tabelle 18:	Mittelwerte und Mediane für die rezidivfreie Überlebenszeit von p53-positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren	59
Tabelle 19:	Mittelwerte und Mediane für die Gesamtüberlebenszeit von p53-positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren	60

## 1 Einleitung

### 1.1. Allgemeine Beschreibung von Kopf-Hals-Tumoren

Kopf-Hals-Tumore umfassen maligne Erkrankungen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Nasopharynx, des Hypopharynx, der Nasennebenhöhlen, der Speicheldrüsen sowie des Kehlkopfes.

Weltweit erkranken jedes Jahr ca. 500000 Menschen an einem Karzinom der oberen Luft- und Speisewege. Dabei sind Männer mit 7,9% häufiger betroffen als Frauen mit 3,9% (PARKIN et al., 2005). Mehr als  $\frac{2}{3}$  der Patienten weisen bei der Erstdiagnose bereits die fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV (siehe Stadieneinteilung weiter unten) auf (LANG et al. 2002). 50% der Patienten sterben innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung. Damit ist die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 30 Jahren trotz verbesserter chirurgischer Verfahren, der Einführung neuer Bestrahlungstechniken und des Einsatzes adjuvanter Chemotherapeutika nahezu unverändert schlecht geblieben (INAGI et al. 2002).

Der Altersgipfel für die Erkrankung an Kopf-Hals-Tumoren liegt in Europa derzeit um das 5. und 6. Lebensjahrzehnt (HUSSEINY et al., 2000), (FRIES et al. 1979). Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr liegt geschätzt bei etwa 12000 Einwohnern, die ein Karzinom im Kopf-Halsbereich entwickeln (LANG et al., 2002).

Über 90% dieser Malignome sind Plattenepithelkarzinome. Der Rest verteilt sich auf Adenokarzinome, adenoid-zystische Karzinome, Non-Hodgkin-Lymphome (5%), Melanome und Sarkome (YOUSSEFZADEH, S et al., 1999).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege in Deutschland erheblich verändert (ESSER et al., 2000). Bei den Frauen erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg von Neuerkrankungen, während sie bei Männern konstant blieben. Dies steht vermutlich mit der gesellschaftlichen Entwicklung der Frau seit der Nachkriegszeit in Verbindung (HUNT et al., 2004), da die Zahl der Raucherinnen in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen hat (CASPER-SMERK, 2000).

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches nehmen mit 5% aller neu auftretenden Karzinome den sechsten Platz in der Tumorstatistik in Europa und den USA ein (PARKIN et al., 2005; BIER, 1991).

Die Entstehung der Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes ist multifaktoriell bedingt. Zu den Hauptrisikofaktoren gehören der Tabak- und ein hoher Alkoholkonsum, wobei besonders für den Tabakkonsum eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen ist (HOWALDT et al., 2000; MACFARLANE et al., 1995).

Als weiterer Risikofaktor gilt die meist berufliche Exposition gegenüber Schadstoffen wie Asbest- und Zementstaub und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (MAIER et al., 2002).

Infektionen mit dem Humanen Papillomavirus (HPV), insbesondere vom Typ 16 und 18, werden ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen in Zusammenhang gebracht (KLUSSMANN et al., 2003). Onkogene HPV-Typen lassen sich besonders häufig in Tonsillen- und Zungengrundkarzinomen nachweisen (KLUSSMANN et al., 2001). Dabei wird den HPV-positiven Karzinomen insgesamt eine deutlich bessere Prognose zugeschrieben, als den HPV-negativen (RITCHI et al., 2003).

Zusätzliche Faktoren sind der Vitamin-A-Mangel, der Zustand nach Strahlentherapie und Immunsuppression (RUDERT 1992, HARTMANN et al., 1997, MAIER et al. 1990, MAIER et al. 1991).

Der häufigste maligne Tumor der oberen Luft- und Speisewege ist das Plattenepithelkarzinom des Larynx (GATTA et al., 1996).

Plattenepithelkarzinome der Tonsillen sind nach Larynxkarzinomen die zweithäufigsten Malignome der oberen Luftwege (BARRS et al., 1979).

## **1.2 Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren**

Zur Klassifikation von Tumoren wird das international anerkannte TNM-System der UICC genutzt (UICC 1997). Es beschreibt die Größe des Primärtumors (T), die regionäre Lymphknotenmetastasierung (N), und das Auftreten von Fernmetastasen (M) (UICC 1997). Dabei unterscheidet man zwischen präoperativer (klinisch; cTNM) und postoperativer Klassifikation (histopathologisch; pTNM).

**Tabelle 1: TNM-Stadieneinteilung für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereichs.**

(Jede Tumorart innerhalb der Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren hat eine hiervon abgeleitete, eigene Stadieneinteilung).

<b>Primärtumor: T</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	Präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ)
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor <2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor >2 cm aber <4 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor >4 cm im größten Durchmesser
T4a	Tumor infiltriert den Larynx, die tiefe/extrinsische Muskulatur der Zunge, den M. pterygoideus medialis, den harten Gaumen oder den Unterkieferknochen
T4b	Tumor infiltriert den M. pterygoideus lateralis, die Pterygoid Platten, den lateralen Nasopharynx / die Schädelbasis / umschließt die A. carotis
<b>Regionale Lymphknoten : N</b>	
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	ipsilateral solitäre Lymphknotenmetastasen <3 cm im größten Durchmesser
N2a	Lymphknotenmetastasen ipsilateral solitär >3 cm aber <6 cm im größten Durchmesser
N2b	Lymphknotenmetastasen ipsilateral multipel <6 cm im größten Durchmesser
N2c	Lymphknotenmetastasen bilateral oder kontralateralen <6 cm im größten Durchmesser
N3	Lymphknotenmetastasen >6 cm im größten Durchmesser
<b>Fernmetastasen: M</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Der TNM-Status bezieht sich auf das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und wird histopathologisch gesichert.

Die TNM-Klassifikation als Ergebnis des Tumorstagings stellt heute eine Grundlage für die Therapieentscheidung dar. Diese Tumorformel reicht allerdings nicht aus, um prognostische homogene Kollektive zu erhalten (CARR 1983). Es werden wichtige Faktoren wie z.B. das Tumolvolumen nicht erfasst, so dass das TNM-System vor allem einen beschreibenden Charakter in der Tumordiagnostik und -therapie hat (FRIES et al. 1977; PLATZ et al. 1982).

Anhand der TNM-Klassifikation hat die UICC eine Stadieneinteilung abgeleitet. Eingeteilt wird in die Stadien 0 bis IV.

**Tabelle 2: Stadieneinteilung der Kopf-Hals-Karzinome**

<b>Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	Mo
<b>I</b>	T1	N0	Mo
<b>II</b>	T2	N0	Mo
<b>III</b>	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
<b>IVa</b>	T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
<b>IVb</b>	T4b	N0-3	M0
	T1-4	N3	M0
<b>Vlc</b>	T1-4	N0-3	M1

Eine weitere Klassifikation ist das histopathologische Grading. Es beschreibt das Wachstumsverhalten bzw. die Aggressivität des Tumors auf histologischer Ebene. Dabei wird bei der Begutachtung der Präparate durch den Histopathologen eine Einteilung in die Malignitätsgrade G1-G4, sowie GX, entsprechend gut, mäßig, schlecht, undifferenziert und unbestimmt differenzierten Plattenepithelkarzinomen gemäß den Kriterien der WHO vorgenommen.

GX = Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

G1 = gut differenziert

- G2 = mäßig differenziert
- G3 = schlecht differenziert
- G4 = undifferenziert

Beurteilungsgrundlage sind Zellreichtum, Mitoserate, Zellpleomorphie, das Vorliegen von Nekrosen und das Verhältnis von Zellen zu Interzellulärsubstanz innerhalb von Tumorgewebe (SCHWENZER, N., et al., 2002)

Des Weiteren beschreibt die R-Klassifikation das Fehlen bzw. Vorhandensein von R-Status nach der Therapie. Nach WITTEKIND et al. (2002) gehört sie aus historischen Gründen nicht obligat zur TNM-Klassifikation. Aufgrund ihrer prognostischen Bedeutung sei sie vor allem bei der chirurgischen Therapie unerlässlich und stelle daher einen grundlegenden Bestandteil in der Tumordokumentation dar.

In der R-Klassifikation nach WHO wird die lokoregionäre Situation (Primärtumor und regionäres Lymphabflussgebiet sowie auch evtl. Fernmetastasen) berücksichtigt.

- **R0** ist gegeben, wenn der Primärtumor (mit oder ohne regionärem Lymphabflussgebiet und etwaigen Fernmetastasen) nach makroskopischer Beurteilung durch den Operateur komplett im Gesunden entfernt wurde und die Resektionsflächen mikroskopisch tumorfrei sind.
- **R1** ist gegeben, wenn mikroskopisch Tumorgewebe an den Resektionsflächen festzustellen sind.
- **R2a** ist gegeben, wenn der Primärtumor makroskopisch nicht oder wahrscheinlich nicht entfernt wurde, dies mikroskopisch jedoch nicht bestätigt ist.
- **R2b** ist gegeben, wenn sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch ein R-Status festzustellen ist.

### 1.3 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind vielfältig. Die Entscheidung zu einer Therapie richtet sich nach dem Allgemeinzustand des Patienten, sowie nach dem Patientenwunsch. Außerdem spielen die Größe des Primärtumors, seine Resektabilität, der Lymphknotenbefall, der histologische Differenzierungsgrad und die Tumorlokalisation eine wichtige Rolle in der Entscheidungsfindung.

Die klassischen Behandlungsverfahren sind neben der Operation die Radiotherapie und in geringem Umfang die Chemotherapie. Bei bestimmten Indikationen können, zur Verbesserung der Erfolgsaussichten, auch Kombinationen der Therapiemöglichkeiten in Betracht gezogen werden.

#### 1.3.1 Chirurgische Therapie

Das Ziel der chirurgischen Therapie von malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist die R0-Resektion bzw. die Resektion des Tumors „in sano“ mit histopathologisch nachgewiesener Tumorfreiheit an den Resektionsrändern. Nach SLOAN et al. (1991) können zusätzlich neben der plastisch-chirurgischen Wiederherstellung vereinzelt suspekte und vergrößerte Lymphknoten im Rahmen einer Neck dissection entfernt werden.

Man unterscheidet:

- **Radikale Neck-Dissektion:** Basisverfahren der Halsweichteilausräumung aller fünf Lymphknotengruppen mit Entfernung wichtiger nichtlymphatischer Strukturen (M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna und N. accessorius),
- **modifiziert radikale Neck-dissection:** Resektion aller fünf Lymphknotengruppen, mit Erhalt einer oder mehrerer nicht-lymphatischer Strukturen,
- **selektive Neck-Dissektion:** Resektion von mindestens zwei aber weniger als fünf Lymphknotengruppen, Erhalt von mindestens einer nichtlymphatischen Struktur, sowie

- **erweiterte radikale Neck-dissection:** Entfernung zusätzlicher Lymphknotengruppen (z.B. intraparotideale Lymphknoten) oder nichtlymphatischer Strukturen (z.B. Glandula parotis, Schilddrüse). Bei der elektiven Neck-Dissektion sollen Mikrometastasen in Abwesenheit von palpablen Lymphknoten eliminiert werden. Die Indikation ergibt sich aus der klinischen Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer mikroskopischen Lymphknotenbesiedlung, die abhängig ist von Lokalisation, Größe und Differenzierungsgrad des Primärtumors. (AL-SARRAF, 2002; GLEICH et al., 2003)

### 1.3.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie wird entweder als Monotherapie oder in Kombination mit operativen Maßnahmen prä- oder postoperativ eingesetzt. Die neoadjuvante Radiotherapie wird bei Tumorkrankheiten des Kopf-Hals-Bereiches nur selten angewandt, in der Regel im Rahmen kontrollierter Studien, meist in Kombination mit einer Chemotherapie und anschließender Operation in kurativer Absicht. Die Resektion soll entsprechend den prätherapeutischen Tumorgrenzen erfolgen (GELLRICH et al., 2004)

Die postoperative adjuvante Radiotherapie ist in Abhängigkeit von Tumorstadien und/oder Lymphknotenbefall häufig indiziert.

Die übliche Fraktionierung variiert zwischen 1,8 und 2,2Gy (mittlere Wochendosis 10,0Gy). Die Tumordosen liegen zwischen 50,0 und 70,0Gy. Sie sind abhängig von der Tumorphistologie einschließlich Grading, vom Tumorsitz, von der Tumorgröße und vom Ausmaß der befallenen Lymphknoten (HESS, 2005).

Die 3-Jahres-Überlebensraten nach kurativer Radiotherapie sind insbesondere abhängig vom Initialen Befall der Lymphknoten. Bei T1 N0-Tumoren überleben 82%, bei T2 N0-Tumoren 60% und bei T4 N2-3-Tumoren nur 24% der Patienten (AL-SARRAF, 2002; MENDENHALL et al., 2000).

Häufige Folgeschäden der Strahlentherapie sind: trockener Mund, Verlust des Geschmacksinns, Osteoradionekrose, bestrahlungsinduzierter Krebs (PERNOT et al. 1996; ASAKAGE et al. 1999).

### 1.3.3 Chemotherapie

Bislang wird die alleinige Chemotherapie bei Patienten mit Fernmetastasen oder lokoregionärem Rezidiv, bei denen eine chirurgische oder strahlentherapeutische Möglichkeit der Behandlung nicht mehr besteht, nur in palliativer Absicht eingesetzt (CASTRO et al. 2003). Dabei zeigte die Kombination der Zytostatika Cisplatin mit 5-Fluoruracil die höchsten Remissionsraten, wobei eine solche Polychemotherapie wesentlich häufiger toxische Nebenwirkungen mit sich bringt als eine Monochemotherapie (WELKOBORSKY et al., 1992). Eine Chemotherapie kann systemisch oder intratumoral gegeben werden.

Durch die Einführung unterschiedlicher Kombinationsformen und neuer Präparate konnte eine Verbesserung der Ansprechrate erreicht werden. Allerdings ist es nicht gelungen die Überlebensdauer zu verbessern, sie beträgt bei durchschnittlich resektablen Tumoren im Mittel immer noch 6 Monate nach Diagnosestellung (FORASTIERE et al., 1994).

### 1.3.4 Radiochemotherapie

Die Radiochemotherapie stellt eine chemotherapeutische Möglichkeit mit kurativem Therapieansatz dar. Durch die parallele Radiochemotherapie kann in ausgewählten Fällen auf eine Operation verzichtet werden, oder das Operationsausmaß in Grenzen gehalten werden, womit ein Erhalt des Organs erreicht werden kann (LAAK et al., 1998). Meist wird diese Therapieform jedoch genutzt, wenn eine chirurgische Tumorentfernung aufgrund der Tumorausdehnung nicht mehr sinnvoll ist und ein Organerhalt hierdurch erzielt werden kann.

Simultan zur Radiotherapie werden neben radiosensibilisierenden Substanzen auch Zytostatika gegeben. Als effektivste Substanzen gelten vor allem Cisplatin und 5-Fluorouracil aber auch Carboplatin, Taxane und Mitomycin. Vorteile der simultanen Radio-Chemotherapie liegen in einer höheren lokoregionären Tumorfreiheit und in der Organerhaltung. Allerdings wirken sich therapieassoziierte Nebenwirkungen wie z.B. Mukositis und Osteonekrose nachteilig aus (OLMI et al., 2003).

Die simultane Radio-Chemotherapie erbringt signifikant höhere Raten an lokoregionärer Tumorfreiheit sowohl im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie als auch zur sequentiellen Radio-Chemotherapie (STAAR et al., 2001).

### 1.3.5 Induktionschemotherapie

Nach Mumme et al. führten der Wunsch nach Organerhalt sowie lokal inoperable Tumoren und ein hohes Rezidivrisiko nach Resektion zur Etablierung der Induktionschemotherapie sowohl als kurative als auch palliative Therapieoption. Die Induktionschemotherapie hat das Ziel bei noch nicht vorbehandelten Patienten in einem noch gut durchbluteten Tumorgewebe höhere Chemotherapiekonzentrationen zu erreichen. Der Grundstein der Induktionschemotherapie wurde aufgrund der Ansprechbarkeit von Kopf-Hals-Tumoren auf cisplatinhaltige Chemotherapien Anfang der 70er Jahre gelegt. Untersuchungen in den 80er Jahren zu Cisplatin und 5-Floururacil (5-FU) zeigten gute Ansprechraten. Eine Steigerung der Gesamtüberlebenszeit konnte jedoch durch die Behandlung mit Cisplatin und 5-FU nicht realisiert werden. Der neuste Stand der Induktionschemotherapie sieht eine Dreifachtherapie als TPF (Docetexal, Cisplatin und 5-FU) sowie PPF (Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU) vor. In den Studien TAX-323 und TAX-324 konnte die signifikante Überlegenheit von TPF-Schemata gegenüber der alleinigen PF-Induktionschemotherapie gezeigt werden. (MUMME et al. 2010)

Die oben aufgeführten Therapiemöglichkeiten sind als Behandlungsspektrum für Kopf-Hals-Tumore zu sehen. Welche dabei Wann und Wie zum Einsatz kommen hängt dabei hauptsächlich von der körperlichen Verfassung des Patienten und des Tumorstadiums ab. Der neuste medizinische Stand sieht daher eine patientenspezifische Behandlung („Custom Tailored“) vor, bei der in der Regel mehrere Therapien zum Einsatz kommen. Derzeit laufen verschiedene Untersuchungen zur Optimierung der Kombinationsbehandlung. Vgl. (FORASTIERE et al. 2003, FU et al. 2000)

#### 1.4 Prognose von Kopf-Hals-Tumoren

Die Prognose für maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches hat sich trotz des Fortschritts in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie nicht verbessert (KASTENBAUER, 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt durchschnittlich 50% und gehört somit zu den schlechtesten unter den häufigsten Tumorarten.

Eine Ursache für diese schlechte Prognose ist der Zusammenhang von Tumorstadium und dem Ausmaß der Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. So werden durchschnittliche 5-Jahres Überlebensraten im Stadium I von 90%, im Stadium II von 75%, im Stadium III von 45-75% und im Stadium IV von kleiner als 35% erreicht (PERICOT et al., 2000).

Die Hauptprognosefaktoren bei den Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs sind die Lymphknotenmetastasen (LKM) (MAMELLA et al. 1994; SHINGAKI et al., 1999; FERLITO, 2000). So reduziert sich die Überlebensrate bei Anwesenheit einer einzigen Lymphknotenmetastase um mindestens 50% (ENEPEKIDES *et al.*, 1999).

Fasst man alle Tumoren zusammen, so wird eine 5-Jahres-Überlebensrate von 28% und ein krankheitsfreies Überleben von 41% erreicht. 25% der Langzeitüberlebenden tragen das Risiko der Bildung von Zweittumoren (SCHMOLL et al., 2006).

Zur Verbesserung der Prognose von Kopf-Hals-Tumoren sind zuverlässige biologische Marker notwendig, die zu einem frühen Zeitpunkt mit dem Tumor assoziiert werden können und somit für eine routinemäßige Frühdiagnose geeignet sind. Ein weiteres Forschungsziel ist es, relevante molekulare Marker als Zielstrukturen für neue Therapieformen zu identifizieren. Bisher sind jedoch nur sehr wenige geeignete molekulare Biomarker verfügbar.

### 1.5 Rad51

Rad51 ist eines der Schlüsselproteine der homologen Rekombination (HR) und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (MAACKE et al. 2000a). Zellen, die einen Defekt in der HR aufweisen, sind anfällig gegenüber ionisierender Strahlung sowie gegenüber Substanzen, die Strangvernetzungen (cross-links) der DNA-Doppelhelix auslösen (CONNELL et al., 2006). Durch Defekte in Rad51 kommt es zu einer Blockierung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (RESNICK et al., 1976), Chromosomenbrüchen sowie zum Stopp des Zellzyklus und Apoptose (BAUMANN et al., 1998).

Rad51 bindet an Einzel- und Doppelstrang-DNA und fördert ATP-abhängig die genetische Rekombination während der Meiose und Mitose sowie die Reparatur von DNA-Schäden (BAUMANN et al., 1996). Diese Bindung erfolgt durch die Formung von helikalen Nukleoprotein-Filamenten, welche die DNA ausdehnen und unterwinden (BENSON et al., 1994).

Rad51 spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Die Expression dieses Proteins ist am niedrigsten in G0/G1, steigt in der S-Phase an und erreicht in der G2/M-Phase ihr Maximum (CHEN et al., 1997). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der G2-Phase des Zellzyklus eine erhöhte homologe Rekombination und Reparatur stattfindet. Neueste Studien besagen, dass eine Überexpression von Rad51 in den Zellen zu einer Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen in der späten S/G2-Phase des Zellzyklus führt und es somit zu einer gesteigerten Radioresistenz von Tumorzellen kommt (HANSEN et al., 2003; MAACKE et al., 2000; SLUPIANEK et al., 2001; VISPÉ et al., 1998)

In seiner Funktion bei der HR ist das Rad51-Protein auf Kofaktoren wie Rad52 und „Replication Protein A“ angewiesen (KANAAR et al., 1998; SUNG, 1997). Rad52 unterstützt Rad51 bei der Bindung an Einzel- und Doppelstrang-DNA durch Induktion von Konformationsänderungen, welche die ATPase-Aktivität steigern (Baumann et al., 1996). Für den DNA-Strang-Austausch benötigt Rad51 das „Replication Protein A“. Die Verbindungsmolekül-Formation von Rad51 wäre ohne dieses Protein unwirksam (BAUMANN et al., 1997).

