

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. G. Sauter

**Nachweis von Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten
von Patienten mit oralen/oropharyngealen
Plattenepithelkarzinomen**

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)
an der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Franziska Gärtner
aus Potsdam

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich der Medizin
an der Universität Hamburg am: 07.07.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende PD Dr. L.Riethdorf

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in Prof. Dr. K.Pantel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

Wenn sich eine Frage überhaupt stellen *lässt*,
so kann sie auch beantwortet werden.

Ludwig Wittgenstein

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	07	
1	Arbeitshypothese und Fragestellung	09
2	Einleitung	10
2.1	Orale/oropharyngeale Karzinome	10
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	10
2.1.2	Metastasierungswege	10
2.1.3	Lokalisation und Morphologie	11
2.1.3.1	Postoperative Tumorausbreitung (pTNM-Klassifikation, <i>staging</i>)	12
2.1.3.2	Tumordifferenzierung (<i>grading</i>)	14
2.1.4	Klinische Faktoren	14
2.1.5	Prognostische Faktoren	16
2.2	Entstehung und Metastasierung von Tumoren	18
2.2.1	Karzinogenese	18
2.2.2	Invasion und Metastasierung	20
2.2.3	Metastasierungsmodelle	21
2.3	Disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen	22
2.3.1	Detektion von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten	23
2.3.2	Klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten	25
3	Material und Methoden	28
3.1	Auswahl des Patientenkollektivs	28
3.2	Materialien und Reagenzien der immunhistochemischen Analyse	34
3.3	Optimierung des immunhistochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen an Paraffinschnitten von Primärtumoren	38
3.3.1	Detektion Zytokeratin-positiver Zellen mit den Antikörpern AE1/AE3 und Keratin-903™	41
3.3.2	Vorbehandlungen der Paraffinschnitte	43

3.3.3	EnVision™ Nachweissystem	43
3.3.4	Manuelle und automatische Methode	44
3.3.5	Reproduktion der immunhistochemischen Analyse mit dem Antikörper Keratin-903™ im automatischen System	46
3.3.6	Detektion Zytokeratin-positiver Zellen mit dem Antikörper 34βE12	46
3.3.7	Auswertung der Optimierungsversuche	47
3.4	Immunhistochemische Detektion zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in den Lymphknotenpräparaten	47
3.4.1	Aufbereitung der paraffineingebetteten Lymphknoten/Anfertigung der Paraffinschnitte	48
3.4.2	Immunhistochemische Analyse	48
3.4.3	Mikroskopische Auswertung	48
3.5	Weitere phänotypische und molekulare Charakterisierung der detektierten Mikrometastasen	49
3.5.1	Automatische immunhistochemische Analyse	50
3.5.2	Manueller immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin A45-B/B3, EGFR und EMMPRIN mit dem EnVision™ Nachweissystem	50
3.5.3	Materialien und Reagenzien für die RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	52
3.5.4	RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	59
4	Ergebnisse	62
4.1	Optimierung der immunhistochemischen Analyse zur Detektion von disseminierten Tumorzellen an Paraffinschnitten von Primärtumoren	62
4.2	Immunhistochemischer Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten	64
4.3	Häufigkeit der Detektion von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten in Korrelation zu histopathologischen und biologischen Faktoren	68
4.3.1	Mikrometastasen und Lymphknotenstatus	68
4.3.2	Mikrometastasen und Tumorstadium	69

4.3.3	Mikrometastasen, Geschlecht und Alter	70
4.3.4	Mikrometastasen und Lokalisation des Primärtumors	71
4.3.5	Mikrometastasen und Tumordifferenzierungsgrad	72
4.4	Verlaufsbeobachtung der Patienten mit Zytokeratin-positiven Zellen	73
4.5	Weitere molekulare und phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen in den Lymphknotenpräparaten	74
5	Diskussion	78
5.1	Optimierung der immunhistochemischen Analyse zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen	78
5.2	Nachweis von Mikrometastasen in den lokoregionären Lymphknoten oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome	79
5.3	Korrelationen zwischen dem Nachweis von Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten und histopathologischen Faktoren	86
5.4	Phänotypische und molekulare Charakterisierung der Mikrometastasen	87
5.4.1	Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 und AE1/AE3	89
5.4.2	p53	91
5.4.3	p16 ^{INK4}	92
5.4.4	EGFR	94
5.4.5	EMMPRIN	96
5.4.6	Metalloproteinasen 1/ 2	97
5.4.7	EpCAM	98
5.5	Klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen	99
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis	106
8	Danksagung	134
9	Lebenslauf	135
10	Eidesstattliche Erklärung	136

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADAM	<i>a desintegrin and metalloproteinase</i>
ACIS	<i>automated cellular imaging system</i>
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependend Kinase</i>
CK	Zytokeratin(e)
CT	Computertomographie
d	day (Tage)
DCIS	Duktales <i>Carcinoma in situ</i>
dest.	destilliert
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTZ	Disseminierte Tumorzellen
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>epithelial membrane antigen</i>
EMMPRIN	<i>epithelial matrix-metalloproteinase inducer</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
f	<i>female</i> (weiblich)
GÜ	Gesamtüberleben
HPV	Humanes Papillomavirus
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
KM	Knochenmark
m	<i>male</i> (männlich)
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
MB	Mundboden
MM	Mikrometastase(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

MRT	Magnetresonanz-Tomographie
PAK	Primärantikörper
PEK	Plattenepithelkarzinom
RFÜ	Rezidiv-freies Überleben
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
USgFNAC	<i>ultrasound with guided fine needle aspiration</i>
WSH	Wangenschleimhaut

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion stellen die sechsthäufigste Tumorerkrankung in der Welt dar. Allein in den USA werden 42.000 Neuerkrankungen pro Jahr und 12.000 Todesfälle verzeichnet. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt generell nur 50% (Boring et al., 1992, Gath und Brakenhoff, 1995, Franceschi et al., 1993). An der insgesamt schlechten Prognose dieser Tumoren hat sich in den vergangenen 20 Jahren wenig geändert. Der wichtigste prognostische Faktor ist der Lymphknotenstatus (Leemans et al., 1993; Stell et al., 1983; Snow et al., 1982; Lefebvre et al., 1987, Pantel et al., 1999). Dafür ist der exakte Nachweis von regionalen Lymphknotenmetastasen von großer Bedeutung. Klassische diagnostische Methoden wie Palpation, Radiologie und Histologie sind für Makrometastasen ausreichend, jedoch zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen (DTZ/MM) ungeeignet. Über die Detektion von okkulten Metastasen in Lymphknoten des Kopf- und Halsbereiches gibt es bislang kaum Studien.

Folgende Fragen standen deshalb im Mittelpunkt der eigenen Untersuchungen:

1. Lassen sich immunhistochemisch DTZ/MM in den lokoregionären Lymphknoten oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome nachweisen?
2. Welcher Anti-Zytokeratin-Antikörper besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von DTZ/MM?
3. Wie häufig können DTZ/MM nachgewiesen werden?
4. Gibt es eine Korrelation des Nachweises von DTZ/MM mit dem Tumorstadium, dem Differenzierungsgrad oder der Tumorlokalisation?
5. Kann die Expression ausgewählter Gene/Proteine, die für die Tumorprogression und/oder Metastasierung Bedeutung besitzen, in den DTZ/MM nachgewiesen werden?

2 Einleitung

2.1 Orale/oropharyngeale Karzinome

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Orale und oropharyngeale Karzinome machen rund 5% aller neu diagnostizierten Karzinome in Nord- und Westeuropa sowie den USA aus (Muir und Weiland, 1995). Es handelt sich um die sechsthäufigste Karzinomerkrankung weltweit (Garewal, 1995). In Westeuropa beträgt die Inzidenzrate (Neuerkrankungsrate) der Karzinome aus dem Mund- und Rachenbereich je 100.000 Einwohner pro Jahr für Frauen 3,2 und für Männer 16,6. Betroffen sind vorrangig ältere Personen (98% älter als 40 Jahre) und Personen mit niedrigem sozioökonomischem Status (Lockhart et al., 1998; Reichert, 2001). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Karzinomen im Kopf- und Halsbereich beträgt im Allgemeinen 50% (Zarbo et al., 1988; Franceschi et al., 1993).