Des Weiteren interagiert Rad51 mit den Tumorsuppressoren p53, BRCA1 und BRCA2. Der Tumorsuppressor p53 beeinflusst als ein zentraler Faktor der genomischen Integrität den Zellzyklus, verschiedene DNA-Reparaturmechanismen und die Apoptose (BUCHHOP et al., 1997). Für die Bildung von Proteinkomplexen nach DNA-Schädigung (STURZBECHER et al., 1996) konnten bei p53 zwei Rad51-Bindungsstellen identifiziert werden (BUCHHOP et al., 1997).

Weiterhin bindet sich Rad51 an die Produkte der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 (SCULLY et al., 1997). Mutationen in diesen Genen liegen bei 60% der hereditären Mammakarzinome vor (VENKITARAMAN et al., 2002). BRCA1 und BRCA2 sind wichtige Gene für die Regulation der DNA-Reparatur, deren Funktionsverlust zu einem gestörten Reparaturmechanismus mittels HR führen kann (SNOUWAERT et al., 1999; MOYNAHAN et al., 2002).

Kritisch für die Tumorentstehung scheint das Expressionsniveau von Rad51 zu sein. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine Überexpression von Rad51 bereits bei einer Reihe von menschlichen Malignomen der Brust, der Harnblase, des Pankreas und beim Bronchialkarzinom nachgewiesen (MAACKKE et al., 2000a). In einer Studie über Pankreasadenokarzinome wurden in 66% der Fälle erhöhte Rad51-Level festgestellt (MAACKKE et al., 2000b). Bei der Untersuchung von sporadischen invasiv-duktalem Mammakarzinomen sowie dem Harnblasenkarzinom wurde eine Korrelation zwischen der Rad51 Überexpression und dem histologischen „Tumorgrading“ gefunden (MAACKKE et al., 2000a). Eine neuere Studie von Patienten mit Lungenkrebs zeigte eine schlechte Prognose für diejenigen, bei denen eine starke Rad51-Expression vorlag (QIAO et al., 2005).

Andererseits finden sich auch niedrige Rad51-Konzentrationen. So wurde in fast einem Drittel aller in einer Studie von Yoshikawa et al. untersuchten Mammakarzinomzelllinien und primären sporadischen Brustkarzinomen ein sehr niedriger Rad51-Gehalt gefunden (YOSHIKAWA et al., 2000).

## 1.6 p53

P53 ist ein Tumorsuppressorgen mit einem Molekulargewicht von 53 Kilodalton, welches sich aus 393 Aminosäuren zusammensetzt und auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p3.1) lokalisiert ist (LANE et al., 1979). Das Gen weist in rund

50% aller Tumorerkrankungen Mutationen auf und ist damit das am häufigsten veränderte Gen bei onkologischen Erkrankungen (GREENBLATT *et al.*, 1994).

Das p53 Protein kann in verschiedene Domänen eingeteilt werden: Der N-terminale Bereich wird von den Aminosäuren 1 bis 42 gebildet und enthält eine Transaktivierungsdomäne (UNGER *et al.*, 1992). Im mittleren Bereich befindet sich an den Aminosäurepositionen 102-292 die sequenzspezifische DNA-bindende Domäne (PAVLETICH *et al.*, 1993). Dazwischen bilden die Aminosäuren 63 bis 97 eine prolinreiche Region. Sie scheint über die Bindung an SH3-Domänen anderer Proteine eine Rolle in der Signaltransduktion der Wachstumsregulation zu spielen (WALKER *et al.*, 1996). Am carboxy-terminalen Ende bilden die Aminosäuren 325 bis 356 die Oligomerisierungsdomäne. Am C-terminalen Ende des Proteins ist zwischen den Aminosäuren 363 bis 393 eine zusätzliche funktionelle Domäne lokalisiert. Diese fungiert als negativer Regulator der sequenzspezifischen p53-DNA-Bindung (HUPP *et al.*, 1993).

Als Transkriptionsfaktor hat p53 die Aufgabe, nach einer DNA-Schädigung die Expression von Genen zu regulieren, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion des programmierten Zelltods, der sogenannten Apoptose, oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aus diesem Grund bezeichnet man p53 auch als „Wächter des Genoms“ (LANE, 1992)

Die Aktivierung von p53 kann durch eine Reihe von Faktoren bewirkt werden. Ein wichtiger Auslöser sind DNA-Schäden in der Zelle, die u. a. durch UV- oder Gammastrahlung, Basenalkylierung, Depurinierung von DNA oder Reaktion mit freien Sauerstoffradikalen entstehen können (LEVINE *et al.*, 2006).

Weitere Auslöser der p53-Aktivierung sind zelluläre Mangelzustände wie Hypoxie, Glukosemangel und Ribonucleotid-Depletion sowie thermische Schockzustände (Hitze als auch Kälte), Stickstoffoxid-Detektion, die Expression von Onkogenen und die Beschädigung der Mitosespindel. (LEVINE *et al.*, 2006)

Unter normalen Bedingungen liegt p53 in der Zelle nur in sehr niedriger oder nicht nachweisbarer Konzentration vor, da es eine äußerst kurze Halbwertszeit von 5 bis 30 Minuten hat (REICH *et al.*, 1984). Diese Halbwertszeit kommt vor allem durch die Interaktion von p53 mit dem Onkoprotein mdm2 (mouse double minute) zustande

(HAUPT et al., 1997). Durch die Bindung von mdm2 an den N-Terminus von p53 hemmt es die transkriptionelle Aktivität von p53, was eine Ubiquitinierung und Proteasom-vermittelte Degradierung begünstigt (MOMAND et al., 1992; CHEN et al., 1996; HAUPT et al., 1996). P53 führt seinerseits durch transkriptionelle Aktivierung des *mdm2*-Gens zur Akkumulation von mdm2 (BARAK et al., 1993; WU et al., 1993). Das Onkoprotein mdm2 und das Tumorsuppressorprotein p53 bilden somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Damit die beiden Proteine nicht mehr interagieren, muss eine Inhibierung der mdm2-Funktion (z. B. durch p53-Phosphorylierung) stattfinden. Aufgrund dieser kovalenten Modifikation wird p53 aktiviert und stabilisiert. Die p53-Proteinmenge nimmt zu, was man auch als *overtranslation* bezeichnet und p53 akkumuliert (LEVINE, 1997; PERRY et al., 1993). Die Halbwertszeit des normalerweise kurzlebigen Proteins erhöht sich. p53 bindet *in vivo* als Tetramer an die DNA (LANE, 1992; LEVINE et al., 1997) und kann Zielgene aktivieren oder hemmen und zelluläre Funktionen steuern.

Die Reaktion von p53 auf eine DNA-Schädigung lässt sich stark vereinfacht folgendermaßen beschreiben: Werden Schäden an der DNA festgestellt, so wird p53 aktiviert und der Zellzyklus wird am Ende der G1-Phase, vor Eintritt in die S-Phase so lange gestoppt, bis der Schaden repariert ist. Im Falle eines zu großen Schadens induziert p53 die Apoptose (HOFSETH et al., 2004).

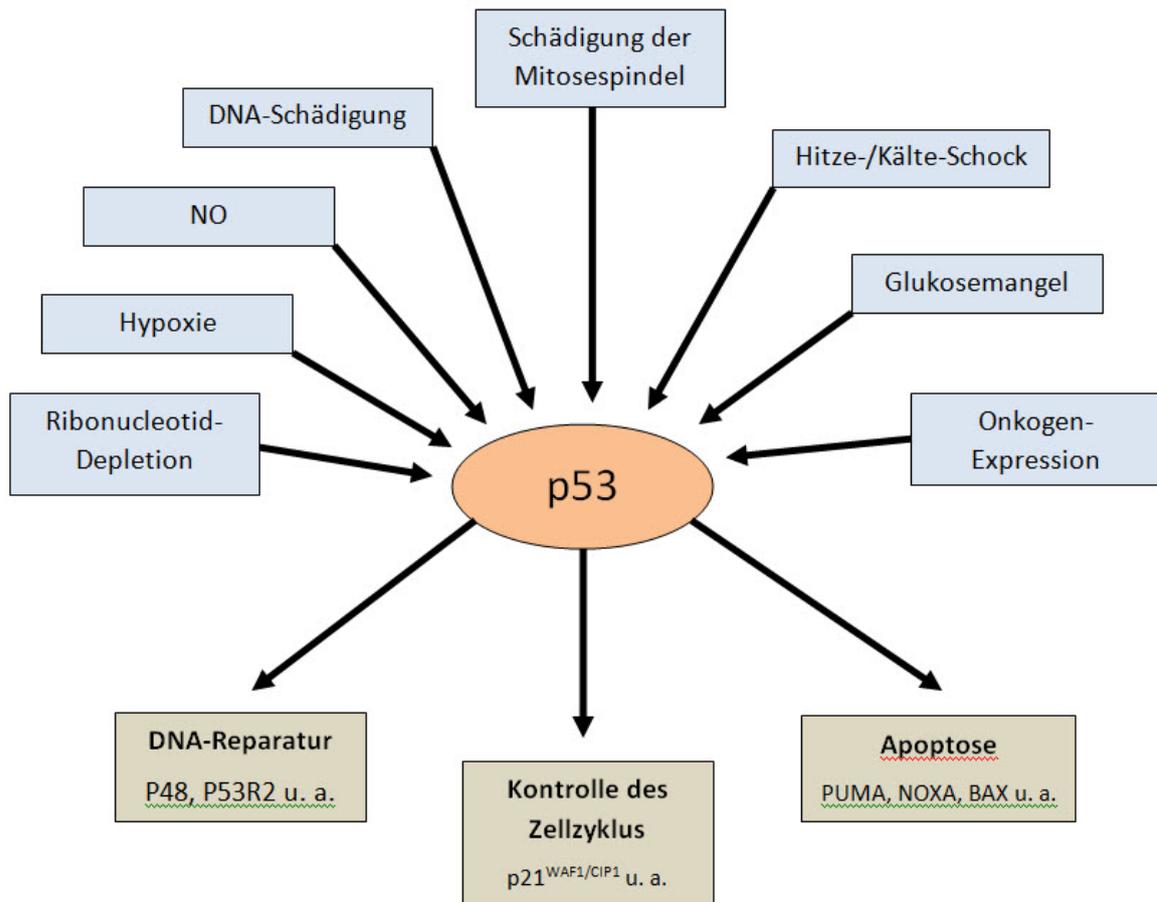
Von p53 induzierte Gene, die helfend in die DNA-Reparatur eingreifen sind z. B. P48 und P53R2 (LEVINE et al., 2006).

Die DNA-Reparatur würde nicht viel Sinn machen, wenn die beschädigten Zellen den Zellzyklus weiter durchlaufen würden und die defekte DNA repliziert würde. p53 stimuliert das Protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup> und vermittelt so einen Zellzyklusblock. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ist ein effektiver Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDKs), welche zu den Hauptregulatoren des Zellzyklus gehören und für das Fortschreiten der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus verantwortlich sind. Dadurch das p21<sup>WAF1/CIP1</sup> die CDKs blockiert, kommt es zu einem Zellzyklusstop sowohl am Übergang von der G1- in die S-Phase als auch zwischen der G2- und der M-Phase (VOGELSTEIN et al., 2000).

Für die Induktion der Apoptose stehen verschiedene Mediatoren zur Verfügung (VOUSDEN et al., 2002). Zu Ihnen gehören z. B. die Proteine PUMA, NOXA und BAX, die über die Induktion mitochondrialer Cytochrom-C-Freisetzung ihre

proapoptotische Funktion erfüllen (VOGELSTEIN et al., 2000). Durch das zytoplasmatische Cytochrom-C wird im Zusammenspiel mit anderen Proteinen die Caspase-Kaskade initiiert die zur Apoptose führt.

Abbildung 1 fasst die Aktivierungswege und Funktionen des p53-Proteins bildlich zusammen.



**Abbildung 1:** Möglichkeiten der p53-Aktivierung und Formen der p53 induzierten Zellantwort

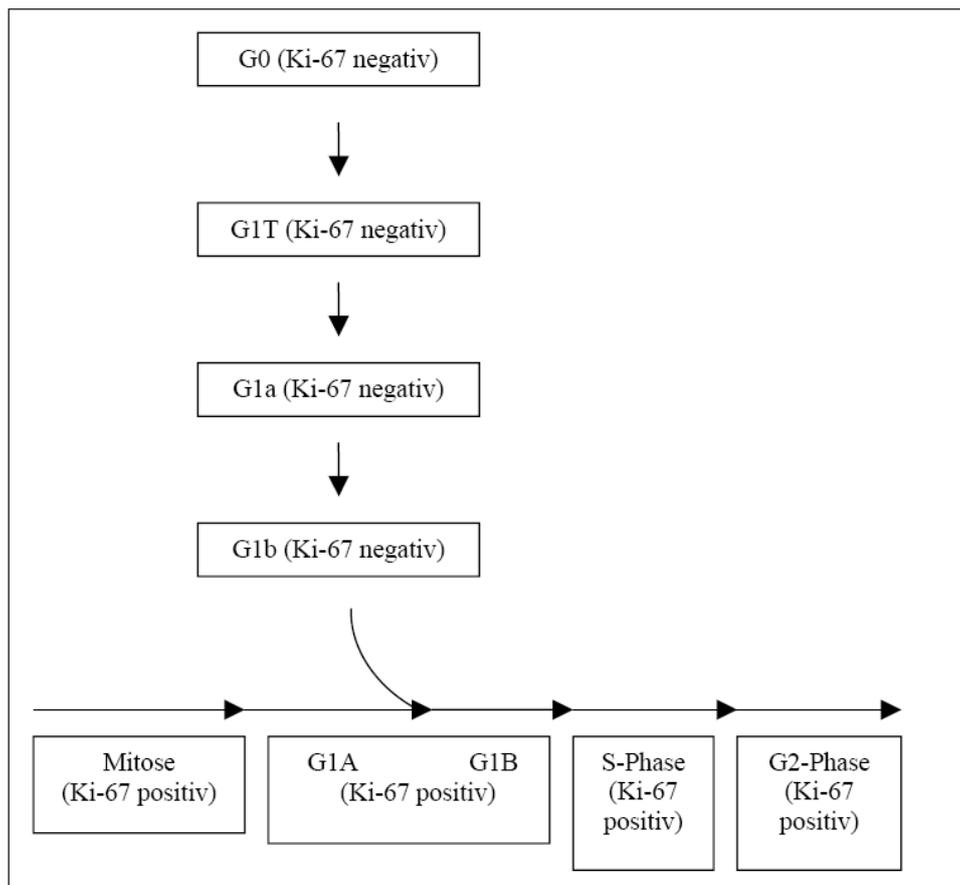
### 1.7 Ki 67

Ki-67 ist ein von Gerdes et al. 1983 entwickelter monoklonaler Antikörper der Maus. Der Ki-67-Antikörper erkennt ein nukleäres Antigen, das nur in proliferativen Zellen exprimiert wird, in ruhenden Zellen aber fehlt (GERDES et al., 1983). Die Expression dieses Antigens erfolgt während aller aktiven Phasen des Zellzyklus, das heißt Ki67 ist während der G1-, S- und G2-Phase sowie während der Mitose vorhanden.

Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki-67-Antigen nicht (GERDES et al., 1984). Sobald die Zelle den nicht-proliferativen Zustand erreicht, wird das Antigen sofort abgebaut (SCHOLZEN et al., 2000).

In weiteren Studien (DARZYNKIEWICS et al., 1982; GERDES et al.1984) wurden der G0-Zustand und die G1-Phase genauer untersucht. In diesen zeigte sich, dass nach der Mitose direkt weiter proliferierende Zellen einen anderen metabolischen Weg durchlaufen als Zellen, die aus dem Ruhezustand heraus in den Zellzyklus und damit in die G1-Phase eintreten.

Demnach kann die G1-Phase in eine G1A- und G1B-Phase unterteilt werden. Aus dem Ruhezustand geht die Zelle in die Phasen G1T, G1a, G1b und G1B über. Die ersten drei werden als Startsequenzen des Zellzyklus angesehen, nicht aber zum eigentlichen Zellzyklus gerechnet (Gerdes J, Lemke H et al. 1984). Die Phasen G0, G1T, G1a und G1b sind Ki67 negativ, in den Phasen G1A und G1B dagegen findet sich eine Expression von Ki67 (Abbildung 2) (GERDES et al. 1984).



**Abbildung 2:** Das Auftreten des Ki67 Antigens während des Zellzyklus (nach GERDES et al. 1984)

Das Ki-67-Antigen ist ein Nicht-Histon-Protein, das sich aus Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 345 und 395 kDa zusammensetzt (GERDES et al., 1991). Das entsprechende Gen ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert (FONATSCH et al., 1991). Die Lage des Ki67-Proteins innerhalb der Zelle verändert sich während des Zellzyklus. In der Interphase ist das Protein ausschließlich im Zellkern, vor allem im Nucleolus, lokalisiert. Mit dem Eintritt der Zelle in die erste Phase der Mitose, der Prophase, löst sich der Zellkern, einschließlich des Nucleolus auf und der Großteil des Ki67-Proteins wird auf die Oberfläche des Chromosoms verlegt (SCHOLZEN et al., 2000; STARBORG et al., 1996; KILL 1996). In der Telophase entstehen wieder neue Nucleoli und irgendwann in diesem zeitlichen Zusammenhang wird Ki67 wieder in die Nucleoli zurückverlagert. Der genaue Zeitpunkt ist umstritten (ENDL, 2000), aber es besteht Übereinstimmung darüber, dass Ki67 in der frühen G1-Phase wieder im Nucleolus und im Nucleoplasma nachweisbar ist (BRIDGER et al. 1998).

Ki-67 stellt einen guten Proliferationsmarker für Tumoren dar, da er die Zellen anfärbt, die sich vermehren, die sogenannte Wachstumsfraktion (GERDES et al., 1983). Die Färbung für Ki-67 gibt also indirekt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors und ist deshalb in der Routinediagnostik von hohem Wert. Der Ki-67-Färbeindex errechnet sich aus dem relativen Anteil der Ki-67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl.

## **1.8 Tissue Microarrays (TMA)**

### **1.8.1 Entwicklung der Tissue Microarray-Technik**

Bereits 1986 beschrieb Hector Battifora einen Multitumor Gewebekblock (multitumor tissue block oder sausage block), mit dessen Hilfe er 100 oder mehr Gewebe gleichzeitig untersuchte. Durch die Behandlung unterschiedlicher Gewebe in einem Block konnten Schwankungen durch Messfehler nahezu ausgeschaltet und Vergleiche unter den Geweben vereinfacht werden. Ein weiterer Vorteil war die Materialersparnis, da jeweils nur ein Tropfen eines Antikörpers benötigt wurde (BATTIFORA, 1986).

J. Kononen et al. entwickelten 1998 die Methode der Tissue Micorarrays (KONONEN et al., 1998). Bei dieser Technologie werden aus einem so genannten Spenderblock (=“Donorblock“), in dem die Primärtumoren in Paraffin eingebettet vorliegen, Gewebestanden mit einem Durchmesser von 0,6 bis 3,0 mm entnommen und in einen Empfängerblock überführt und nach einem standardisierten Schema angeordnet. Diese entnommenen Gewebeareale werden in dem Empfängerblock in eine standardisierte Anordnung überführt.

Im Gegensatz zu den heutigen TMAs verwandte Battifora größere Gewebeproben, welche vergleichsweise ungeordnet in einen Paraffinblock eingesenkt wurden.

Mit der TMA-Technologie und der Verwendung eines Stanzgerätes (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin, USA), welches durch das National Institute of Health entwickelt wurde, können heute in nur einem Arbeitsgang bis zu 1000 Gewebeproben gleichzeitig mittels Fluoreszenz in situ Hybridisation, RNA in situ Hybridisation oder Immunhistochemie untersucht werden (MOCH et al., 2001). Durch den Einsatz dieses Stanzgerätes konnte die Präzision wesentlich erhöht werden, da nun zum ersten Mal genormte zylindrische Proben mit einem festen Durchmesser in einen Paraffinblock eingebracht werden konnten, so dass sich ein reproduzierbares Probenmuster ergab. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass die Blöcke, aus denen das zu untersuchende Gewebe entnommen wird, nur geringfügig beschädigt werden. Wenn man den einzelnen Block betrachtet, so können aus diesem theoretisch 300 Proben entnommen werden, wenn der jeweilige Tumor eine Größe von 18x18 mm hat. Jede dieser Proben kann, genau so wie der Ursprungsblock, in bis zu 300 Schichten geschnitten werden. Im Idealfall wäre es also möglich, 90 000 (300 x 300) in situ Analysen eines einzigen Tumors durchzuführen (BUBENDORF et al. 2001).

Seit der erstmaligen Beschreibung der Tissue Microarray Technik (KONONEN et al., 1998), konnte durch zahlreiche Studien die Praktikabilität und Kostenersparnis dieses Verfahrens belegt werden (MOCH et al., 1999; MUCCI et al., 2000; HORVARTH et al., 2001; MOCH et al., 2001). Außerdem trägt die Technik zur Qualitätssicherung bei, da bisher die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Laboratorien wegen lokaler Unterschiede in der Fixation, Verarbeitung und Färbung manchmal schwierig waren (HSU et al., 2002).