Die bedeutendsten exogenen Risikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen im Mund-Rachen-Bereich in Europa sind chronischer Tabak- und Alkoholkonsum (La Vecchia et al., 1997). Alkohol und Tabakrauch zeigen dabei einen synergistischen Effekt (Blot et al., 1994, Franceschi et al., 1999). Weiterer Risikofaktor ist eine mangelnde Mundhygiene, die unter anderem die Ansammlung von exogenen chemisch-kanzerogenen Faktoren in der Mundhöhle fördert. Neben einer unzureichenden Ernährung (z.B. ein Vitamin-A-Mangel) (Maier et al., 1994; Negri et al., 2000) werden auch onkogene DNA-Viren (z.B. HPV-Infektion) (Paz et al., 1997; Nagpal et al., 2002) für die Entstehung der Karzinome verantwortlich gemacht. Die Wahrscheinlichkeit, an einem Karzinom der Mundhöhle zu erkranken, steigt bei Berufsgruppen, die häufig mit Farben, Lacken, Lösungsmitteln, Asbest und Zementstaub in Kontakt kommen (Maier et al., 1994, 1997).

Endogene Risikofaktoren spielen eine ebenso bedeutende Rolle für das Auftreten von Karzinomen. So gilt vorrangig bei jüngeren Patienten eine gewisse genetische Prädisposition in unterschiedlicher Ausprägung als erwiesen (Llewellyn et al., 2001).

2.1.2 Metastasierungswege

Karzinome streuen einerseits über das Lymph- und andererseits über das Blutgefäßsystem.

Durch die anatomisch bekannten Lymphabflussbahnen und die Eigenschaft der oralen Karzinome bevorzugt lymphogen zu metastasieren, ist die Suche nach Metastasen primär auf die verschiedenen Etagen der Halslymphknoten und auf synchrone Zweitkarzinome gerichtet. In verschiedenen Studien wurden bei 29 bis 88% der Patienten bereits bei der Erstuntersuchung Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Howaldt et al., 2000; Kokemüller et al., 2002; Di Martino et al., 2000 b) sowie in 2 bis 18% der Fälle synchrone Zweittumoren (Popella et al., 1999; Stockel et al., 1999; Di Martino et al., 2000 a). Diese Häufigkeit belegt die Bedeutung der intensiven Untersuchung der lymphogenen Metastasierungswege.

Die hämatogene Metastasierung tritt bei oralen Karzinomen in der Regel wesentlich seltener als die lymphogene Metastasierung auf. Ursachen dafür sind die Entwicklung der Karzinome von der Oberfläche in die Tiefe des Gewebes sowie die Neigung der Karzinome, nicht diffus gesunde Gewebe zu infiltrieren, sondern sich eher in plumpen Zapfen auszudehnen (Horch et al., 1998). Dadurch ist eine direkte Hämangioinvasion selten.

Über den Weg der zervikalen Lymphbahnen besteht eine weitere Möglichkeit hämatogen zu metastasieren. Von den submentalen- bzw. submandibulären Lymphknoten kommt es absteigend über die Gefäß- und Nervenscheide schließlich über die supraklavikulären Lymphknoten zum Eindringen der versprengten Tumorzellen in den Ductus thoracicus und somit zur hämatogenen Metastasierung. Studien zufolge entwickeln 10-26% der Patienten mit fortgeschrittenen oralen/oropharyngealen Karzinomen Fernmetastasen. Am häufigsten betrifft die hämatogene Metastasierung die Lunge, die Leber und das Skelettsystem (Vikram, 1984; Hong et al., 1985; Cerezo et al., 1992; Leemanns et al., 1993; Alvi und Johnson, 1997). Umfangreichen Autopsiestudien zufolge ist die Inzidenz mit 40-57% jedoch weitaus höher (O'Brien et al., 1971; Zbaeren und Lehmann, 1987).

2.1.3 Lokalisation und Morphologie

Zu den oralen/oropharyngealen Karzinomen werden Karzinome der Lippen, der Zunge, der großen Speicheldrüsen, des Zahnfleisches und der angrenzenden Schleimhaut der Mundhöhle, des Mundbodens, der Tonsillen, des Oropharynx, des Hypopharynx und anderer oraler Regionen gezählt.

Bis zu 95% der Karzinome sind Plattenepithelkarzinome (PEK), die ihren Ursprung in der obersten Schicht der Mukosa, dem Epithel, haben. Bei den übrigen Karzinomen handelt es sich um Adenokarzinome (ausgehend von Drüsenzellen) (2%), um weitere unspezifische Karzinome und Sarkome (ausgehend von Mesenchymzellen) (0,3%). 75% der Speicheldrüsenkarzinome sind Adenokarzinome (Muir und Weiland, 1995).

2.1.3.1 Postoperative Tumorausbreitung (pTNM-Klassifikation, *staging*)

Das TNM-System dient der einheitlichen Erfassung des Stadiums maligner Tumorerkrankungen. Es wurde von der *Union Internationale Contre la Cancer* (UICC) und dem äquivalenten *American Joint Committee for Cancer Staging* (AJCC) erarbeitet.

Aus der Tumorgröße (T), dem Lymphknotenstatus (N) und dem Fernmetastasierungsstatus (M) wird das jeweilige Tumorstadium ermittelt (Tabelle 2.1). Es gibt eine klinische (präoperative) und eine pathologische (postoperative) TNM-Klassifikation; die Kriterien sind identisch (Tabelle 2.2). Mit zunehmendem Stadium sinkt die Überlebensrate (Spiro, 1985).

Aufgrund der Klassifizierung der Karzinome ist eine objektivere Betrachtungsweise des Tumorwachstums und seiner Ausdehnung im Organismus möglich. Dieses System hat sich in der Diagnostik, der Therapiewahl und der prognostischen Bedeutung als nützlich erwiesen (Das und Nagpal, 2002). Die Klassifizierung der oralen/oropharyngealen PEK der vorliegenden Arbeit erfolgte im Institut für Oralpathologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Tabelle 2.1 TNM/pTNM-Klassifikation für orale/oropharyngeale Karzinome nach UICC (2002)

T/pT (Größe des Primärtumors)	
T1/pT1	Bis 2 cm großer Tumor
T2/pT2	2 bis 4 cm großer Tumor
T3/pT3	Über 4 cm großer Tumor
T4/pT4	Einbeziehung von Nachbarstrukturen
Tx/pTx	Primärtumor ist nicht beurteilbar
T0/pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis/pTis	Carcinoma in situ

N/pN (zervikale) Lymphknotenmetastasen	
N0/pN0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1/pN1	Ipsilateral solitär bis 3 cm
N2a/pN2a	Ipsilateral solitär 3 bis 6 cm
N2b/pN2b	Ipsilateral multipel bis 6 cm
N2c/pN2c	Bilateral, kontralateral bis 6 cm
N3/pN3	Größer als 6 cm
Nx/pNx	Nicht beurteilbar
M Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar
Mx	Nicht beurteilbar

Postoperativ erfolgt eine einmalige Einteilung der Karzinome nach postoperativer TNM-Klassifikation (pTNM-Klassifikation), die sich am Operationspräparat orientiert. Kritisch ist zu bemerken, dass die Validität jeder Klassifikation abhängig von der Genauigkeit der Einteilung ist. In der TNM-Klassifikation nach UICC werden die Präparate weder zusätzlich beurteilt noch beziehen sie sich auf die sechs anatomisch definierten Lymphknotenstufen (*level*) der Lymphknoten im Halsbereich, welche von prognostischer Relevanz sind (Stell, Morton und Singh, 1983; Leemanns et al., 1990). Diese *level* werden durch das Klassifikationssystem der American Academy of Otolaryngology/Head and Neck Surgery näher beschrieben.

Tabelle 2.2 Stadieneinteilung

Stadium 0: Tis N0 M0
Stadium 1: T1 N0 M0
Stadium 2: T2 N0 M0
Stadium 3: T3 N0 M0 (sowie jedes T1/T2/T3 mit N1 M0)
Stadium 4: T4 mit jedem N M0 (sowie jedes T mit N2 oder N3M0 und jedes T oder N mit M1)

In diesem Klassifikationssystem entsprechen *level 1* den submental und submandibulären Regionen, *level 2, 3, 4* dem Verlauf der Lymphknoten entlang der Jugularvene (oben, mittlere und untere). *Level 5* beinhaltet sowohl die Lymphknoten hinter dem Musculus sternokleidomastoideus als auch die supraklavikulären Lymphknoten. *Level 6* entspricht den juxtaviszeralen Lymphknoten.

Die Lymphknoten der verschiedenen Lymphknotenstufen sind unterschiedlich häufig metastatisch befallen (Lindberg, 1972). Einer Studie zufolge sind *level 1, 2 und 3* häufiger von Lymphknotenmetastasen betroffen als *level 4, 5 und 6* (Shah, Candela und Poddar, 1990).