### 1.8.2 Prinzip der Tissue Microarray Technik

Zur Herstellung eines Tissue Microarrays wird ein speziell dafür hergestelltes Stanzgerät (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin) verwendet (Abbildung 3). Mit diesem Gerät werden zylindrisch geformte Gewebeproben aus Paraffinblöcken entnommen und in einen neuen Paraffinblock eingebracht.



**Abbildung 3:** MTA-1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments)

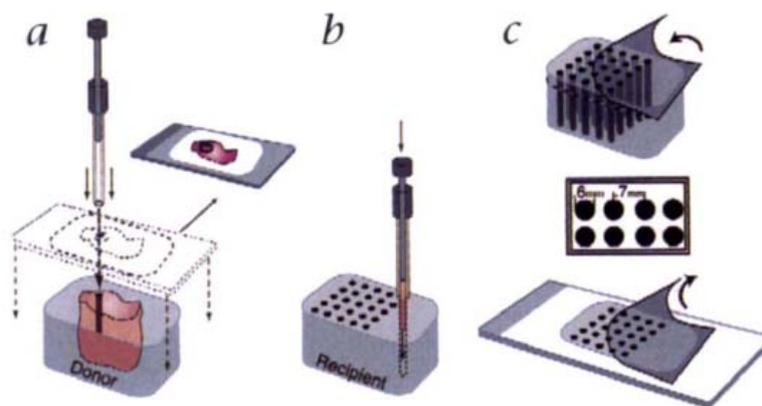
Dementsprechend wird der Block, aus dem das Gewebe entnommen wird, „donor- (deutsch: „Geber“) und der leere, neue Paraffinblock „recipient“- (deutsch: „Empfänger“) Block genannt.

Zuvor werden die Regionen, aus denen die Biopsie entnommen wird, entsprechend ihrer morphologischen Repräsentativität mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin- (HE) Schnitten ausgesucht.

Das Stanzgerät enthält zwei an der Spitze geschärfte Hohlzylinder. Der innere Hohlzylinder hat einen Außendurchmesser von 0,6 mm und wird zum Stanzen von zylinderförmigen Löchern in die Empfängerblöcke verwendet. Der größere Hohlzylinder dient dem Ausstanzen von Gewebezylindern aus dem Donorblock und dem Einbringen der so gewonnenen Tumorproben in die vorgefertigten Löcher des

Empfängerblockes. Der innere Durchmesser des größeren Hohlzylinders entspricht dem äußeren Durchmesser des kleineren Hohlzylinders (Abbildung 4).

Die Stanzen sollten in ein x-y-Koordinatensystem, das mit Hilfe des Gerätes eingestellt werden kann, übertragen werden, um nachher im Empfängerblock die einzelnen Stanzen den jeweiligen Patientendaten zuordnen zu können (BUBENDORF et al., 2001).



**Abbildung 4: Tumor Array Herstellung**

a) Die Gewebebiopsien werden aus ausgewählten Regionen mit Hilfe eines dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinders ausgestanzt. b) Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von gestanzten Gewebestücken in vorgefertigte Löcher in einem vorgegebenen Koordinatensystem des Empfängerblocks (Tumor-Array). c) Ein mit einer Klebeschicht überzogenes Haltesystem erleichtert die Anfertigung der Tissue-Microarray-Schnitte. Die Gewebeprobe im Array haben einen Durchmesser von 0,6 mm und sind im Abstand von 0,1 mm zueinander angeordnet (KONONENEN et al., 1998).

### 1.8.3 Anwendungsgebiete der Tissue Microarrays

Heutzutage ist das Problem nicht mehr die Entdeckung der Gene, sondern die Analyse ihrer Funktion. Seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms steht der Wissenschaft eine große Menge von Informationen von über zehntausenden von Genen und deren Strukturen zur Verfügung (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001;).

Bei der Erforschung von Zellgenomen auf DNA- und RNA-Ebene ist der Einsatz von DNA-Microarrays ein wichtiger Arbeitsschritt, da damit alle in einer Zelle vorkommenden Gene identifiziert werden können (DERISI et al., 1996; LOCKHART et al., 1996; SCHENA et al., 1995; SCHENA et al., 1996). Die Qualität der Gene und

ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel lassen sich mit diesem Verfahren jedoch nicht beurteilen. Aus diesem Grund verwendet man zusätzlich Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) und TMAs, die für diesen Zweck optimal geeignet sind (BUBENDORF et al., 1999; HOFELE et al., 2002; 1999; MOCH et al., 1999).

Mit Tissue Microarrays können verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden, die sich nach dem jeweiligem Design der TMAs richten:

- Multitumor TMAs:  
Enthalten Spots aus Tumorgewebe verschiedener Art. Mit ihnen kann man untersuchen, welche DNA, RNA oder Proteine in welcher Tumorart vorkommen (ANDERSEN et al., 2000; SCHRAML et al., 1999).
- Progression TMAs:  
Enthalten Gewebe einer Tumorart, jedoch von verschiedenen Stadien dieses Tumors. Damit kann beispielsweise untersucht werden, ob ein Gen in verschiedenen Phasen der Tumorentwicklung unterschiedlich stark exprimiert wird (BOWEN et al., 2000; BUBENDORF et al., 1999; KONONEN et al., 1998)
- Prognostic bzw. Prognosis TMAs:  
Kombination aus den Spots eines Microarrays und den jeweiligen Follow-up-Daten der Patienten. Damit kann man feststellen, ob ein bestimmtes Protein prognostische Relevanz besitzt (BARLUND et al., 2000; MOCH et al., 1999; TORHORST et al., 2001)

Hieraus ergeben sich folgende Anwendungsgebiete für Tissue Microarrays in der Krebsforschung (SPYRO et al., 2001):

- Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung von Molekülen.
- Verknüpfung der Informationen über ein Molekül auf DNA-, RNA- und Proteinebene.
- In vivo-Überprüfung von Hypothesen, die an Zelllinien oder in Tierversuchen erarbeitet wurden, an Gewebeproben von Patienten.
- Überprüfen von Ergebnissen, die mit einer limitierten Anzahl von Gewebeproben durch cDNA-Microarrays gewonnen wurden, an einer repräsentativen Probenanzahl im TMA.
- Erforschung eines Auftretens von mutmaßlichen Tumorgenen und deren Produkten in verschiedenen Tumorstadien.

- Herstellung einer Verbindung zwischen molekularbiologischen und pathohistologischen Patientendaten.

Darüber hinaus können TMAs auch in vielen anderen Bereichen außerhalb der Tumorforschung angewendet werden. So können Arrays mit Geweben von Tieren oder Arrays zur Altersforschung hergestellt werden (KALLIONIEMI et. al., 2001)

Auch der Einsatz von TMAs in der Lehre ist sinnvoll, da die einzelnen Proben immer einen charakteristischen Ausschnitt des Gewebes repräsentieren und man an ihnen exemplarisch gewebespezifische Details zeigen kann. Ein weiteres Anwendungsgebiet der TMAs findet sich in der Entwicklung, Testung und Verbesserung neuer Antikörper und Färbemethoden, insbesondere wenn man TMAs mit normalen Gewebeproben nutzt. TMAs sind weiterhin gut geeignet, um Patientendaten von Gewebeproben zu anonymisieren (BUBENDORF et al., 2001)

## 1.9 Zielsetzung

Maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches gehören weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen und sind aufgrund der späten Diagnose mit einer schlechten Prognose assoziiert. Für eine erwünschte Frühdiagnostik dieser Tumorentität sind bisher jedoch nur sehr wenige geeignete molekulare Biomarker verfügbar.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Rad51-Gehalt einer Krebszelle die Therapiemöglichkeit dieses Krebses beeinflusst. Neueste Studien besagen, dass eine Überexpression von Rad51 in den Zellen zu einer Resistenz gegenüber ionisierender Strahlen führt (VISPÉ et al 1998). In diesen Zellen kommt es zu einer erhöhten homologen Rekombination (VISPÉ et al 1998). In verschiedenen malignen Tumoren konnte eine Rad51-Überexpression nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind das Pankreaskarzinom (Maacke et al., 2000b), das Mammakarzinom (Maacke et al., 2000a) und das Bronchialkarzinom (Qiao et al., 2005). Darüber hinaus korreliert das Ausmaß der Rad51-Überexpression in Mammakarzinomen mit dem histologischen Grading (MAACKE et al., 2000a), bei Bronchialkarzinomen mit der Überlebenszeit (QIAO et al., 2005).

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es herauszufinden, ob

- 1.) in Kopf-Hals-Tumoren eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und einer möglichen Rad51-Überexpression besteht,
- 2.) es einen Zusammenhang zwischen Rad51-Expression und dem Überleben des Patienten bzw. dem Entstehen eines Rezidivs gibt,
- 3.) eine mögliche Rad51-Überexpression mit Parametern wie „Grading“ , Ki67 oder P53 korreliert.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

In dieser Arbeit wurden Kopf-Hals-Tumore von 452 Patienten untersucht, die im Zeitraum von 1996 bis 2006 in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Das mediane Alter der 334 Patienten und 118 Patientinnen lag bei 54,5 Jahren, die Altersspanne reichte von 20 bis 89 Jahren.

Die Daten wurden retrospektiv aus den Krankenakten der Patienten entnommen. Bei der Auswertung der Krankenakten wurde auf folgende Daten besonderer Wert gelegt: Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisierung, Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung, Grading R-Status, rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben.

Das Tumorstadium der Patienten wurde gemäß der TNM-Klassifikation der International Union Against Cancer (UICC) von 1997 ermittelt. Die Klassifikation erfolgte nach Abschluss der chirurgischen Therapie und histopathologischer Begutachtung der Karzinome. Ausschlaggebend war das diagnostizierte pathologische pTNM-Stadium.

Von sämtlichen Patienten wurden anhand der E-Nummern die HE-Schnitte aus dem Archiv des Instituts für Pathologie herausgesucht. Nach lichtmikroskopischer Begutachtung und Beurteilung durch einen Pathologen ( Dr. Til Clauditz) des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Eppendorf, wurden die tumorreichsten HE-Schnittpräparate ausgewählt und die entsprechenden Paraffinblöcke aus dem Archiv herausgesucht. Diese wurden erneut auf ausreichendes Tumormaterial untersucht. Tumorfremde Schnittpräparate wurden dementsprechend zurücksortiert.

### **2.2 TMA-Herstellung**

Die für diese Arbeit ausgewählten in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden aus dem Archiv der Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf entnommen. Die Paraffin-Gewebeblöcke wurden anschließend anhand der korrespondierenden HE-Schnitte gemeinsam mit Dr. Til Clauditz (Pathologie UKE) erneut histopathologisch beurteilt. Hierbei wurde neben der histologischen

Beschreibung und diagnostischen Einordnung die Markierung eines repräsentativen Areals für die anschließende Tissue-Micro-Array-Herstellung vorgenommen. Zur Identifizierung repräsentativer Tumorregionen wurden zur TMA-Herstellung erneut HE-gefärbte Schnitte der Paraffinblöcke erstellt, an denen die abschließende Beurteilung vorgenommen wurde. Die tumorrepräsentative Region wurde mit einem Fineliner unter dem Lichtmikroskop auf dem Objektträger markiert und die Markierung auf den entsprechenden Paraffinblock übertragen. Als nächstes wurden aus den markierten Gewebelöcken die relevanten Gewebebezirke ausgestanzt. Zuvor wurden Paraffinblöcke ohne Gewebe angefertigt und aus diesen die für die Tumorproben gewünschte Anzahl an Paraffinzylindern ausgestanzt. In die so entstandenen zylindrischen Hohlformen wurde dann jede ausgestanzte Tumorgewebeprobe unmittelbar übertragen. Um die Anordnung der Gewebeproben festzulegen und zu dokumentieren, wurde nun mit Hilfe des Programms „Excel“ eine Datenmaske angelegt.

Auf das Herstellungsverfahren der TMA's wurde bereits im Kapitel 3.1.2 detaillierter eingegangen.

Die 452 Gewebezyylinder wurden auf drei TMA-Blöcke verteilt, von denen jeder zwischen 105 und 222 Tumorproben enthielt. Jeder TMA-Block enthielt außerdem verschiedenen Kontrollgewebe.

Das Kontrollgewebe für diesen TMA-Block setzt sich gemäß Tabelle 3 zusammen. Anhand der Anfärbung dieser Kontrollspots konnte die Qualität der anschließend durchgeführten Spezialfärbungen überprüft werden.

**Tabelle 3: Standard-Kontrollgewebe**

Standard-Kontrollgewebe	Anzahl (spots)
Larynx	11
Lymphknoten	4
Lunge	4
Herzmuskel	4
Hypopharynx	3
Tonsille	3
Zunge	3
Endometrium	2

Haut	2
Skelettmuskulatur	2
Kolonmucosa	2
Magen	2
Prostata	2
Leber	2
Niere	2
Epiglottis	1

## 2.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse von Rad51 wurde der monoklonale Maus-Antikörper Rad51 (Clone 3F326, USBiological, USA) in der Verdünnung 1:50 (pH7,8) verwendet. Zum Nachweis der Proteinprodukte des p53 Gens wurde ein monoklonales Maus-Anti-Human p53 Protein, DO-1 (CAT OP43, Calbiochem) in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Um die Expression des Antigen Ki-67 darzustellen, wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper (Clone MIB-1, Code M724, DakoCytomation, Dänemark) in der Verdünnung 1:400 benutzt.

### 2.3.1 Manuelle Vorbereitung

Die in 4,5%igem, neutral gepuffertem Formalin fixierten Gewebeproben wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, danach mittels Xylol vom Alkohol befreit und anschließend in maximal 60 °C warmes Paraffin eingebettet.

Danach wurden 4-5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei 60 °C eine Stunde lang an der Luft getrocknet.

### 2.3.2 Entparaffinisierung

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten müssen vor dem Färben entparaffiniert und rehydriert werden. Dieser Schritt ist notwendig, um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen. Verbleibende Paraffinreste im Gewebe führen dazu, dass der Primärantikörper an diesen Stellen das Antigen nicht erkennen kann und es zu vermehrt unspezifischen Anfärbung kommt. Zur Entparaffinisierung wurden die auf Raumtemperatur abgekühlten Schnitte zwei Mal für fünf Minuten in Xylol inkubiert. Danach erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2x drei Minuten 100%iges Ethanol, 2x drei Minuten 95%iges Ethanol). Abschließend wurden die Objektträger in Aqua dest. gespült.

### 2.3.3 Färbeprotokoll

#### **Schritt 1: Epitopdemaskierung**

Nach der Entparaffinisierung erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, um die ursprüngliche Form der Proteine wiederherzustellen und ein eindeutiges Färbeergebnis zu garantieren. Während der Fixierung, meistens mit Formalin, entstehen Aldehydvernetzungen, die eine Bindung des Antikörpers verhindern können. Die dreidimensionale Struktur eines Antigens kann sich ebenfalls so verändern, dass es für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein kann (Antigenmaskierung).

Für die Epitopdemaskierung von Ki67 und Rad51 wurde ein Liter Epitope Retrieval Solution (pH 9; DAKO S2367) mit einer Citratpufferkonzentration von 0,1 mol/l im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, in Färbetröge gefüllt und in einem Dampfgerar erwärmt. Die entparaffinierten Schnitte wurden dann in die vorgewärmte Epitopdemaskierungslösung gelegt und 20 Minuten bei 98 °C inkubiert. . Nach der Inkubation wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in der Epitopdemaskierungslösung 20 Minuten abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS-Puffer (DAKO S3006; 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) gespült und bis zum Färben 5-20 Minuten in Waschpuffer eingeweicht. Die Epitopdemaskierung von p53 erfolgte auf die gleiche Weise. Allerdings erfolgte die Inkubation hier in einem

TEC - Puffer (TRIS-EDTA-Citrat) mit einem pH von 7,8. Die Zusammensetzung des TEC - Puffers kann der Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des TEC - Puffers**

TEC – Puffer Stammlösung (1 Liter)	
Ansetzen der Stammlösung:	
Trizma base (Sigma T 1503 – 1 kg)	5,00 g
EDTA (Merck 1.08418.0250)	10,00 g
Tri Natrium – Citrat (Sigma C 0909-100 g)	6,40 g
Mit 1 mol HCL auf pH 7,8 einstellen; es werden ca. 3-4 ml benötigt.	
Ansetzen der Gebrauchslösung:	
50 ml TEC + 950 ml Aqua dest.	

### **Schritt 2: Verarbeitung auf dem „Autostainer“**

Die eigentliche immunhistochemische Färbung wurde mit dem Dako (Glostrup, Denmark) REAL™ EnVision Detection System Peroxidase/ DAB+, Rabbit/Mouse (Code 5007) im DAKO Autostainer gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Der Ablauf der Schritte war wie folgt:

- 1x spülen mit Waschpuffer (DAKO REAL™ Substrate Buffer)
- 100 µL Peroxidase-Blocking Reagent (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 10 Minuten
- 1x spülen mit Waschpuffer
- 100 µL primärer Antikörper: 25 Minuten
- 1x spülen mit Waschpuffer
- 100 µL Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (peroxidasekonjugiertes Polymer mit sekundären Ziegenantikörpermolekülen, das auch Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobulinen enthält): 25 Minuten
- 2x spülen mit Waschpuffer
- 2x 100 µL Dako REAL™ DAB+ Chromogen (5%ige 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloridchromogen-Lösung): 5 Minuten

Nach dem Schritt der Verarbeitung mit Substrat-Chromogen erfolgte das Spülen der Objektträger in Aqua dest.

**Schritt 3: Gegenfärben mit Hämtoxylin**

Nach diesem maschinellen Färbevorgang erfolgte nun eine manuelle Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Dazu wurden die Objektträger aus dem Autostainer entnommen, in ein Hämatoxylinbad eingetaucht und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült.

**Schritt 4: Eindecken der Objektträger**

Abschließend durchliefen die Präparate zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol, damit sie anschließend eingedeckt werden können.

**2.4 Statistische Auswertung**

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt (SPSS Inc., USA). Die Auswahl der Methoden und die Ergebnisse wurden durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: ) überprüft. Um die Korrelation zwischen der Rad51 Expression und den gegebenen kategorisierten Parametern zu ermitteln, wurde der nichtparametrische Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet (SPEARMAN 1904).

Zur Berechnung der Gesamtüberlebenszeit, sowie des rezidivfreien Zeitintervalls wurde der Kaplan-Meier-Schätzer angewendet (KAPLAN, MEIER, 1958). Mit dieser Methode wird der geschätzte Verlauf der Überlebenszeitkurve durch eine fallende Treppenfunktion dargestellt: Die X-Achse zeigt die Überlebenszeit an, die Y-Achse den prozentualen Anteil der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Patienten. Um die Überlebenskurven miteinander zu vergleichen, wurde der p-Wert durch den Log-Rank-Test bestimmt. Unter der Bedingung eines 95%igen Konfidenzintervalls wurden p-Werte  $< 0.05$  als statistisch signifikant gewertet.

Als rezidivfreies Intervall wurde der Zeitraum zwischen Erstdiagnose bis zur histopathologisch gesicherten Diagnose eines Rezidivs definiert. Die Patienten, die bis zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung rezidivfrei waren oder die ohne Tumorrezidiv verstarben, wurden für die statistische Analyse zensiert. Für die Untersuchungen des Gesamtüberlebens wurden die zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung noch lebenden Patienten zensiert. In den Kaplan-Meier-Kurven ist

die Entfernung dieser Daten jeweils durch einen kleinen, vertikalen Strich gekennzeichnet.

### 2.4.1 SPSS

Bei diesem Programm handelt es sich um ein modular aufgebautes Programmpaket zur statistischen Analyse von Daten. Das Basismodul ermöglicht das grundlegende Datenmanagement und umfangreiche statistische und grafische Datenanalysen mit den gängigsten statistischen Verfahren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit für spezielle Anwendungen, etwa Conjoint- oder Zeitreihenanalyse, Zusatzmodule, die auf dem Basismodul aufsetzen zu verwenden. Die Bedienung erfolgt menügesteuert. Es fanden alle klinischen und pathologischen Parameter Verwendung.