2.1.3.2 Tumordifferenzierung (*grading*)

Unter Berücksichtigung histologischer und zytologischer Kriterien wie Wachstumsmuster, Kernatypien und Mitoserate erfolgt eine histopathologische Graduierung (*grading*) (Tabelle 2.3).

Die oralen Karzinome sind in 95% der Fälle gut bis mäßig differenziert.

Tabelle 2.3 Histopathologisches Tumorgading

Differenzierungsgrad	<i>Grading</i>
gut differenziert	G1
mäßig differenziert	G2
schlecht differenziert	G3
undifferenziert	G4

2.1.4 Klinische Faktoren

Oralen/oropharyngealen PEK gehen häufig Epitheldysplasien voraus, die bei Verhornung klinisch in Form von Leukoplakien in Erscheinung treten. Leukoplakien sind laut WHO-Definition begrenzte weiße Plaques der Mundschleimhaut, die nicht weggewischt und keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden können (Pindborg et al., 1997). Die häufigste Form ist die homogene, plane oder einfache Leukoplakie, die ein geringes Entartungsrisiko aufweist. Im Gegensatz dazu entarten inhomogene Leukoplakien mit histologischen Zeichen der Dysplasie häufiger. Die Erythroplakie entspricht einem Carcinoma in situ und geht in bis zu 50% der Fälle in ein invasiv wachsendes PEK über (Grimm, 1990).

Karzinome des oropharyngealen Bereichs verursachen im Frühstadium meist keine Beschwerden. Erst durch auftretende Superinfektionen fallen sie klinisch auf. Mit fortschreitender Erkrankung können Spontanblutungen oder Blutungen infolge mechanischer Verletzungen, Schmerzen, Dysphagien und Foetor ex ore auftreten.

PEK erscheinen bei der Inspektion häufig als rötlich/weißlich verfärbte, erhabene oder flache Läsionen. Mit diesen Läsionen können Oberflächenveränderungen der Schleimhaut wie beispielsweise Ulzerationen einhergehen (Böcker et al., 2004). Die klinische Diagnose muss durch eine Biopsie histopathologisch gesichert werden. Nach pathologischer Untersuchung der entnommenen Probe wird der Patient auf eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen untersucht (*staging*).

Die Ermittlung des Lymphknotenstatus des Halses wird üblicherweise präoperativ durch Tasten (Palpation) der Lymphknoten von einem Kliniker beurteilt und wenn notwendig zusätzlich mittels bildgebender Diagnostik: Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Ultraschall assistierte Feinnadelpunktion (*ultrasound with guided fine needle aspiration*, USgFNAC) oder Positronen-Emissions-Tomographie. Die Palpation gilt jedoch als unzuverlässig, da sowohl die falsch positiv als auch falsch negativ ermittelte Rate hoch ist (Van den Brekel et al., 1993). Die falsch negativen Ergebnisse liegen zwischen 20% und 30% (Machant et al., 1993). Sensitivität und Spezifität der Palpation sind begrenzt, weshalb jeder Hals ohne palpable Lymphknoten (N0) das Risiko versteckter (okkult) Metastasen in sich birgt. Die radiographische Beurteilung von Metastasen ist ebenso schwierig, wenn die Knoten kleiner als 10 mm sind. Bis heute ist laut Woolgar (1999a) kein Verfahren in der Lage okkulte Metastasen verlässlich aufzudecken.

Anhand der prä- und postoperativen Kriterien wird das weitere therapeutische Vorgehen entschieden. Die postoperative histopathologische Beurteilung der PEK liefert zusätzliche Informationen zur Diagnose, zum Stadium des Primärtumors und zur Prognose.

Kritisch ist zu bemerken, dass in der Routinediagnostik selbst dem erfahrenen Pathologen in der konventionellen lichtmikroskopischen Begutachtung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, H&E-Färbung) frühe Stadien der Metastasierung verborgen bleiben können (Wilkinson und Hause, 1974; Feinmesser et al., 1992; van den Brekel et al., 1992; Brennan et al., 1995).

In einer Studie von Don et al. (1995) wurde beobachtet, dass 67% der Metastasen von PEK des oberen Verdauungstraktes, die in Lymphknoten gefunden wurden, einen Durchmesser von ≤ 10 mm aufwiesen. In einer anderen Studie, die prospektiv an Larynx- und Hypopharynx Tumoren durchgeführt wurde, zeigte sich, dass ein Drittel der Metastasen in den Lymphknoten kleiner als 3 mm im Durchmesser waren (Buckley et al., 2000). Da solche kleinen Metastasen der Palpation gar nicht zugänglich sind und häufig auch radiographischen und konventionell histopathologischen Untersuchungen entgehen, ist es wichtig, sensitivere Methoden zur Detektion kleiner Lymphknotenmetastasen zu entwickeln, um das weitere klinische Management und die Prognose des Patienten positiv zu beeinflussen.

2.1.5 Prognostische Faktoren

Die Bestimmung von prognostischen Faktoren ermöglicht die individuelle Abstimmung der Therapie. Durch die Prognosefaktoren ist eine Einschätzung des Krankheitsverlaufes ohne Therapie möglich. Die stärksten gesicherten Prognosefaktoren für Patienten mit oralen/oropharyngealen PEK sind Vorhandensein und Zahl von Metastasen der lokoregionären Lymphknoten, die beteiligte(n) zervikalen Lymphknotenstufe(n), die Größe der Lymphknoten sowie der Nachweis von extrakapsulärer Streuung. Die Anwesenheit oder Entwicklung von Lymphknotenmetastasen im weiteren Verlauf der Karzinomkrankung reduzieren die Überlebensrate um annähernd die Hälfte (Snow et al., 1982; Stell et al., 1983; Lefebvre et al., 1987; Leemanns et al., 1990; Leemanns et al., 1993; Mamelle et al., 1994). Weitere Faktoren sind das Auftreten von Lokalrezidiven (40-50% der Patienten), Fernmetastasen (4,2-23,8 % der Patienten) (Vikram, 1984; Alvi und Johnson, 1997; Ferlito et al., 2001) und die Größe und Lokalisation des Primärtumors. Die Tumorgröße korreliert mit dem Lymphknotenstatus und ist bei lymphknoten-negativen PEK von prognostischer Relevanz. Die Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung bei Patienten mit PEK der Zunge im Tumorstadium T1, T2 und T3 nachzuweisen, liegt bei 18%, 33% bzw. 60% im Gegensatz zu 38%, 65% und 71% (Krause et al., 1973; Mendelson et al., 1976) bei Patienten, die an PEK der Mundhöhle erkrankt sind.

Es besteht weiterhin eine direkte Korrelation zwischen der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen und dem Auftreten von Fernmetastasen. Eine Studie von Leemanns et al. (1993) dokumentiert, dass nur 6,9% der Patienten Fernmetastasen

ohne nachweisbare Tumorabsiedlungen in den Halslymphknoten hatten, während 46,8% der Patienten mit drei oder mehr Lymphknotenmetastasen Fernmetastasen aufwiesen. Alvi und Johnson (1997) ermittelten ebenfalls ein signifikant höheres Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen bei histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen. In ihrer Studie hatten 69% der Patienten mit Fernmetastasen drei oder mehr pathologisch gesicherte Lymphknoten. Das Risiko für die Entstehung von Fernmetastasen wird zusätzlich durch die Anwesenheit von klinisch palpablen Lymphknoten, extrakapsulärer Streuung, drei oder mehr positiven Lymphknoten und dem histologischen Beweis von Lymphknotenmetastasen erhöht.

In früheren Zeiten wurde das Schicksal des Patienten durch das lokale Wachstum des Tumors determiniert. Die Karzinome zerstörten lebenswichtige Strukturen im Kopf- und Halsbereich (Hannahs et al., 1981). Mit Einführung der chirurgischen Tumorsektion gewann der Befall der lokoregionären Lymphknoten an Bedeutung (Callery et al., 1984). Die Mehrzahl der Patienten sind zum Zeitpunkt der Primärtherapie bereits lymphogen metastasiert. Wird den Patienten bei der Primärdiagnose das TNM-Stadium N0 zugeordnet, muss trotz allem mit einer klinisch okkulten Ausstreuung (Disseminierung) von Tumorzellen gerechnet werden. Die individuelle Risikoeinschätzung der einzelnen Krankheitsfälle wird durch die Heterogenität der Erkrankung, die mit unterschiedlichen klinischen Verläufen assoziiert sein kann, erschwert.

Trotz jüngster Fortschritte in der Diagnostik und der chirurgischen Behandlung von oralen/oropharyngealen Karzinomen hat sich in den letzten 20 Jahren die insgesamt schlechte Prognose der oralen Karzinome kaum verbessert (Gath, 1995). Verantwortlich dafür ist insbesondere die schlechte Früherkennungsrate (Mashberg und Samit, 1995). Frühe Rezidive bei pT3/pT4-Tumoren (15–30%) sind einer Studie von Leemann et al. (1994) zufolge Ursache unzureichend beurteilter Resektatränder.