### 2.4.2 Kaplan-Meier-Schätzer

Zur Auswertung der Ergebnisse der Färbungen wurden von Seiten der Statistiker des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Das Verfahren soll der Vollständigkeit halber im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Der Kaplan-Meier-Schätzer (KMS) ist ein Verfahren der Methodik von klinischen Studien, das insbesondere im onkologischen Bereich seine Anwendung findet. Entwickelt wurde das Schätzverfahren im Jahre 1958 von Kaplan und Meier (KAPLAN, MEIER, 1958) und gehört als „Kaplan-Meier-Schätzer“ heute zum Standardrepertoire der statistischen Methoden zur Analyse von Ereigniszeiten. Die KMS-Kurve beschreibt eine Überlebensfunktion, auch Survivalfunktion genannt. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob ein Patient zu einem Zeitpunkt  $t$  ereignisfrei ist. Definiert ist der Kaplan-Meier-Schätzer als:

$$S(t) = P(T > t)$$

In der Methodik von klinischen Studien (SCHUMACHER, 2008) wird die Berechnung wie folgt beschrieben. Der erste wesentliche Schritt besteht in der Erstellung des Datenarrays wie in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Erstellung des Datenarrays**

Ereigniszeitpunkt	Anzahl „unter Risiko“	Anzahl Ereignisse
$t_1$	$n_1$	$d_1$
$t_2$	$n_2$	$d_2$
$t_3$	$n_3$	$d_3$
...	...	...
$t_m$	$n_m$	$d_m$

In einem zweiten Schritt werden die Überlebenswahrscheinlichkeiten zu einem Zeitpunkt  $t$ , für  $t = t_1$  geschätzt durch:

$$\hat{S}(t_1) = \frac{(n_1 - d_1)}{n_1}$$

wobei  $(n_1 - d_1)$  die Menge der Patienten angibt, die zum Zeitpunkt  $t_1$  ereignisfrei sind. Diese werden dividiert durch die Anzahl derjenigen, die unmittelbar vor  $t_1$  unter Risiko waren. Mit  $(n_2 - d_2)/n_2$  wird die bedingte Wahrscheinlichkeit geschätzt, den Zeitpunkt  $t_2$  ereignisfrei zu überleben vorausgesetzt, dass  $t_1$  bereits ereignisfrei überlebt wurde. Die Multiplikation beider Terme gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist den zweiten Ereigniszeitpunkt ereignisfrei zu überleben:

$$\hat{S}(t_2) = \frac{n_1 - d_1}{n_1} \times \frac{n_2 - d_2}{n_2}$$

Alle anderen Wahrscheinlichkeiten werden analog dazu berechnet. Allgemein mathematisch ausgedrückt ergibt sich für die Berechnung des Kaplan-Meier-Schätzers also die Wahrscheinlichkeit einen Zeitpunkt  $t$  ereignisfrei zu überleben:

$$\hat{S}(t) = \frac{n_1 - d_1}{n_1} \times \frac{n_2 - d_2}{n_2} \times \dots \times \frac{n_t - d_t}{n_t} = \prod_{t_i < t} \left(1 - \frac{d_t}{n_t}\right)$$

### **2.4.3 Log-Rank-Test**

Der Log-Rang-Test gehört zu den nichtparametrischen Verfahren und ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche, wie z.B. der Vergleich zweier Therapien in einer klinischen Studie (BENDER et al., 2007). Der etwas ungewöhnliche Name Log-Rang erklärt sich daher, dass sich das Verfahren aus einem Test herleiten lässt, der auf dem Logarithmus der Ränge der Daten basiert. Der Log-Rang-Test lässt sich auch verwenden, wenn mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden sollen. Hingegen werden für die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Einflussvariablen multifaktorielle Methoden benötigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Es wurden 452 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereiches analysiert. Daten zu Alter, Geschlecht, Stadium und Grading sind in Tabelle 6 aufgeführt.

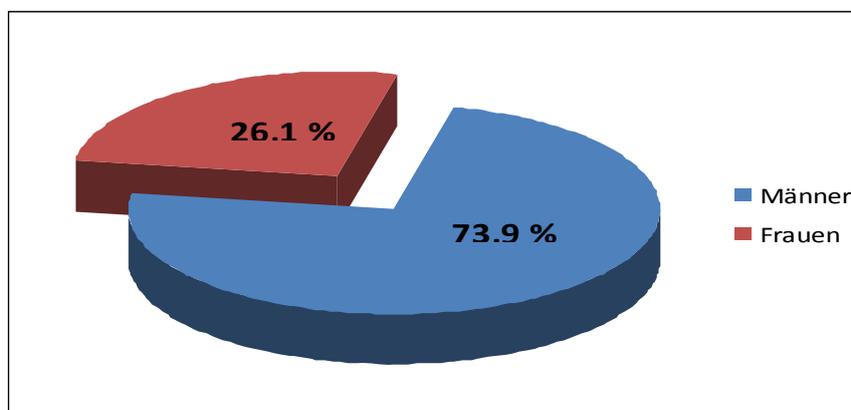
**Tabelle 6: Daten des Patientenkollektivs**

<b>Klinisch-pathologische Parameter des Patienten-Kollektivs</b>	
Anzahl der Patienten	
Gesamt	n = 452
Männer / Frauen	334 / 118
Alter (in Jahren)	
Mittelwert	60
Spannweite	20 – 89
T-Stadium (445 Daten vorhanden)	
T1	103 (23,2%)
T2	133 (29,9%)
T3	79 (17,7%)
T4	130 (29,2%)
N-Stadium (445 Daten vorhanden)	
N0	219 (49,2%)
N1	68 (15,3%)
N2	134 (30,1%)
N3	24 (5,4%)
M-Stadium (439 Daten vorhanden)	
M0	414 (94,3%)
M1	25 (5,7%)
Grading (445 Daten vorhanden)	
G1	31 (7,0%)
G2	318 (71,4%)
G3	92 (20,7%)
G4	4 (0,9%)
UICC-Klassifikation (220 Daten vorhanden)	
1	32 (14,5%)
2	37 (16,6%)
3	43 (19,4%)
4	110 (49,5%)

Das Kollektiv umfasste 334 (73,9%) Männer und 118 (26,1%) Frauen (Abbildung 5). Das Durchschnittsalter des kompletten Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 60 Jahre (Median: 54,5 Jahre). Der älteste Patient war 89 und der jüngste Patient 20 Jahre alt.

Die Männer waren im Durchschnitt 59,3 Jahre alt, die Frauen 60,5 Jahre. Der Median lag bei den Männern bei 63,5 Jahren, bei den Frauen bei 54,5 Jahren.

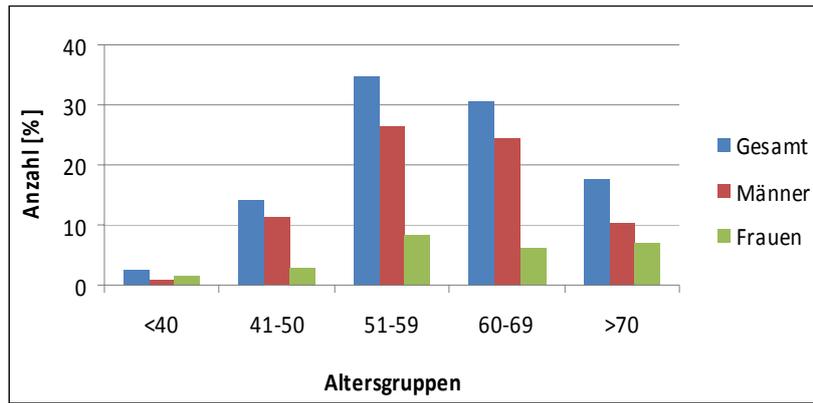
Bei den Männern ließ sich erkennen, dass die Häufigkeit der Erkrankungen in der sechsten und siebten Lebensdekade am höchsten war und dann wieder abnahm. Bei den Frauen war sie von der sechsten bis zur achten Lebensdekade konstant. Diese Daten sind in Tabelle 7 und in der Abbildung 6 verdeutlicht.



**Abbildung 5:** Prozentuale Verteilung männlich/ weiblich

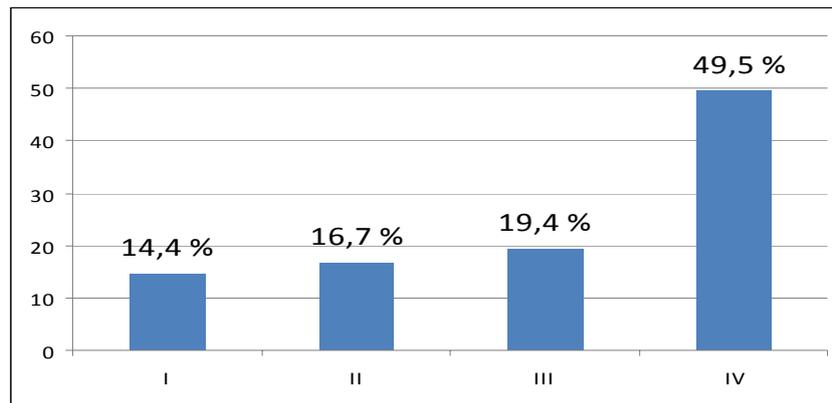
**Tabelle 7: Altersverteilung nach Diagnosestellung**

Alter	männliche Anzahl	männliche %	weibliche Anzahl	weibliche %
< 40 Jahre	5	1,1	7	1,6
40 bis 49 Jahre	50	11,3	13	3
50 bis 59 Jahre	117	26,4	37	8,3
60 bis 69 Jahre	109	24,6	27	6,1
> 70 Jahre	46	10,4	32	7,2



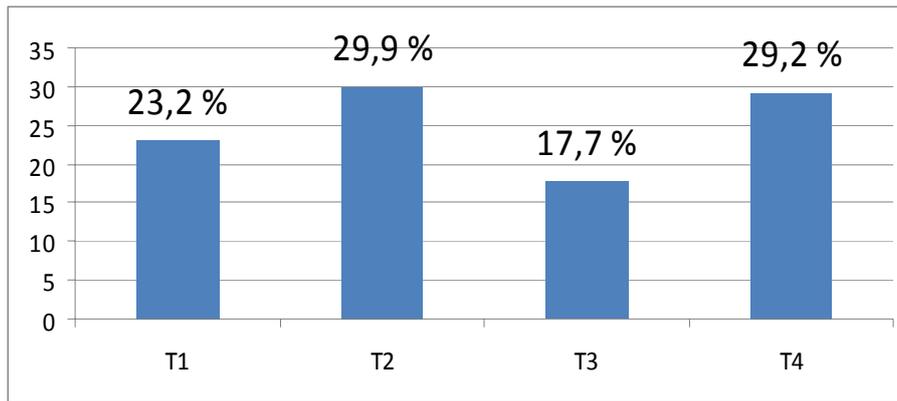
**Abbildung 6:** Altersverteilung bei Diagnosestellung

Nach der UICC-Klassifikation befanden sich 32 (14,5%) Patienten in Stadium I, 37 (16,6%) in Stadium II, 43 (19,4%) in Stadium III und 110 (49,5%) in Stadium IV (Abbildung 7). Über 230 (50,9%) Patienten fehlen die Angaben zum Tumorstadium.



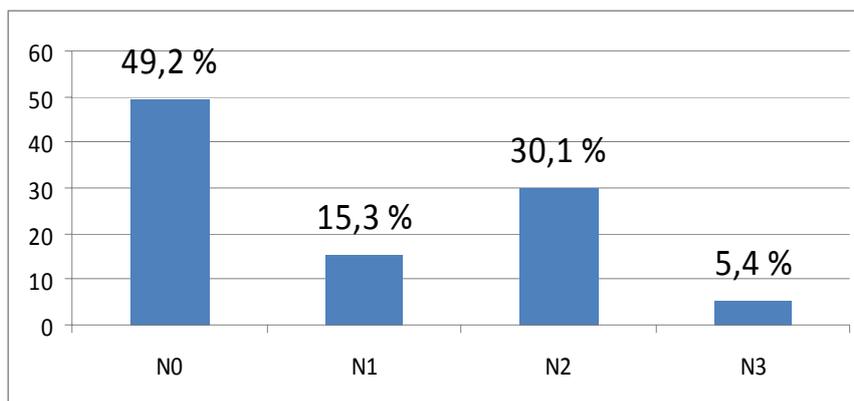
**Abbildung 7:** Verteilung der Tumorstadien (n=220)

Nach dem TNM-Stadium wurden 103 (23,2%) Karzinome dem T-Stadium T1, 133 (29,9%) T2, 79 (17,7%) T3 und 130 (29,2%) T4 zugeordnet (Abbildung 8). In 7 (1,5%) Fällen fehlte das T-Stadium.



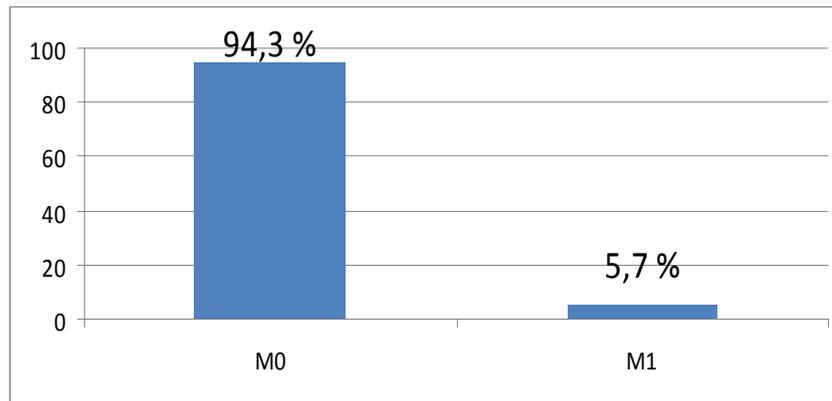
**Abbildung 8:** Verteilung der T-Stadien

Der Lymphknotenstatus war bei 219 (49,2%) Karzinomen N0, bei 68 (15,3%) N1, bei 134 (30,1%) N2 und bei 24 (5,4%) N3 (Abbildung 9). In 7 (1,5%) Fällen fehlte das N-Stadium.



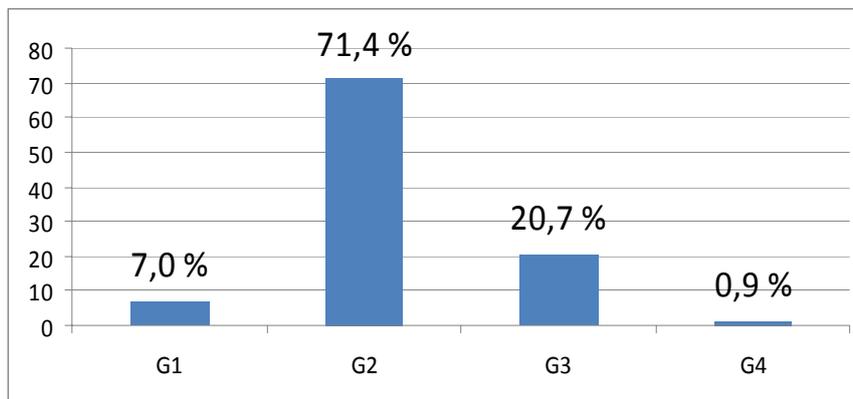
**Abbildung 9:** Verteilung der N-Stadien

Fernmetastasen wurden bei 414 (94,3%) Karzinomen nicht nachgewiesen, die somit im M0 Stadium klassifiziert werden. Bei 25 (5,7%) Karzinomen wurde das Stadium M1 bewertet (Abbildung 10). In 13 (2,9%) Fällen fehlte das M-Stadium.



**Abbildung 10:** Verteilung der M-Stadien

Das histologische Tumorgrading zeigte bei 31 (7%) Fällen ein gut differenziertes (G I), bei 318 (71,4%) ein mäßig differenziertes (G II), bei 92 (20,7%) ein schlecht differenziertes (G III) und bei 4 (0,9%) ein undifferenziertes Karzinom (Abbildung 11). Bei 7 (1,5%) Patienten fehlen die Angaben zum Tumorgrading.



**Abbildung 11:** Verteilung des Grading

### 3.2 Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Rad51-Expression

Um eine Korrelation zwischen der Rad51-Expression und den klinisch-pathologischen Parametern sowie Ki67 und p53 zu ermitteln, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Als Parameter fungierten Alter, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, R-Status und Grading. Alle ausgewerteten Daten finden sich tabellarisch im Anhang dieser Arbeit.

Eine signifikante Korrelation der Rad51-Expression in Bezug auf das gesamte Patientenkollektiv bestand in dieser Untersuchung mit der Tumorgröße ( $p=0,021$ ) und den Lymphknotenmetastasen ( $p=0,024$ ).

Es konnte keine Korrelation zwischen der Rad51-Expression und Alter, Fernmetastasen, R-Status oder Grading der Patienten gefunden werden.

Es erfolgt auch eine Korrelationsanalyse für die einzelnen Tumorentitäten. Dabei konnte für Mundhöhlenkarzinome keine Korrelation zwischen der Rad51-Expression und Alter, Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, R-Status oder Grading der Patienten gefunden werden.

Für die untersuchten Hypo-/Oropharynxkarzinome ließ sich zwischen der Rad51-Expression und der Tumorgröße eine Tendenz feststellen, die aber nicht statistisch signifikant war ( $p=0,076$ ). In Bezug auf die Larynxkarzinome bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Rad51-Expression und den Lymphknotenmetastasen ( $p=0,009$ ). Zwischen der Rad51-Expression und dem Grading ließ sich eine Tendenz erkennen, die aber statistisch nicht signifikant war ( $p=0,060$ ).

Ebenfalls konnte zwischen Rad51 und Ki67 sowie p53 sowohl beim Gesamtkollektiv als auch bei den einzelnen Tumorentitäten keine Korrelation festgestellt werden. Allerdings korreliert Ki67 im Gesamtkollektiv mit einem p-Wert von 0,012 signifikant mit p53. Bei den Mundhöhlenkarzinomen korreliert Ki67 mit einem p-Wert von 0,014 ebenfalls signifikant mit p53. Weiterhin konnte bei den Larynxkarzinomen eine signifikante Korrelation zwischen Ki67 und den Lymphknotenmetastasen gefunden werden ( $p=0,049$ ). Außerdem gab es bei Mundhöhlenkarzinomen eine signifikante Korrelation zwischen p53 und den Lymphknotenmetastasen ( $p=0,016$ ). Für das Larynxkarzinom ließ sich zwischen p53 und dem R-Status eine Tendenz feststellen, die aber nicht statistisch signifikant war ( $p=0,079$ ).

Zwischen den histologischen und klinischen Parametern gab es signifikante Korrelationen.

#### Gesamtkollektiv:

Die Tumorgröße korrelierte signifikant mit Lymphknotenmetastasen ( $p=0,000$ ) und Grading ( $p=0,001$ ). Es ließ sich zwischen Tumorgröße und Alter ( $p=0,074$ ) sowie Fernmetastasen ( $p=0,069$ ) und R-Status ( $p=0,074$ ) eine Tendenz feststellen, die aber nicht statistisch signifikant war. Die Lymphknotenmetastasen korrelierten

ebenfalls signifikant mit Fernmetastasen ( $p=0,000$ ), R-Status ( $p=0,001$ ) und Grading ( $p=0,005$ ).

#### Tumorentitäten:

In Bezug auf die Mundhöhlenkarzinome korrelierte die Tumorgröße signifikant mit den Lymphknotenmetastasen ( $p=0,000$ ) und dem Grading ( $p=0,005$ ). Es gab auch signifikante Korrelationen zwischen Lymphknotenmetastasen ( $p=0,002$ ) und Fernmetastasen sowie Grading ( $p=0,15$ ).

Bei den Hypo-/Oropharynxkarzinomen korrelierte die Tumorgröße signifikant mit Lymphknotenmetastasen ( $p=0,036$ ). Zwischen Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen ( $p=0,005$ ) sowie R-Status ( $p=0,014$ ), bzw. Fernmetastasen mit R-Status ( $p=0,012$ ) bestand eine signifikante Korrelation.

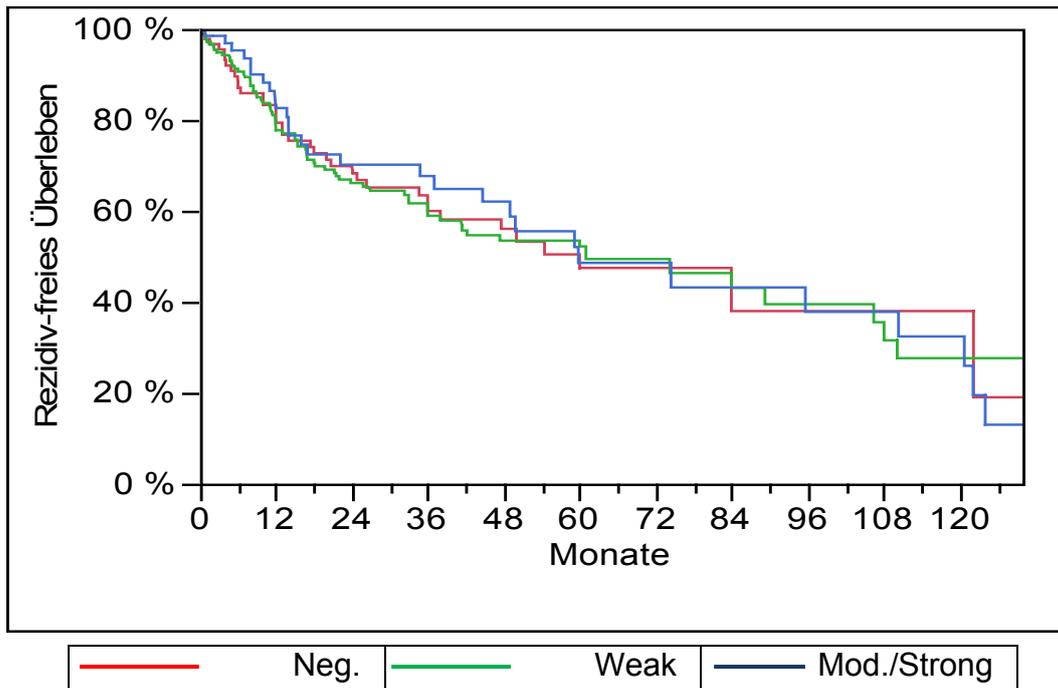
Bei Larynxkarzinomen konnte eine signifikante Korrelation zwischen Alter und Fernmetastasen ( $p=0,011$ ) festgestellt werden. Die Tumorgröße korrelierte signifikant mit Lymphknotenmetastasen ( $p=0,000$ ) und Grading ( $p=0,018$ ). Es ließ sich zwischen Tumorgröße und Fernmetastasen ( $p=0,069$ ) sowie zwischen Lymphknotenmetastasen und R-Status ( $p=0,053$ ) eine Tendenz feststellen, die aber nicht statistisch signifikant war.

### **3.3 Überlebenszeitanalyse**

In Abbildung 12 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten bei immunhistochemisch negativen sowie schwachen und moderaten/starken Rad51-Staus dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,9209$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	90	38	52	68,2909	60	0,9209
weak	176	77	99	71,7374	61	
mod/strong	66	30	36	72,9612	59,814	
Kombiniert	332	145	187	71,8192	61	

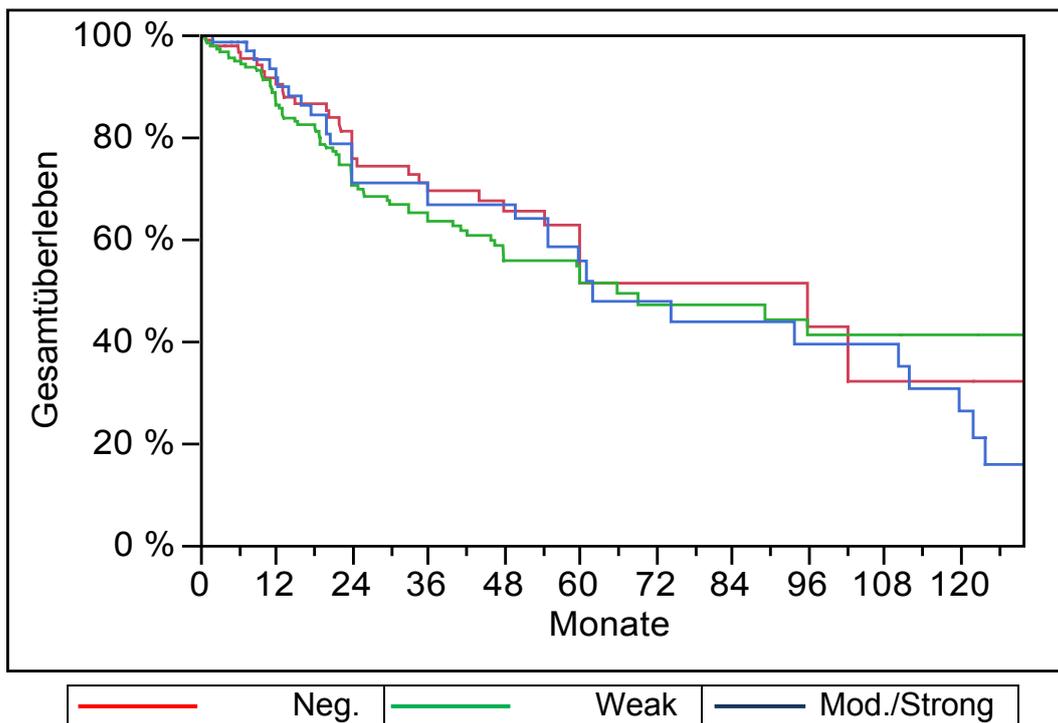


**Abbildung 12:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren

In Abbildung 13 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patienten bei immunhistochemisch negativen sowie schwachen und moderaten/starken Rad51-Staus dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,7826$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

RAD51	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	90	32	58	67,8	96,0	0,7826
weak	179	73	106	75,6	66,0	
mod/strong	67	31	36	71,7	62,0	
Kombiniert	336	136	200	75,2	66,0	

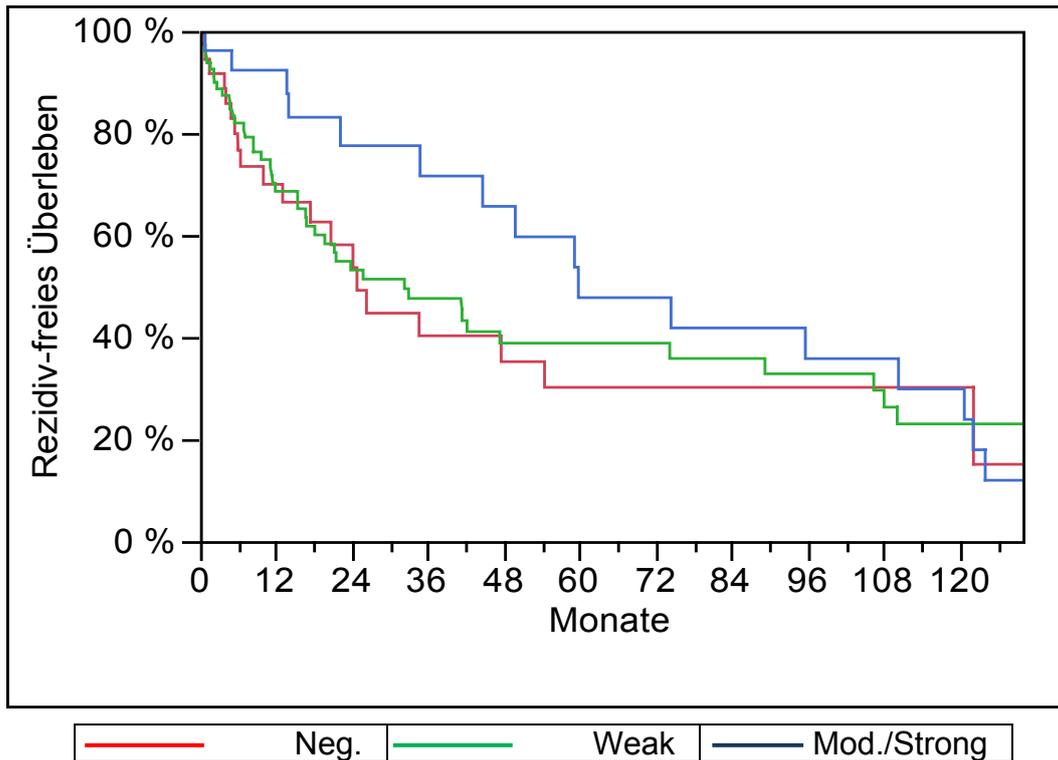


**Abbildung 13:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Kopf-Hals-Tumoren

In den Abbildungen 14 bis 16 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten bei Rad51-positiven sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlen-, Hypo-/Oropharynx- und Larynxkarzinomen dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte weder beim Mundhöhlenkarzinom ( $p=0,4038$ ) noch beim Hypo-/Oroharynxkarzinom ( $p=0,6502$ ) und Larynxkarzinom ( $p=0,4038$ ) festgestellt werden. Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in den Tabellen 10 bis 12 aufgeführt.

**Tabelle 10: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

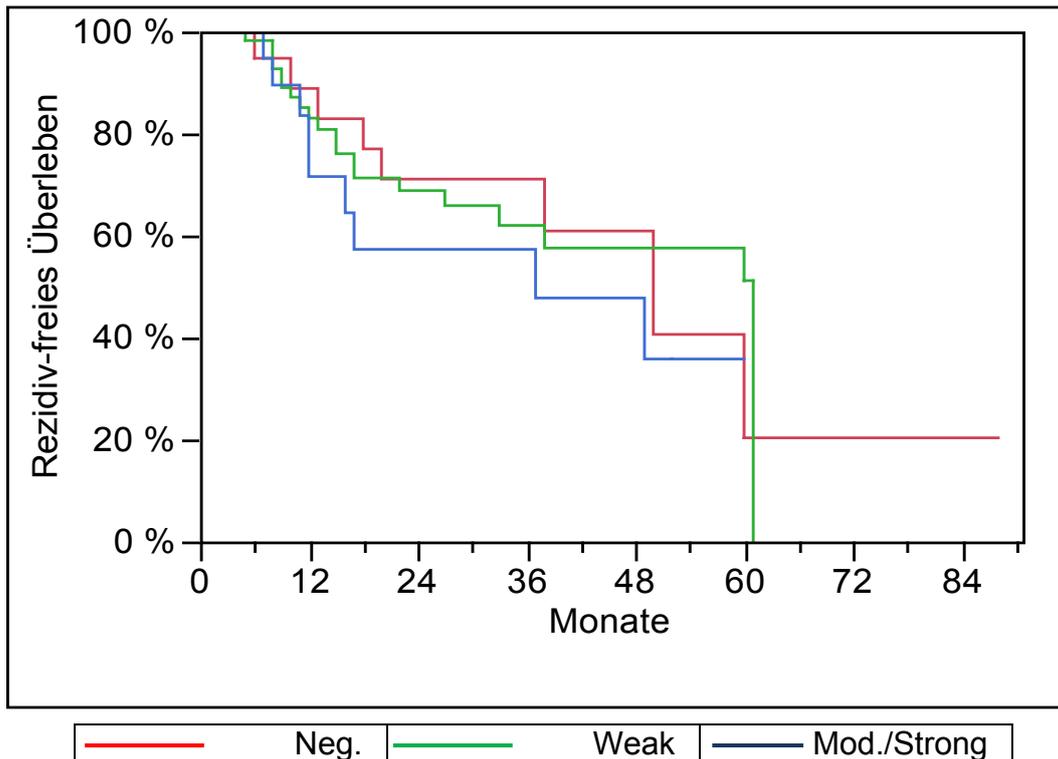
Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	36	21	15	51,6395	24,832	0,4038
weak	82	48	34	58,9436	32,329	
mod/strong	26	17	9	74,7127	59,814	
Kombiniert	144	86	58	60,2827	41,429	



**Abbildung 14:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen

**Tabelle 11: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

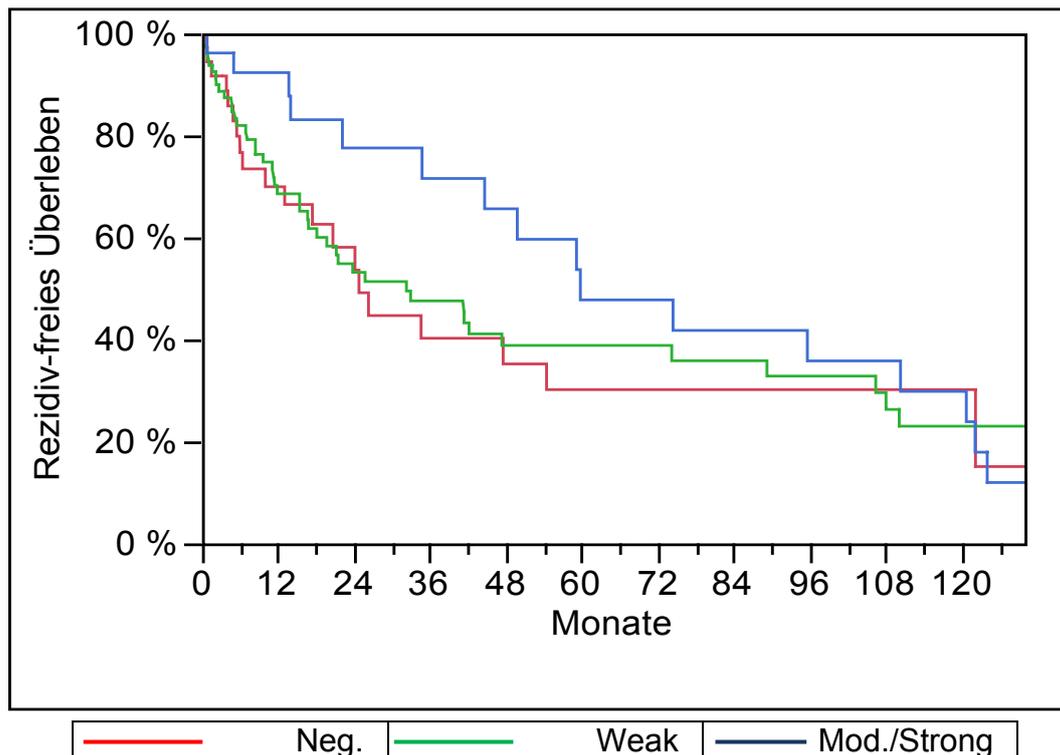
Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	23	8	15	42,2961	50	0,6502
weak	58	20	38	42,6753	61	
mod/strong	26	9	17	32,153	37	
Kombiniert	107	37	70	41,3481	50	



**Abbildung 15:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen

**Tabelle 12: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	36	21	15	51,6395	24,832	0,4038
weak	82	48	34	58,9436	32,329	
mod/strong	26	17	9	74,7127	59,814	
Kombiniert	144	86	58	60,2827	41,429	

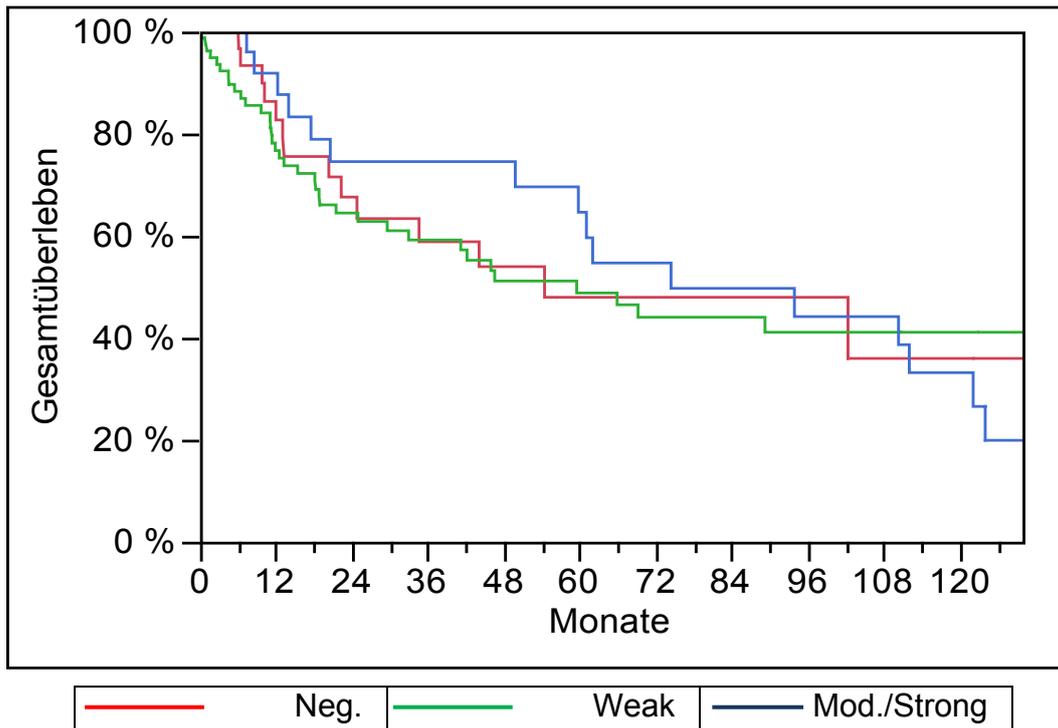


**Abbildung 16:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Larynxkarzinomen

In den Abbildungen 17 bis 19 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patienten bei Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlen-, Hypo-/Oropharynx- und Larynxkarzinomen dargestellt. Auch hier bestand sowohl beim Mundhöhlenkarzinom ( $p=0,9627$ ) als auch beim Hypo-/Oropharynxkarzinom ( $p=0,666$ ) und beim Larynxkarzinom ( $p=0,9775$ ) keine statistische Signifikanz. Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 13 bis 15 aufgeführt.

**Tabelle 13: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

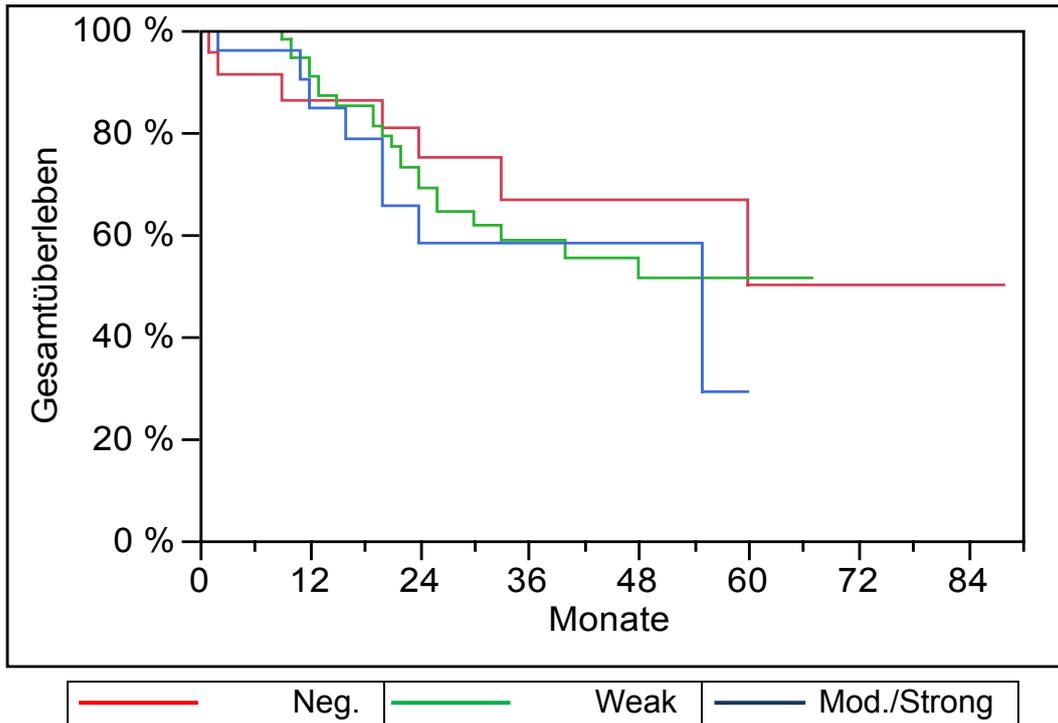
Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	36	14	22	61,3	54,5	0,9627
weak	83	37	46	70,7	59,6	
mod/strong	26	16	10	77,2	74,5	
Kombiniert	145	67	78	72,1	62,0	



**Abbildung 17:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Mundhöhlenkarzinomen

**Tabelle 14: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

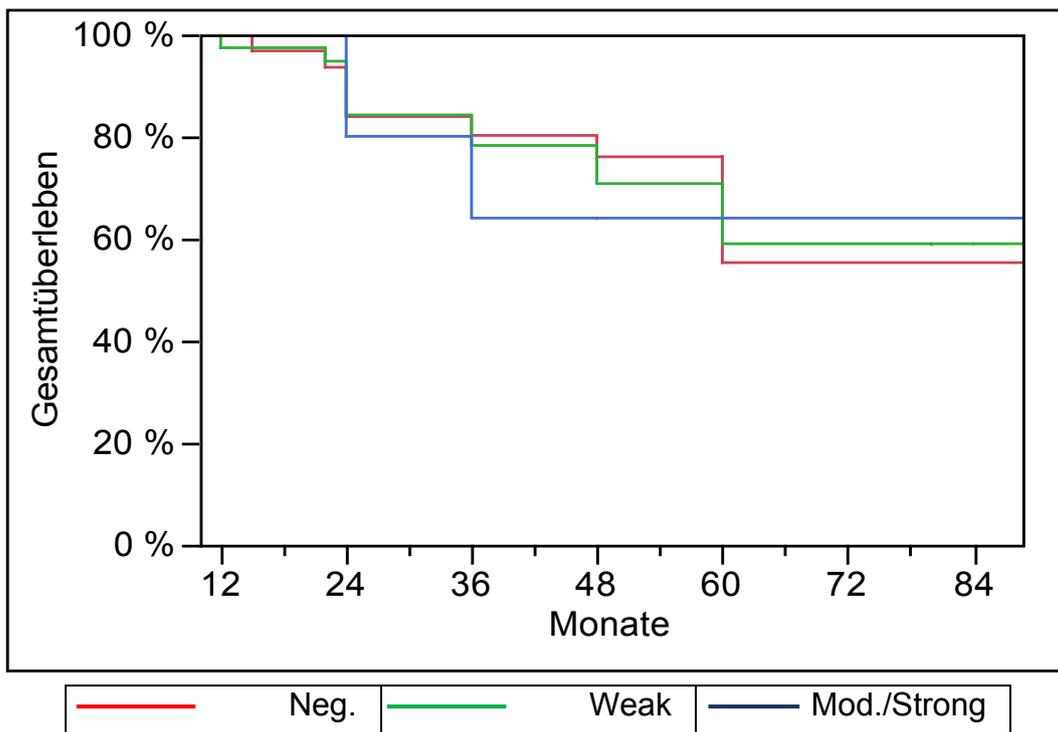
Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	23	7	16	45,8394	.	0,666
weak	58	22	36	36,125	.	
mod/strong	26	9	17	38,7615	55	
Kombiniert	107	38	69	42,6747	60	



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderaten/starken Hypo-/Oropharynxkarzinomen

**Tabelle 15: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

Gruppe	Anzahl gesamt	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	Median-Zeit	p-Wert
negativ	31	11	20	72,4	96,0	0,9775
weak	38	14	24	72,8	96,0	
mod/strong	15	6	9	87,4	120,0	
Kombiniert	84	31	53	77,4	96,0	

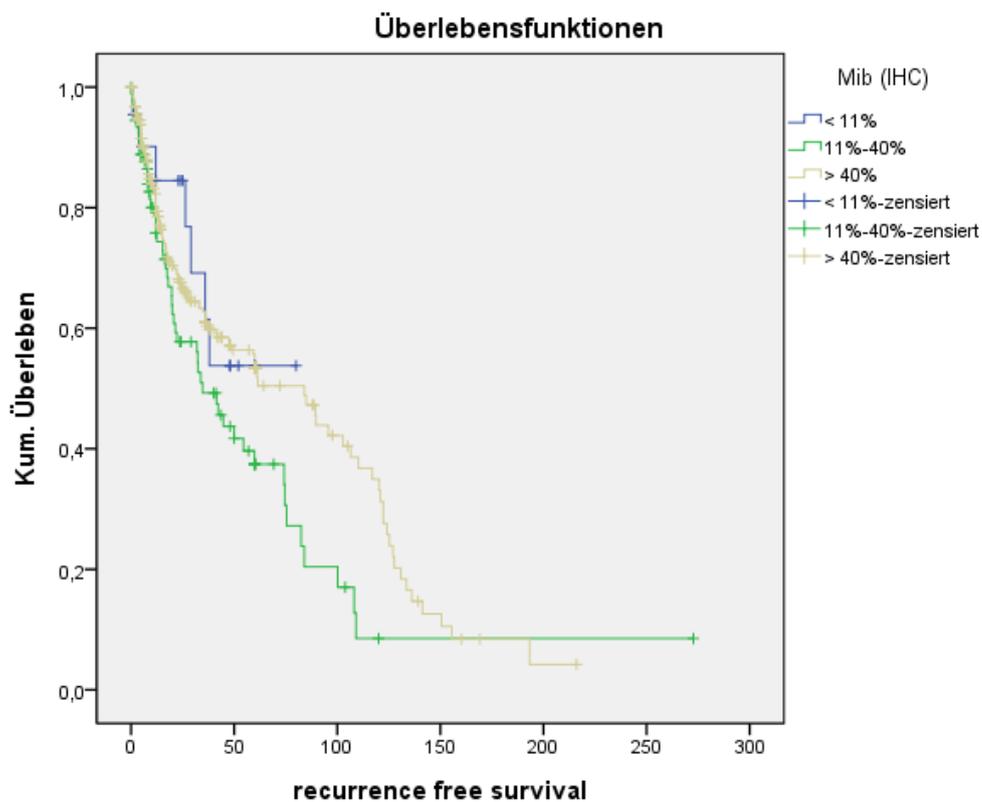


**Abbildung 19:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von Rad51-negativen sowie Rad51-schwachen und Rad51-moderten/starken Larynxkarzinomen

In Abbildung 20 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten mit einer Ki67-Expression von <11%, 11%-40% und >40% dargestellt. Dabei ergab sich, dass Patienten mit einer Ki67-Expression über 40% die längste rezidivfreie Überlebenszeit haben. Mittels Log Rank Test konnte eine statistische Signifikanz festgestellt werden ( $p=0,046$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

Mib (IHC)	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
< 11%	53,927	7,528	39,172	68,682				
11%-40%	62,563	11,519	39,986	85,140	34,685	6,299	22,338	47,032
> 40%	78,415	5,448	67,737	89,093	84,000	10,749	62,931	105,069
Gesamt	75,558	5,723	64,341	86,775	60,000	9,329	41,715	78,285

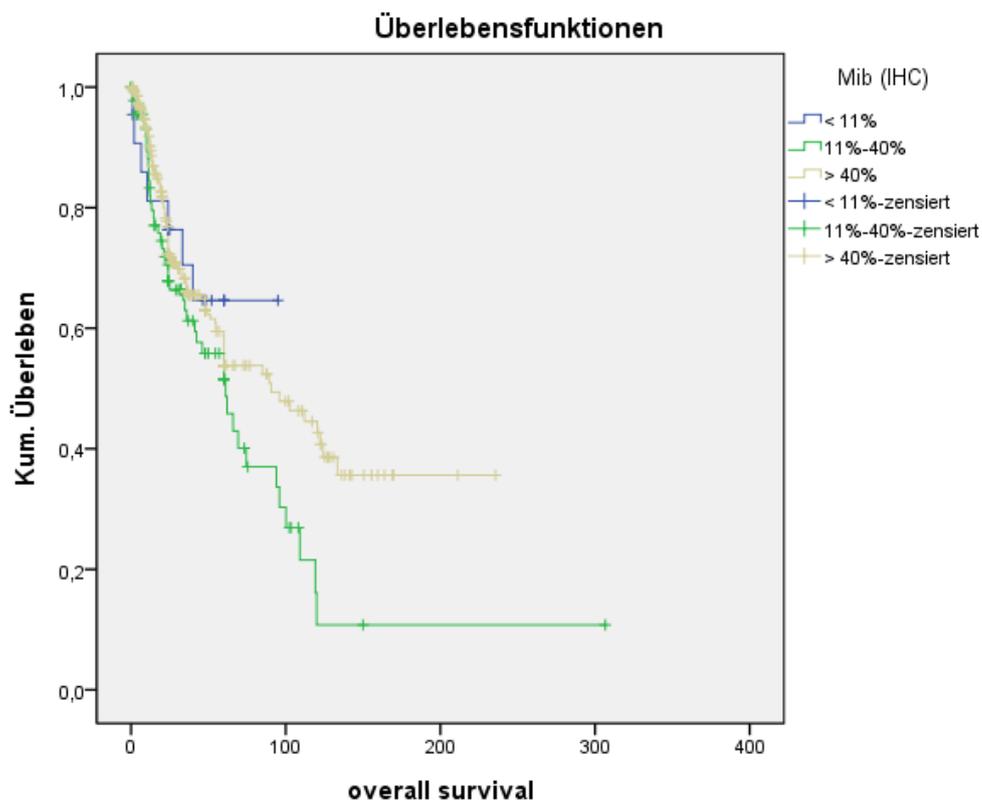


**Abbildung 20:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren

In Abbildung 21 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patienten mit einer Ki-67-Expression von <11%, 11%-40% und >40% dargestellt. Dabei ließ sich eine Tendenz erkennen, nach der die Überlebenszeit bei Tumoren mit einer Ki67-Expression von mehr als 40% längere ist. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,090$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

Mib (IHC)	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
< 11%	67,721	8,452	51,155	84,287	.	.	.	.
11%-40%	82,416	15,119	52,783	112,049	61,085	10,099	41,291	80,879
> 40%	117,007	8,476	100,394	133,620	90,608	15,392	60,439	120,777
Gesamt	126,922	10,189	106,951	146,893	74,532	8,355	58,156	90,907

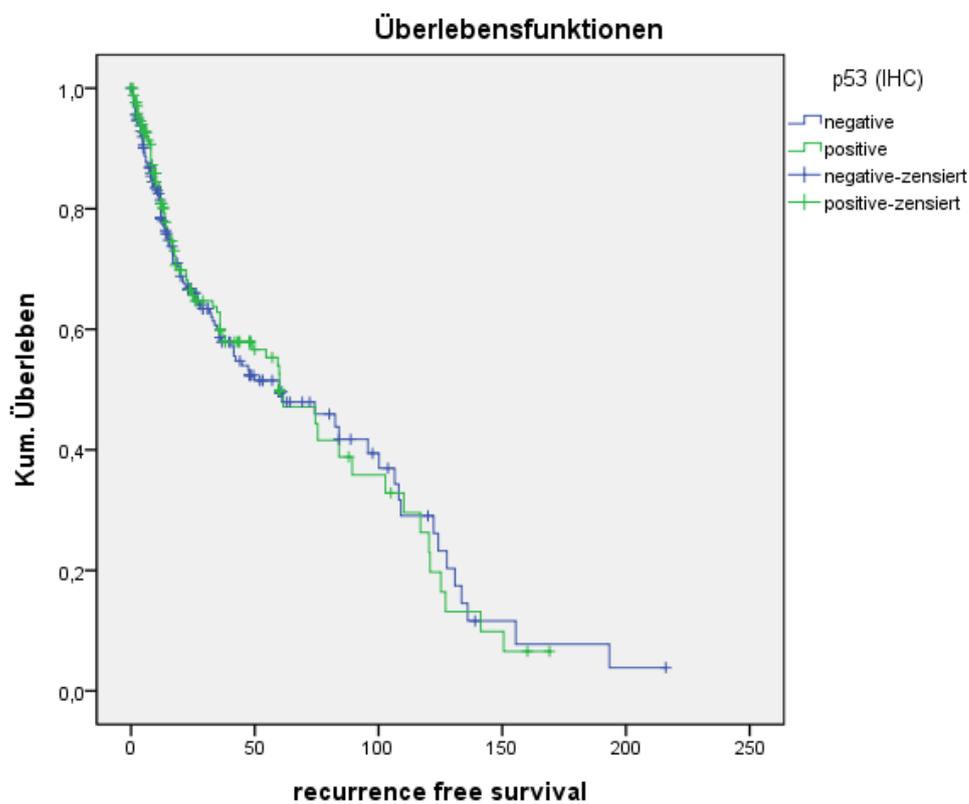


**Abbildung 21:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Mib-Expression bei Kopf-Hals-Tumoren

In Abbildung 22 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten bei immunhistochemisch positiven sowie immunhistochemisch negativen p53-Staus dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,899$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

p53 (IHC)	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere	Obere			Untere	Obere
			Grenze	Grenze			Grenze	Grenze
negative	73,691	6,173	61,592	85,790	60,000	13,970	32,618	87,382
positive	69,563	5,841	58,114	81,013	60,000	8,926	42,505	77,495
Gesamt	72,872	4,577	63,901	81,843	60,000	7,874	44,566	75,434

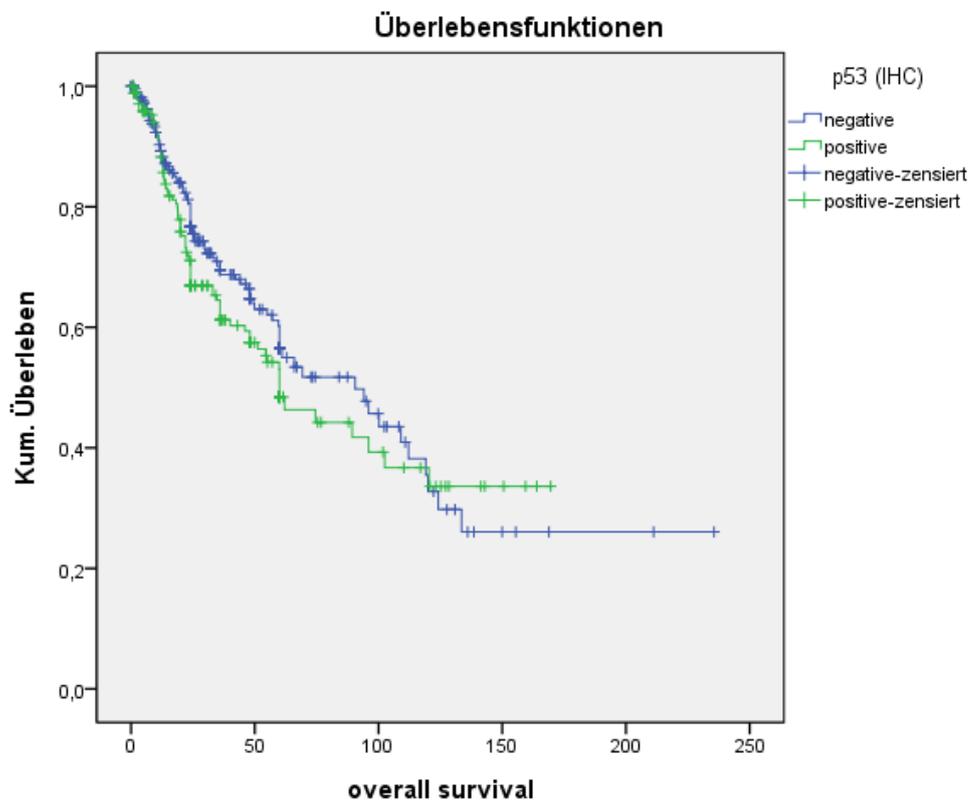


**Abbildung 22:** Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben von p53-positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren

In Abbildung 23 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patienten bei immunhistochemisch positiven sowie immunhistochemisch negativen p53-Staus dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,267$ ). Die mediane und mittlere Überlebenszeit ist in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit**

p53 (IHC)	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
negative	105,658	9,662	86,720	124,596	90,608	15,034	61,141	120,075
positive	84,706	6,652	71,668	97,744	60,000	8,342	43,651	76,349
Gesamt	106,168	7,187	92,083	120,254	69,271	8,545	52,523	86,020



**Abbildung 23:** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von p53-positiven und p53-negativen Kopf-Hals-Tumoren

#### 4 Diskussion

Die Prognose für maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches hat sich trotz des Fortschritts in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie nicht verbessert (KASTENBAUER, 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt durchschnittlich 50% und gehört somit zu den ungünstigsten unter den häufigsten Tumorarten.

Der Hauptprognosefaktor und der ausschlaggebende Faktor bei der Überlebensrate und Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC) ist das Auftreten von Lymphknotenmetastasen (LKM) (MAMELLA et al. 1994; SHINGAKI et al., 1999; FERLITO, 2000). Schon allein die Anwesenheit einer einzigen Lymphknotenmetastase reduziert die Überlebensrate um mindestens 50% (ENEPEKIDES *et al.*, 1999).

Zur Verbesserung der Prognose von Kopf-Hals-Tumoren sind zuverlässige biologische Marker notwendig, die zu einem frühen Zeitpunkt mit dem Tumor assoziiert werden können und somit für eine routinemäßige Frühdiagnose geeignet sind. Ein weiteres Forschungsziel ist es, relevante molekulare Marker als Zielstrukturen für neue Therapieformen zu identifizieren. Obwohl eine große Anzahl von molekularen Markern mit der Prognose von Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht werden, finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen (BRUNDAGE et al., 2002; QIAO et al., 2005). In Anbetracht dieser Tatsache sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Aussagefähigkeit diesbezüglich relevanter Marker experimentell zu überprüfen.

Rad51 ist eines der Schlüsselproteine der homologen Rekombination (HR) und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (MAACKE et al. 2000).

Rad51 spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Die Expression dieses Proteins ist am niedrigsten in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, steigt in der S-Phase an und erreicht in der G<sub>2</sub>/M-Phase ihr Maximum (CHEN et al., 1997). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus eine erhöhte homologe Rekombination und Reparatur stattfindet. Neueste Studien besagen, dass eine Überexpression von Rad51 in den Zellen zu einer Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen in der späten S/G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus führt und es somit zu einer gesteigerten Radioresistenz von Tumorzellen kommt (HANSEN et al., 2003; MAACKE et al., 2000; SLUPIANEK et al., 2001; VISPÉ et al., 1998)

Nur wenige andere Studien haben sich mit der klinischen Signifikanz der Rad51-Überexpression in menschlichen Tumoren beschäftigt. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine Überexpression von Rad51 bereits bei einer Reihe von menschlichen Malignomen der Brust, der Harnblase, des Pankreas und beim Lungenkarzinom nachgewiesen (MAACKE et al., 2000a). In einer dieser Studien über Harnblasenkarzinome konnte eine Korrelation zwischen der Rad51-Überexpression und der Tumorprogression hergestellt werden (HENNING et al., 2003). In einer anderen Studie über Pankreasadenokarzinome wurden in 66% der Fälle eine erhöhte Rad51-Expression festgestellt (MAACKE et al., 2000a). Bei der Untersuchung von sporadischen invasiv-duktalem Mammakarzinomen wurde eine Korrelation zwischen der Rad51 Überexpression und dem histologischen „Tumorgrading“ gefunden (MAACKE et al., 2000b). Qiao et al. führten eine Studie an 383 Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom durch. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit einer hohen Rad51-Expression eine relativ schlechte mediane Überlebensrate hatten. Diese Ergebnisse blieben auch unter Berücksichtigung anderer prognostischer Variablen, wie Staging und histologisches Grading statistisch signifikant. In dieser Studie war die Signifikanz bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom deutlicher als bei denen mit einem Adenokarzinom. Den Autoren dieser Studie lagen keine Informationen über adjuvante Therapien vor, so dass keine Aussage über die Bedeutung der Rad51-Expression als Indikator für Therapieerfolge gemacht werden konnte (QIAO et al., 2005). Li et al. kamen in ihrer Studie zur Rad51-Expression bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu einem ähnlichen Ergebnis. Zwar konnten sie keine signifikante Relation zwischen der Rad51-Expression und klinischpathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung und TNM-Staging feststellen, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Patienten mit einer Rad51 Überexpression eine kleinere mediane Überlebenschance hatten im Gegensatz zu Patienten mit einer geringen Expression (LI et al., 2011).

Aufgrund der relativen Neuheit dieses Prognoseansatzes und der bis dato lückenhaften Dokumentation finden sich jedoch ebenfalls Studien die mit diesem Ansatz nicht vereinbar sind.

So veröffentlichten Yoshikawa et al. die Ergebnisse einer Studie in welcher in fast einem Drittel aller untersuchten sporadischen Mammakarzinome nur ein sehr niedriger Rad51-Gehalt nachgewiesen werden konnte (YOSHIKAWA et al., 2000).

Zusammenfassend kann mit Hinsicht auf den derzeitigen Stand der Wissenschaft folgendes festgestellt werden: Auch wenn der Forschungsansatz vielversprechend ist, können nach dem derzeitigen Stand der Literatur noch keine einheitlichen Erkenntnisse bezüglich der Aussagekraft von Rad51 als Frühdiagnosefaktor getroffen werden.

Als Beitrag zur aktuellen Forschung zur Klärung der Aussagekraft unterschiedlicher Rad51-Konzentrationen bei der Kopf-Hals-Tumordiagnostik, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rad51-Expression in Kopf-Hals-Tumorgewebe mittels TMA immunhistochemisch untersucht.

Primärziel dieser Arbeit war es erstmalig die prognostische Bedeutung von Rad51 bei Kopf-Hals-Tumoren sowie die Bedeutung der Rad51 Expression im Bezug auf Radiotherapie zu untersuchen.

Als ein Kernergebnis der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Normalgewebe, eine Überexpression von Rad51 in Tumorzellkernen von Kopf-Hals-Tumoren deutlich nachgewiesen werden kann.

Anhand der Daten konnte veranschaulicht werden, dass es weder beim rezidivfreien Überleben noch beim Gesamtüberleben einen signifikanten Unterschied zwischen immunhistochemisch negativen, schwachen und moderaten/starken Rad51-Status existiert.

Als weiteres Kernergebnis dieser Arbeit konnte diesbezüglich verdeutlicht werden, dass trotz der Überexpression von Rad51 in Tumorzellkernen von Kopf-Hals-Karzinomen, diese keine prognostische Aussage für den weiteren Krankheitsverlauf erlaubte.

Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit der Patienten mit immunhistochemisch negativem Rad51-Level betrug 60 Monate, bei schwachem Rad51-Level 61 Monate und bei moderatem/starkem Rad51-Level 60 Monate. Die mediane Gesamtüberlebenszeit belief sich bei Rad51-negativen Kopf-Hals-Tumoren auf 96 Monate, bei schwachem Rad51-Level auf 66 Monate und bei moderatem/starkem Rad51-Level auf 62 Monate. Auch bei der Überlebenszeitanalyse der einzelnen Tumorentitäten (Mundhöhle, Hypo-/Oropharynx, Larynx) konnte sowohl beim

rezidivfreien als auch beim Gesamtüberleben keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

In einer weiteren Untersuchung wurde überprüft ob bei Tumoren >T3 und/oder >N1 eine Radiotherapie von Vorteil für die mediane Überlebenszeit ist, was nicht bestätigt werden konnte.

Neben Rad51 wurden ebenfalls der Proliferationsmarker Ki67 und das Tumorsuppressorgen p53 untersucht. Die Analyse der Daten führte zu dem Ergebnis, dass Patienten mit einer hohen Ki67-Expression eine längere rezidivfreie Überlebenszeit hatten als Patienten mit einer niedrigen Ki67-Expression. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit der Patienten mit einer Ki67-Expression von 11% bis 40% betrug 34 Monate, mit einer Ki67-Expression von mehr als 40 % 84 Monate. Dieses Ergebnis war auch statistisch signifikant. Für das Gesamtüberleben konnte eine Tendenz festgestellt werden, nach der die Überlebenszeit bei Tumoren mit einer Ki67-Expression von mehr als 40% länger war. Die mediane Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit einer Ki67-Expression von 11% bis 40% betrug 61 Monate, mit einer Ki67-Expression von mehr als 40 % 90 Monate. Ein statistisch signifikanter Unterschied dieser Daten konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Für p53 konnte gezeigt werden, dass weder beim rezidivfreien Überleben noch beim Gesamtüberleben einen signifikanten Unterschied zwischen immunhistochemisch positiven und immunhistochemisch negativen p53-Status existiert.

Als Schlüsselergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Rad51 zu keiner signifikanten Aussage bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens führt.

Insgesamt bestätigte sich Rad51 in dieser Studie nicht als signifikanter unabhängiger Prognosemarker in Kopf-Hals-Tumoren.

Diesbezüglich muss hier allerdings erwähnt werden, dass bei dem untersuchten Patientenkollektiv keine Unterscheidung bezüglich der Therapiemaßnahmen erfolgte.

## 5 Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches gehören weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen und sind aufgrund der späten Diagnose mit einer schlechten Prognose assoziiert. Für eine erwünschte Frühdiagnostik dieser Tumorentität sind bisher jedoch nur sehr wenige geeignete molekulare Biomarker verfügbar.

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass das humane Rad51-Protein eine zentrale Bedeutung in der Entstehung und Kontrolle von malignem Wachstum hat. Rad51 ist ein Schlüsselprotein der homologen Rekombination, einem wichtigen Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche. Eine Überexpression von Rad51 konnte bereits in Mamma-, Bronchial-, Harnblasen- und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden. Darüber hinaus korreliert das Ausmaß der Rad51-Überexpression in Mammakarzinomen mit dem histologischen Grading, bei Bronchialkarzinomen mit der Überlebenszeit.

Aus diesem Grunde wurde Rad51 in der hier vorliegenden Studie an Kopf-Hals-Tumoren immunhistochemisch untersucht und die Korrelation mit den entsprechenden Patientendaten bezüglich Rezidiv und Überleben überprüft.

Das untersuchte Kollektiv umfasste 452 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Die klinischen Daten ergaben eine Geschlechtsverteilung von 334 (73,9%) Männer und 118 (26,1%) Frauen. Das Durchschnittsalter des kompletten Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 60 Jahre (Median: 54,5 Jahre), wobei Männer im Durchschnitt 59,3 Jahre, die Frauen 60,5 Jahre alt waren. Der Median lag bei den Männern bei 63,5 Jahren, bei den Frauen bei 54,5 Jahren. Der älteste Patient war 89 und der jüngste 20 Jahre alt.

Bei den Männern war erkennbar, dass die Häufigkeit der Erkrankungen in der sechsten und siebten Lebensdekade am höchsten war und dann wieder abnahm. Bei Frauen war sie von der sechsten bis zur achten Lebensdekade konstant.

Als ein Kernergebnis der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Normalgewebe, eine Überexpression von Rad51 in Tumorzellkernen von Kopf-Hals-Tumoren deutlich nachgewiesen werden konnte.

Als weiteres Kernergebnis dieser Arbeit konnte diesbezüglich verdeutlicht werden, dass trotz der Überexpression von Rad51 in Tumorzellkernen von Kopf-Hals-

Tumoren, diese keine prognostische Aussage für den weiteren Krankheitsverlauf erlaubte.

Auch bei der Überlebenszeitanalyse der einzelnen Tumorentitäten (Mundhöhle, Hypo-/Oropharynx, Larynx) konnte sowohl beim rezidivfreien als auch beim Gesamtüberleben keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Als Schlüsselergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Rad51 zu keiner signifikanten Aussage bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens führte.

Insgesamt bestätigte sich Rad 51 in dieser Studie nicht als signifikanter unabhängiger Prognosemarker in Kopf-Hals-Tumoren.

## 6 Literaturverzeichnis

**Alroy I, Yarden Y. (1997):**

The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410: 83-86.

**Al-Sarraf M (2002):**

Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review. *Cancer Control* 9 (5): 387-399.

**Andersen C. L., Monni O., Wagner U., Kononen J., Barlund M., Bucher C., Haas P., Nocito A., Bissig H., Sauter G., Kallioniemi A. (2002):**

High-throughput copy number analysis of 17q23 in 3520 tissue specimens by fluorescence in situ hybridisation to tissue microarrays. *Am J Pathol* 161: 73-79.

**Asakage T, Ebihara S, Kishimoto S, et al. (1999):**

Result of surgical treatment for carcinoma of the tongue. *Head Neck Cancer* 25: 118-122.

**Badache A., Goncalves A. (2006):**

"The ErbB2 signaling network as a target for breast cancer therapy." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11(1): 13-25.

**Barak Y., Juven T., Haffner T., Oren M. (1993):**

mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12: 461-468.

**Barlund M., Forzan F., Kononen J., Bubendorf I., Chen Y., Bittner M. L., Torhorst J., Haas P., Bucher C., Sauter G., Kallioniemi O. P., Kallioniemi A. (2000):**

Detecting activation of ribosomal protein S6 Kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 92: 1252-1259.

**Battifora H. (1986):**

The multitumor (sausage) block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*: 244-248 55.

**Baumann P., Benson F.E., West S.C.(1996):**

Human Rad-51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87: 757-766.

**Baumann P., West S. C. (1997):**

The human Rad-51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* 16: 1598-5206

**Baumann P., West S.C.(1998):**

Role of human Rad-51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *TIBS* 23:247-251.

**Bazley L.A., Gullick W.J. (2005):**

The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer.* 12, 17-27.

**Bender R., Lange S., Ziegler A. (2007):**

Wichtige Signifikanztests. Dtsch Med Wochenschr;137:e24-e25.

**Benson F.E., Stasiak A., West S.C. (1994):**

Purification and characterisation of the human Rad-51 protein, an analogue of E. coli-RecA. Embo J 13: 5764-5771.

**Bier J. (1991):**

Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich, In: Horch HH, Hrsg. 51, Praxis der Zahnheilkunde, Band 10/II: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, München, Urban & Schwarzenberg: 267-359.

**Blume-Jensen P, Hunter T( 2001):**

Oncogenic kinase signalling. Nature, 411: 355-365.

**Bowen C., Bubendorf L., Voeller H. J., Slack R., Willi N., Sauter G., Gasser T. C., Koivisto P., Lack E. E., Kononen J. et al. (2000):**

Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancer correlates with tumor progression. Cancer Res 60: 6111-6115.

**Bubendorf L., Kolmer M., Kononen J., Koivisto P., Mousses S., Chen Y., Mahlamaki E., Schraml P., Moch H., Willi N., Elkahoun A. G., Pretlow T. G., Gasser T. C., Mihatsch M. J., Sauter G., Kallioniemi O. P. (1999):**

Hormone therapy failure in humane prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. J Natl Cancer Inst 91: 1758-1764.

**Bubendorf L., Nocito,A., Moch,H., Sauter,G. (2001):**

Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. J Pathol 195: 72-79.

**Buchhop S., Gibson M.K., Wang X.W., Wagner P., Sturzbecher H.W., Harris C.C. (1997):**

Interaction of p53 with the human Rad51 protein. Nucleic Acids Res 25 (19): 3868-74.

**Burgess A. W., Cho H. S., Eigenbrot C., Ferguson K. M., et al. (2003):**

An open-and shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Mol Cell 12: 541-552.

**Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998):**

Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 282: 1318-1321.

**Carr D. T. (1983):**

Is staging of cancer of value? Cancer 51: 2503-2505.

**Caspers-Merk M. (2002):**

Frauen und Sucht, Seite 17-20, Bundesministerium für Gesundheit, Berlin.

**Castro D. J., Sridhar K. S., Garewal H. S., Mills G. M., Wenig B. L., Dunphy F. R., Costantino P. D., Leavitt R. D., Stewart M. E., Orenberg E. K. (2003):**

Intratumoral cisplatin/epinephrine gel in advanced head and neck cancer: a multicenter, randomized, double-blind, phase III study in North America *Head Neck*, 9: 717-731.

**Chen F., Nastasi A., Shen Z., Brennemann M., Crissmann H., Chen D. J. (1997):**

Cell cycle dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DANN double-strand break repair genes Rad-51 and Rad-52. *Mutation Research* 384: 205-211.

**Chen J. D., Wu X. W., Lin J. Y., Levine A. J. (1996):**

Mdm2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2445-2452.

**Cho H. S., Leahy D. J. (2002):**

Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297: 1330-1333.

**Connell P.P., Jayathilaka, K., Haraf D.J., Weichselbaum R.R., Vokes E.E., Lingen M.W. (2005):**

Pilot study examining tumor expression of Rad51 and clinical outcomes in human head cancer. *Int J Oncology* 28: 1113-1119

**Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E. (1997):**

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241

**Dawson J. P., Berger M. B., Lin C. C., Schlessinger J., Lemmon M. A., Ferguson K. M. (2005):**

Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25: 7734-7742.

**De Risi J., Penland L., Brown P. O., Bittner M. L., Meltzer P. S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J. M. (1996):**

Use of cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14: 457-460

**El Husseiny G., Kandil A., Jamshed A., Khafaga Y., Saleem M., Allam A., Al Rajhi N., Al Amro A., Rostom A. Y., Abuzeid M., Otieschan A., Flores A. D. (2000):**

Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 38: 193-199.

**Enepekides D. J., Sultanem K., Nguyen C., Shenouda G., Black M. J., Rochon L. (1999):**

Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 120: 713-717.

**Esser D., Anke S., Roessner A., Freigang B. (2000):**

Second carcinomas in cancers of the mouth cavity, pharynx and larynx. Clinical, histopathologic and cell kinetic findings. Laryngo-Rhino-Otol.: 478-82.

**Ferguson K. M. (2004):**

Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. BiochemSocTrans 32: 742-745.

**Ferlito A, Rinaldo A. (2000):**

False negative conventional histology of lymph nodes in patients with head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 62: 112-114.

**Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J (1991):**

Assignment of the human Ki-67 gene ( MKI-67) to 10q25-qter. Genomics 11: 467-477.

**Forastiere A. et al. (1994):**

Overview of platinum chemotherapy in head and neck cancer. Semin Oncol 21: 20-27.

**Forastiere A. et al. (2003):**

Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Organ Preservation in Advanced Laryngeal Cancer. New England Journal of Medicine, Vol. 349, No. 22: 2091-2098

**Fries R., Platz H., Wagner R. (1977):**

Karzinome der Mundhöhle. Zur Frage der Abhängigkeit der Prognose von der Lokalisation (Etagen und Bezirke) des Primärtumors. Dtsch Zahn Mund Kiefer Gesichtschirurgie 1: 127-144.

**Fries R., Platz H., Wagner R., Stickler A., Grabner H., Kränzl B. (1979):**

Karzinome der Mundhöhle. Zur Frage der Abhängigkeit der Prognose von Alter und Geschlecht. Dtsch Zahn Mund Kiefer Gesichtschirurgie 3: 193-200.

**Fu K. et al. (2000):**

A radiation therapy oncology group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: First report of RTOG 9003. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 48, No. 1: 7-16

**Gatta G, Sant M, Micheli A, Capocaccia R, Verdecchia A, Barchielli A, Gafa L, Ramazzotti V, Berrino F (1996):**

Survival for digestive system tumors: Italian population-based data and international comparisons, Ann Ist Super Sanita 4: 513-525.

**Gellrich N. –C., Maier W. et al. (2004):**

Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Kopf-Hals-Tumore, Tumorzentrum Freiburg, Universität Freiburg: 11.

**Gerdes J., Dallenbach F., Lennert K. et al. (1983):**

Growth fractions in malignant non-Hodgkin´s lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. Hematol Oncol 2: 365-371.

**Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H. et al. (1984):**

Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715.

**Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991):**

Immunobiochemical and molecular biological characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 867-873.

**Gleich LL, Collins CM, Gartside PS, Gluckman JL, Barrett WL, Wilson KM, Biddinger PW, Redmond KP. (2003):**

Therapeutic decision making in stages III and IV head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129 (1): 26-35.

**Graus-Porta D., Beerli R. R., Daly J. M., Hynes N. E. (1997):**

ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16: 1647-1655.

**Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C. C. (1994):**

Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878.

**Guy P. M., Platko J. V., Cantley L. C., Cerione R. A., Carraway K. L. 3rd. (1994):**

Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(17): 8132-8136.

**Hansen L.T., Lundin C., Spang-Thomsen M., Petersen L.N., Helleday T. (2003):**

The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer* 105 (4): 472-479.

**Harari D., Tzahar E., Romano J., Shelly M., Pierce J. H., Andrews G. C., Yarden Y. (1999):**

Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18: 2681-2689.

**Harari D., Yarden Y. (2000):**

"Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." *Oncogene* 19(53): 6102-14.

**Harris R.C., Chung E., Coffey R. J. (2003):**

EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 284(1): 2-13.

**Hartmann F., Schmits R. (1997):**

Maligne Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, In: *Onkologische Therapie: Leitlinien und Schemata zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Pfreundschuh M., Georg Thieme Verlag.

**Haupt Y., Barak Y., Oren M. (1996):**

Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J.* 15: 1596-1606.

**Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. (1997):**

Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387(6630): 296-299.

**Hess R. (2005):**

Zusammenfassender Bericht des Unterausschusses "Ärztliche Behandlung" des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Bewertung gemäß § 135 Abs. 1 SGB V der Hyperthermie: 189.

**Higashiyama S., Iwabuki H., Morimoto C., Hieda M., Inoue H., Matsushita N. (2008):**

Membraneanchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* 99(2): 214-20.

**Hilger R. A, Scheulen M. E, Strumberg D. (2002):**

The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie.* 25(6): 511-518.

**Hofele C., Joos S., Flechtenmacher C., Bosch X. F., Lichter P., Mühlhing J., Freier K. (2002):**

Möglichkeiten und Chancen der Gewebechiptechnologie bei Kopf-Hals- Tumoren. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 6: 394-401.

**Hofseth L. J., Hussain S. P., Harris C. C. (2004):**

p53: 25 years after its discovery. *Trends in pharmacological sciences;* 25(4): 177-181.

**Hoos A., Urist M. J., Stojadinovic A., Mastorides S., Dudas M., Kuo D., Leung D. H. Y., Brennan M. F., Lewis J. J., Cordon-Cardo C. (2001):**

Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 158: 1245-1251.

**Horvath L., Henshall S. (2001):**

The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 33: 125-129.

**Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M et al. (2000):**

Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. *Mund Kiefer GesichtsChir,* 4: 216-225.

**Hsu F. D., Nielsen T. O., Alkushi A., et al. (2002):**

Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2002; 15: 1374-80.

**Hunt K, Hannah MK, West P (2004):**

Contextualizing smoking: masculinity, femininity and class differences in smoking in men and women from three generations in the west of Scotland *Health Educ Res,* 3: 239-249.

**Hupp T. R., Meek D. W., Midgley C. A., Lane D. P. (1993):**

Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic acids research*; 21(14): 3167-3174.

**Inagi K, Takahashi H, Okamoto M, Nakayama M. Makoshi T, Nagai H. (2002):**

Treatment effects in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Acta Otolaryngol; Suppl*, 547: 25-29.

**Jorisson N. R., Walker F., Pouliot N., Garrett T. P. J., Ward C. W., Burgess A. W. (2003):**

Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research*. 284: 31-53.

**Kallioniemi O. P., Wagner U., Kononen J., Sauter, G. (2001):**

Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10: 657- 662.

**Kanaar R., Hoeijmakers J.H. (1998):**

Genetic recombination. From competition to collaboration. *Nature* 391 (6665): 335, 337-338.

**Kaplan E. L., Meier P. (1958):**

Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assn.* 53: 457-481.

**Karunagaran D., Tzahar E., Beerli R. R., Chen X., Graus-Porta D., Ratzkin B. J., Seger R., Hynes N. E., Yarden Y. (1996):**

ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15(2): 254-264.

**Kastenbauer E., Wollenberg B. (1999):**

In search of new treatment methods for headneck carcinoma. *Laryngorhinootologie* 78: 31-35.

**Klussmann J. P., Weissenborn S., Wieland U., Dries V., Kolligs J., Jungehuelsing M., Eckel H. E., Dienes H. P., Pfister H., Fuchs P. (2001):**

Prevalence, Distribution and viral load of human Papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, 92: 2875-2884.

**Kill I. R. (1996):**

Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, 109: 1253-1263.

**Klussmann H. P., Gultekin E., Weissenborn S., Wieland U., Dries V., Dienes H. P., Eckel H. E., Pfister H., Fuchs P. (2003):**

Expression of p16 Protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am. J. Pathol.*, 162: 747-753.

**Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schramel P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M. J., Sauter G., Kallioniemi O. P. (1998):**

Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med.*, 4: 844-847.

**Krause D., Van Etten R. (2005):**

Tyrosine kinases as targets for cancer therapy, *N.Engl.J.Med.* 353 (2): 172-187.

**Laak E., Hossfeld D. (1998):**

Stellenwert der Chemotherapie in der Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms. Mundhöhlen-Oropharynxkarzinom, Prognose und Realität. aus: Mundhöhlen Oropharynxkarzinom, Prognose und Radikalität: Disputation anlässlich des 48. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Osnabrück/ Hrsg.: Esser: 135-157.

**Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., et al (2001):**

Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921; Erratum in: *Nature*, 412(6846): 565, (2001); *Nature*, 411(6838): 720.

**Lang S., Wollenberg B., Dellian M., Steuer-Vogt K., Schwenzer K., Sautier W., Chulolowski M., Eckel R., Faas I., Wilmes E., Ehrenfeld M., Anroid E., Kasenbauer W., Holzel D. (2002):**

Clinical and epidemiological Data of patients with malignomas of the head and neck. *Laryngo-Rhino-otol.*, 81: 499-508.

**Lane D. P., Crawford L. V. (1979):**

T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. Mar 15; 278(5701): 261-263.

**Lane, D. P. (1992):**

Cancer.p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.

**Laskin J. J., Sandler, A. B. (2004):**

Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev.*30 (1): 1-17.

**Levine A. J. (1997):**

p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. Feb 7; 88(3): 323-331.

**Levine A. J., Hu W., Feng Z. (2006):**

The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell death and differentiation*; 13(6): 1027-1036.

**Li Y., Yoe H., Luo R.-Z., Zhang Y., Zhang M.-F., Wang X., Jia W.-H. (2011):**

Elevated Expression of Rad51 is correlated with decreased survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of surgical oncology* doi: 10.1002/jso.22018

**Lockhart D. J., Dong H., Byrne M. C., Follettie M. T., Gallo M. V., Chee M. S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E. L. (1996):**

Expression monitoring by hybridisation to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14: 1675-1680.

**Löffler G. Petrides P. E. (2003):**

*Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

**Maacke H., Jost K., Opitz S., Miska S., Yuan Y., Hasselbach L., Luttgies J., Kalthoff H., Sturzbecher H.W. (2000a):**

DNA repair and recombination factor Rad51 is overexpressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19 (23): 2791-5.

**Maacke H., Opitz S., Jost K., Hamdorf W., Henning W., Kruger S., Feller A.C., Lopens A., Diedrich K., Schwinger E., Sturzbecher H.W. (2000b):**

Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 88 (6): 907-13.

**Macfarlane G. J., Zheng T., Marshall J. R., Boffetta P. et al. (1995):**

Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 31B (3): 181-187.

**Madhusudan S., Ganesan T. (2004):**

Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *Clin.Biochem.* 37: 618-635.

**Maier H., Dietz A., Gewelke U., Seitz H.K., Heller W.D. (1990):**

Tabak- und alkoholassoziertes Krebsrisiko im Bereich des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes, *Laryngo-Rhino-Otol.*, 69: 505-511.

**Maier H., Zoeller J., Kreiss M., Sennewald E., Heller W.D. (1991):**

Mundhygiene und Zahnstatus bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtrakts, *HNO*, 39:227-232.

**Mamella G, Pamprick J, Luboiski B, et al. (1994):**

Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg*, 168: 494-498.

**Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Cassisi NJ. (2000):**

Radiation therapy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: a preferred alternative to surgery? *J Clin Oncol*, 18: 2219-2225.

**Moch H., Schraml P., Bubendorf L., Mirlacher M., Kononen J., Gasser T., Mihatsch M. J., Kallioniemi O. P., Sauter G. (1999):**

High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154: 981-986.

**Moch H., Kononen J., Kallioniemi O. P. u. Sauter G. (2001):**

Tissue microarrays: What will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv. Anat. Pathol.*, 8: 14-20.

**Momand J., Zambetti G. P., George D., L., Levine A. J. (1992).**

The mdm2-oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.

**Moynahan M.E., Pierce A.J., Jasin M.(2001):**

BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks, *Mol Cell* 7: 263272.

**Mucci N. R., Akdas G., Manely S., Rubin M. A. (2000):**

Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high-throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 31: 406-414.

**Müller-Tidow C., Krug U., Brunnberg U., Berdel W.E., Serve H. (2007):**

Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg 104, Heft 19: 1312-1319.

**Mumme A.M., Reitmeier F., Knecht R. (2010):**

Aktueller Stellenwert der Induktionschemotherapie. *HNO* 2010, Heft 58: 1156-1162

**Normanno N., Bianco C., De Luca A., Maiello M. R., Salomon D. S. (1998):**

Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10(1): 1-21.

**Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J. H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S. (2002):**

Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775-787.

**Olmi P., Crispino S., Fallai C., Torri V., Rossi F., Bolner A., Amichetti M., Signor, M., Taino R., Squadrelli M., Colombo A., Ardizzioia A., Ponticelli P., Franchin G., Minatel E., Gobitti C., Atzeni G., Gava A., Flann M., Marsoni S. (2003):**

Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs. accelerated hyperfractionated radiotherapy vs. concomitant radiotherapy and chemotherapy –a multicenter randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 55: 78-92.

**Pardue M. L., Gall J. G. (1969):**

Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 64: 600-604.

**Parkin D. M., Bray F., Ferley J., Oisani P. (2005):**

Global cancer statistics 2002 *CA. cancer*, 55.

**Pavletich N. P., Chambers K. A., Pabo C. O. (1993):**

The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & development*; 7(12B): 2556-64.

**Pericot J., Escriba J. M., Valdes A., Biosca M. J., Monner A., Castellsague X., Galiana R., Piulachs P., Escutia E., Mari A. (2000):**

Survival evaluation of treatment modality in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx, *J Craniomaxillofac Surg* 28 (1): 49-55.

**Pernot M., Hoffsterrer S., Peiffert D., et al. (1996):**

Role of interstitial brachytherapy in oral and oropharyngeal carcinoma: reflection of series of 1334 patients treated at the time of initial presentation. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 115: 519-526.

**Perry M. E., Levine A. J. (1993):**

Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* Feb;3(1): 50-54.

**Platz H., Fries R., Hudec M. (1982):**

Retrospektive DÖSAK-Studie über Karzinome der Mundhöhle. Die prognostische Relevanz verschiedener Faktoren zum Zeitpunkt der Erstaufnahme des Patienten. *Dtsch Zahn Mund Kiefer Gesichtschirurgie* 6: 185-196.

**Qiao G.B., Wu Y.L., Yang X.N., Zhong W.Z., Xie D., Guan X.Y., Fischer D., Kolberg H.C., Kruger S., Stuerzbecher H.W. (2005):**

High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 93 (1): 137-43.

**Reich, N. C., Levine, A. J. (1984):**

Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308: 199-201.

**Resnick M.A., Martin P. (1976):**

The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol Gen Genet* 143:119-129

**Riese D. J., Stern D. F. (1998):**

"Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network."; *Bioessays*; 20 (1) : 41-48.

**Ritchie J. M., Smith E. M., Summersgill K. F., Hoffmann H. T., Wang D., Klusmann J. P., Turek L. P., Haugen T. H. (2003):**

Human papilloma virus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int. J. Cancer*, 104: 336-344.

**Robinson D. R., Wu Y. M., Lin S. F. (2000):**

The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548-5557.

**Rudert H. (1992):**

Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx In: *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis* Naumann H.H., Helmes J., Herberholt C., Kastenbauer E., Band 2 : Nase, Nasennebenhöhlen, Gesicht, Mundhöhle und Pharynx, Kopfspeicheldrüsen Georg Thieme Verlag.

**Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. (1995):**

Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA. *Science* 270: 467-470.

**Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., Davis R.W. (1996):**

Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10614-10619.

**Schlessinger J., Ullrich A. (1992):**

Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9: 383-391.

**Schlessinger J. (2000):**

Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103 (2): 211-225.

**Schmoll H. J., Höffken K., Possinger K. (2006):**

Kompendium Internistische Onkologie 4.Auflage Springer: 1126-1133.

**Scholzen T., Gerdes J. (2000):**

The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182: 311-322.

**Schraml P., Kononen J., Bubendorf L., Moch H., Bissig H., Nocito A., Mihatsch M. J., Kallioniemi O. P., Sauter G. (1999):**

Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-1975.

**Schumacher M., Schulgen-Kristiansen G. (2008):**

Methodik klinischer Studien. Springer: 80-84.

**Schwenzer N., Ehrenfeld, M. (2002):**

Zahn- Mund- Kieferheilkunde Band 2. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.

**Scully R., Chen J., Plug A., Xiao Y., Weaver D. T., Feunteun J., Ashley T., Livingston D. M. (1997):**

Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.

**Shingaki S, Nomura T, Takada M, et al. (1999):**

The impact of extranodal spread of lymph node metastases in patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 28: 279-284.

**Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A., McGuire W. L. (1987):**

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/NEU oncogene. *Science* 235(4785): 177-182.

**Sloan D., Goepfert H. (1991):**

Conventional therapy of head and neck cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 5: 601-625.

**Slupianek A., Schmutte C., Tomblin G., Nieborowska-Skorska M., Hoser G., Nowicki M.O., Pierce A.J., Fishel R., Skorski T. (2001):**

BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 8 (4): 795-806.

**Snouwaert J.N., Gowen L.C., Latour A.M., Mohn A.R., Xiao A., DiBiase L., Koller B.H. (1999):**

BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a BRCA1 transgene, *Oncogene* 18: 7900-7907.

**Spearman C (1904):**

The proof and measurement of association between two things. *Amer J Psychol* 15: 279-281.

**Spyro M., Kallioniemi A., Kauraniemi P., Elkahloun A., Kallioniemi O. P. (2001):**

Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 6: 97-101.

**Staar S., Rudat V., Stuetzer H., Dietz A., Volling P., Schroeder M., Flentje M., Eckel H. E., Mueller R. P. (2001):**

Intensified hyperfractionated accelerated radiotherapy limits the additional benefit of simultaneous chemotherapy--results of a multicentric randomized German trial in advanced head-and-neck cancer *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 1161-1171.

**Starborg M., Gell K., Brundell E., Hoog C. (1996):**

The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromeric regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, 109: 143-153.

**Steeghs N., Nortier J., Gelderblom H. (2007):**

Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments, *Ann.Surg.Oncol.* 14: 942-953.

**Sturzbecher H.W., Donzelmann B., Henning W., Knippschild U., Buchhop S. (1996):**

p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* 15 (8): 1992-2002.

**Sung, P. (1997):**

Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* 272: 28194-28197.

**Thiel G., Rössler O. (2005):**

Signaltransduktion: Rezeptortyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden. *Biologie unserer Zeit.* 5: 312-319.

**Torhorst J., Bucher C., Kononen J., Haas P., Zuber M., Kochli O. R., Mross F., Dieterich H., Moch H., Mihatsch M., Kallioniemi O .P., Sauter G. (2001):**

Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249-2256.

**UICC (1997):**

TNM Classification of Malignant Tumours, 5th Edition, John Wiley and Sons, New York.

**Unger T., Nau M. M., Segal S., Minna J. D. (1992):**

p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *The EMBO journal*; 11(4): 1383-90.

**Venkitaraman A. R. (2002):**

Cancer susceptibility and the functions of brca1 and brca2. *Cell*, 108:171–82.

**Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C .A., Holt R. A. et al. (2001):**

The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

**Vispe S., Cazaux C., Lesca C., Defais M. (1998):**

Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26 (12): 2859-64.

**Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000):**

Surfing the p53 network. *Nature*; 408(6810): 307-310.

**Vousden K. H., Lu X. (2002):**

Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews* 2002;2(8): 594-604.

**Walker K. K., Levine A. J. (1996):**

Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 93(26): 15335-40.

**Welkoborsky H.J., Bleier R., Wissen-Siegert I. (1992):**

Antineoplastic effectiveness and unwanted side effects of polychemotherapy of extensive oroand hypopharyngeal cancers – results of a prospective therapy study with 5-FU/cisplatin versus 5-FU/carboplatin *Laryngorhinotologie*, 71: 261-266.

**Wells A. (1999):**

EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*; 31 (6): 637-43.

**Wittekind C., Meyer H. J., Bootz F. (2002):**

TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag: 250-251.

**Wu X. W., Bayle J. H., Olson D., Levine A. J. (1993):**

The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7: 1126-1132.

**Yarden Y.; Sliwkowski M. X. (2001):**

"Untangling the ErbB signalling network." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 127-37.

**Yarden Y., Ullrich, A. (1988):**

Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 57: 443-449.

**Yarden, Y., (2001):**

The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 37 Suppl 4: S3-S8.

**Yarden Y., Sliwkowski M. X. (2001):**

Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2): 127-137.

**Yokoshima K., Nigauri T., Kamata S., Kawabata K., Hoki K., Mitani H., Yoshimoto S. (1999) :**

New classification of stage IV squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Auris Nasus Pharynx*, 26: 311-316.

**Yoshikawa K., Ogawa T., Baer R., Hemmi H., Honda K., Yamauchi A., Inamoto T., Ko K., Yazumi S., Motoda H., Kodama H., Noguchi S., Gazdar A.F., Yamaoka Y., Takahashi R. (2000):**

Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 88 (1): 28-36.

**Youssefzadeh S, Pamberger P, Baumgartner W, Becherer A, Wachter S, Burian M. (1999):**

*Radiologie*, 39, Springer-Verlag: 513-524.

**Zhang D., Sliwkowski M. X., Mark M., Frantz G., Akita R., Sun Y., Hillan K., Crowley C., Brush J., Godowski P. J. (1997):**

Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9562-9567.

**Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M. I. (2007):**

ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117: 2051-2058.

## 7 Anhang

## Gesamt Array (Spearman-Rho)

		age (diagnosis)	pT	pN	pM	R	grading	p53 (IHC)	Rad-51 (IHC)	Mib (IHC)
age (diagnosis)	Korrkoeff.	1	-0,085	-0,057	0,049	-0,071	0	0,034	-0,048	-0,045
	Sig. (2-seitig)	---	<b>0,074</b>	0,232	0,302	0,323	0,992	0,496	0,382	0,367
	N	443	443	443	437	195	443	403	338	396
pT	Korrkoeff.	-0,085	1	0,314**	0,087	0,128	0,151**	-0,014	0,125*	-0,029
	Sig. (2-seitig)	<b>0,074</b>	---	<b>0,000</b>	<b>0,069</b>	<b>0,074</b>	<b>0,001</b>	0,775	<b>0,021</b>	0,559
	N	443	445	445	439	196	443	405	340	398
pN	Korrkoeff.	-0,057	0,314**	1	0,210**	0,229**	0,134**	0,048	0,122*	0,036
	Sig. (2-seitig)	0,232	<b>0,000</b>	---	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	0,337	<b>0,024</b>	0,472
	N	443	445	445	439	196	443	405	340	398
pM	Korrkoeff.	0,049	0,087	0,210**	1	0,080	0,049	-0,002	0,050	0,027
	Sig. (2-seitig)	0,302	<b>0,069</b>	<b>0,000</b>	---	0,267	0,305	0,962	0,357	0,588
	N	437	439	439	439	195	437	399	335	392
R	Korrkoeff.	-0,071	0,128	0,229**	0,080	1	-0,021	0,128	-0,029	0,041
	Sig. (2-seitig)	0,323	<b>0,074</b>	<b>0,001</b>	0,267	---	0,775	0,089	0,710	0,598
	N	195	196	196	195	196	195	178	172	169
grading	Korrkoeff.	0,000	0,151**	0,134**	0,049	-0,021	1	0,049	0,073	0,045
	Sig. (2-seitig)	0,992	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	0,305	0,775	---	0,331	0,182	0,370
	N	443	443	443	437	195	443	403	338	396
p53 (IHC)	Korrkoeff.	0,034	-0,014	0,048	-0,002	0,128	0,049	1	0,011	0,128*
	Sig. (2-seitig)	0,496	0,775	0,337	0,962	0,089	0,331	---	0,837	0,012
	N	403	405	405	399	178	403	412	322	389
Rad-51 (IHC)	Korrkoeff.	-0,048	0,125*	0,122*	0,050	-0,029	0,073	0,011	1	0,004
	Sig. (2-seitig)	0,382	<b>0,021</b>	<b>0,024</b>	0,357	0,710	0,182	0,837	---	0,944
	N	338	340	340	335	172	338	322	344	314
Mib (IHC)	Korrkoeff.	-0,045	-0,029	0,036	0,027	0,041	0,045	0,128*	0,004	1
	Sig. (2-seitig)	0,367	0,559	0,472	0,588	0,598	0,370	<b>0,012</b>	0,944	---
	N	396	398	398	392	169	396	389	314	403

## Oral Cavity Array (Spearman-Rho)

		age (diagnosis)	pT	pN	pM	R	grading	p53 (IHC)	Rad-51 (IHC)	Mib (IHC)
age (diagnosis)	Korrkoeff.	1	-0,010	-0,059	-0,012	---	0,009	0,066	-0,041	-0,056
	Sig. (2-seitig)	---	0,877	0,383	0,855	---	0,889	0,349	0,621	0,428
	N	221	221	221	219	0	221	205	146	206
pT	Korrkoeff.	-0,010	1	0,302**	0,035	---	0,187**	0	0,028	-0,051
	Sig. (2-seitig)	0,877	---	<b>0,000</b>	0,606	---	<b>0,005</b>	0,997	0,740	0,463
	N	221	221	221	219	0	221	205	146	206
pN	Korrkoeff.	-0,059	0,302**	1	0,210**	---	0,163*	0,168*	0,051	-0,069
	Sig. (2-seitig)	0,383	<b>0,000</b>	---	<b>0,002</b>	---	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	0,538	0,323
	N	221	221	221	219	0	221	205	146	206
pM	Korrkoeff.	-0,012	0,035	0,210**	1	---	0,103	0,049	0,045	0,068
	Sig. (2-seitig)	0,855	0,606	<b>0,002</b>	---	---	0,128	0,487	0,595	0,337
	N	219	219	219	219	0	219	203	145	204
R	Korrkoeff.	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Sig. (2-seitig)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grading	Korrkoeff.	0,009	0,187**	0,163*	0,103	---	1	0,072	-0,050	0,105
	Sig. (2-seitig)	0,889	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>	0,128	---	---	0,308	0,551	0,132
	N	221	221	221	219	0	221	205	146	206
p53 (IHC)	Korrkoeff.	0,066	0,000	0,168*	0,049	---	0,072	1	-0,067	0,176*
	Sig. (2-seitig)	0,349	0,997	<b>0,016</b>	0,487	---	0,308	---	0,438	<b>0,014</b>
	N	205	205	205	203	0	205	205	135	197
Rad-51 (IHC)	Korrkoeff.	-0,041	0,028	0,051	0,045	---	-0,05	-0,067	1	-0,055
	Sig. (2-seitig)	0,621	0,740	0,538	0,595	---	0,551	0,438	---	0,527
	N	146	146	146	145	0	146	135	146	134
Mib (IHC)	Korrkoeff.	-0,056	-0,051	-0,069	0,068	---	0,105	0,176*	-0,055	1
	Sig. (2-seitig)	0,428	0,463	0,323	0,337	---	0,132	<b>0,014</b>	0,527	---
	N	206	206	206	204	0	206	197	134	206

## Hypo-/Oropharynx Array (Spearman-Rho)

		age (diagnosis)	pT	pN	pM	R	grading	p53 (IHC)	Rad-51 (IHC)	Mib (IHC)
age (diagnosis)	Korrkoeff.	1	-0,138	0,015	0,014	-0,067	0,099	0,029	-0,022	0,056
	Sig. (2-seitig)	---	0,121	0,871	0,879	0,502	0,266	0,767	0,824	0,562
	N	127	127	127	124	104	127	110	108	110
pT	Korrkoeff.	-0,138	1	0,187*	0,087	0,150	-0,029	-0,042	0,172	0,019
	Sig. (2-seitig)	0,121	---	<b>0,036</b>	0,336	0,129	0,746	0,661	<b>0,076</b>	0,847
	N	127	127	127	124	104	127	110	108	110
pN	Korrkoeff.	0,015	0,187*	1	0,252**	0,239*	0,054	-0,129	0,040	0,047
	Sig. (2-seitig)	0,871	<b>0,036</b>	---	<b>0,005</b>	<b>0,014</b>	0,546	0,179	0,681	0,627
	N	127	127	127	124	104	127	110	108	110
pM	Korrkoeff.	0,014	0,087	0,252**	1	0,245*	0,016	0,006	-0,020	0,029
	Sig. (2-seitig)	0,879	0,336	<b>0,005</b>	---	<b>0,012</b>	0,861	0,955	0,840	0,769
	N	124	124	124	124	104	124	107	105	107
R	Korrkoeff.	-0,067	0,15	0,239*	0,245*	1	-0,093	0,088	-0,035	0,100
	Sig. (2-seitig)	0,502	0,129	<b>0,014</b>	<b>0,012</b>	---	0,349	0,406	0,745	0,346
	N	104	104	104	104	104	104	92	91	91
grading	Korrkoeff.	0,099	-0,029	0,054	0,016	-0,093	1	-0,059	0,099	-0,001
	Sig. (2-seitig)	0,266	0,746	0,546	0,861	0,349	---	0,538	0,308	0,993
	N	127	127	127	124	104	127	110	108	110
p53 (IHC)	Korrkoeff.	0,029	-0,042	-0,129	0,006	0,088	-0,059	1	0,094	-0,012
	Sig. (2-seitig)	0,767	0,661	0,179	0,955	0,406	0,538	---	0,354	0,906
	N	110	110	110	107	92	110	110	100	106
Rad-51 (IHC)	Korrkoeff.	-0,022	0,172	0,040	-0,020	-0,035	0,099	0,094	1	0,029
	Sig. (2-seitig)	0,824	<b>0,076</b>	0,681	0,840	0,745	0,308	0,354	---	0,773
	N	108	108	108	105	91	108	100	108	101
Mib (IHC)	Korrkoeff.	0,056	0,019	0,047	0,029	0,100	-0,001	-0,012	0,029	1
	Sig. (2-seitig)	0,562	0,847	0,627	0,769	0,346	0,993	0,906	0,773	---
	N	110	110	110	107	91	110	106	101	110

## Larynx Array (Spearman-Rho)

		age (diagnosis)	pT	pN	pM	R	grading	p53 (IHC)	Rad-51 (IHC)	Mib (IHC)
age (diagnosis)	Korrkoeff.	1	-0,147	-0,091	0,261*	-0,078	-0,147	-0,022	-0,075	-0,117
	Sig. (2-seitig)	---	0,155	0,383	<b>0,011</b>	0,460	0,156	0,838	0,498	0,302
	N	95	95	95	94	91	95	88	84	80
pT	Korrkoeff.	-0,147	1	0,469**	0,187	0,090	0,242*	-0,061	0,173	-0,081
	Sig. (2-seitig)	0,155	---	0	<b>0,069</b>	0,394	<b>0,018</b>	0,570	0,112	0,468
	N	95	97	97	96	92	95	90	86	82
pN	Korrkoeff.	-0,091	0,469**	1	0,161	0,203	0,145	-0,033	0,280**	0,218*
	Sig. (2-seitig)	0,383	<b>0,000</b>	---	0,118	<b>0,053</b>	0,162	0,760	<b>0,009</b>	<b>0,049</b>
	N	95	97	97	96	92	95	90	86	82
pM	Korrkoeff.	0,261*	0,187	0,161	1	-0,075	-0,040	-0,117	0,159	-0,054
	Sig. (2-seitig)	<b>0,011</b>	<b>0,069</b>	0,118	---	0,481	0,705	0,274	0,147	0,633
	N	94	96	96	96	91	94	89	85	81
R	Korrkoeff.	-0,078	0,090	0,203	-0,075	1	0,059	0,191	-0,024	-0,050
	Sig. (2-seitig)	0,460	0,394	<b>0,053</b>	0,481	---	0,581	<b>0,079</b>	0,829	0,662
	N	91	92	92	91	92	91	86	81	78
grading	Korrkoeff.	-0,147	0,242*	0,145	-0,040	0,059	1	0,109	0,206	-0,051
	Sig. (2-seitig)	0,156	<b>0,018</b>	0,162	0,705	0,581	---	0,312	0,060	0,652
	N	95	95	95	94	91	95	88	84	80
p53 (IHC)	Korrkoeff.	-0,022	-0,061	-0,033	-0,117	0,191	0,109	1	-0,004	0,177
	Sig. (2-seitig)	0,838	0,570	0,760	0,274	<b>0,079</b>	0,312	---	0,969	0,102
	N	88	90	90	89	86	88	97	87	86
Rad-51 (IHC)	Korrkoeff.	-0,075	0,173	0,280**	0,159	-0,024	0,206	-0,004	1	0,041
	Sig. (2-seitig)	0,498	0,112	<b>0,009</b>	0,147	0,829	<b>0,060</b>	0,969	---	0,721
	N	84	86	86	85	81	84	87	90	79
Mib (IHC)	Korrkoeff.	-0,117	-0,081	0,218*	-0,054	-0,050	-0,051	0,177	0,041	1
	Sig. (2-seitig)	0,302	0,468	<b>0,049</b>	0,633	0,662	0,652	0,102	0,721	---
	N	80	82	82	81	78	80	86	79	87

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Adrian Münscher bedanken, der das Thema dieser Arbeit vorgeschlagen und zur Verfügung gestellt hat. Er hat mich mit unendlicher Geduld über diese Zeit hinweg fachlich und menschlich perfekt betreut. Ich wünsche ihm für seine Habilitation alles Gute.

Ich danke Prof. Dr. Rainald Knecht, Direktor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Eppendorf, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten ihrer Patienten.

Außerdem danke ich Dr. Til Clauditz für die Bereitstellung und Durchsicht der Tumorproben sowie für die fachkundige Beratung in pathologischen Fragen.

Prof. Dr. Rune und PD Dr. Borgmann danke ich für die Bereitschaft das Gutachten dieser Dissertation zu übernehmen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre stetige, liebevolle Unterstützung und Förderung.

Ein besonderes Dankeswort möchte ich meinem Ehemann Oliver aussprechen, der mir während des gesamten Studiums und während dieser Arbeit zur Seite gestanden hat und immer an mich geglaubt hat. Er hat mir wo es nur ging den Rücken freigehalten und mich immer wieder aufgebaut, wenn ich an mir zweifelte. Für diese unglaubliche Leistung kann ich ihm nicht genug danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt zudem allen weiteren Beteiligten, auch wenn sie nicht namentlich genannt sind.

## 10 Erklärung

### **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

---

Nicole Klein