Zudem fehlen bis heute die Möglichkeiten, das biologische Tumorverhalten über das *staging* hinaus mit entsprechenden molekularen Markern darzustellen, um mögliche Risikopatienten frühzeitig zu identifizieren und weitere therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können.

Neben diesen klassischen Faktoren wird mit Hilfe moderner molekularer Techniken nach neuen prognostischen Faktoren gesucht, die morphologische, biochemische, genetische und zellkinetische Eigenschaften des Tumors beschreiben. Dazu gehören beispielsweise Invasions- und Metastasierungsmarker (u.a. p53 und Cyclin D1, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind; nm23 und EpCAM, die bei der Metastasierung eine Rolle spielen), sowie Proliferationsmarker (z.B. epidermaler Wachstumsfaktor [*epidermal growth factor receptor*, EGFR], Ki-67) (Takes et al., 2001).

2.2 Entstehung und Metastasierung von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren wird Karzinogenese genannt. Die Metastasierung (griechisch: *metastasis* = Wegzug) ist der bedeutendste dynamische Prozess der malignen Tumoren.

2.2.1 Karzinogenese

Durch genetische Veränderungen kann das Gleichgewicht zwischen der Zellteilung, der Zellvermehrung (Proliferation) und dem natürlich programmierten Zelltod (Apoptose) gestört werden. Die Folge ist eine abnorm gesteigerte Proliferation der Zelle. Der Vorgang der Proliferation folgt den einzelnen Schritten des Zellzyklus.

Der Zellzyklus normaler Körperzellen wird in die Mitosephase (Kernteilungsphase) und die Interphase (Zwischenphase) unterteilt. Die Mitosephase unterteilt sich in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase. Die Interphase setzt sich aus der G1-Phase (Präsynthesephase), S-Phase (Synthesephase) und G2-Phase (Postsynthesephase) zusammen. In der G1-Phase werden zunächst alle Zellbestandteile rekonstruiert, die Zelle erreicht ihre ursprüngliche Form und Funktion wieder. In der anschließenden S-Phase findet die Synthese der Desoxyribonukleinsäure (DNA) statt. Die G2-Phase ist eine Ruhephase, in der sich die Zelle auf die Mitose vorbereitet. Wie oft eine Zelle diesen Zyklus durchläuft, ist abhängig von der Fähigkeit und Bereitschaft zur Teilung. Das Zusammenspiel von genau abgestimmten hemmenden und fördernden Signalketten beeinflusst und steuert den Zellzyklus einer gesunden Zelle. Für den Übergang in die S-Phase sind spezifische Proteinkinasen zur Phosphorylierung spezifischer Signalproteine notwendig. Diese Proteinkinasen werden durch Cyclin-Proteine aktiviert und deshalb auch Cyclin-abhängige Proteinkinasen (*cyclin dependent kinases*; CDK) genannt. Durch Mutationen von Schlüsselgenen, die unter

physiologischen Bedingungen für die Signaltransduktion bzw. Wachstumsregulation verantwortlich sind, kommt es zur malignen Transformation einer Zelle. Diese Schlüsselgene sind im wesentlichen Protoonkogene¹ (z.B. EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und Antionkogene². Antionkogene werden auch Tumorsuppressorgene (z.B. p53) genannt (Das und Nagpal, 2002; Löffler und Petrides, 2003).

Die Karzinogenese kann in unterschiedlichen Zeiträumen ablaufen und wird in folgende Phasen unterteilt: die Initiation, die Promotion und die Progression.

In der Initiationsphase kann es zur irreversiblen Schädigung des genetischen Materials und damit zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen aus Protoonkogenen kommen. Für diese Genmutationen werden verschiedene exogene und endogene Faktoren (Kanzerogene) mitverantwortlich gemacht. Exogene Faktoren sind beispielsweise Alkohol (Promotor³: Acetaldehyd), Tabakrauch (Promotoren: Nitrosamine, Phenole ect.) und Krankheitserreger, wie onkogene Viren (HPV-Infektion, EBV-Infektion). Endogene Faktoren sind genetische Prädispositionen in unterschiedlicher Ausprägung (Das und Nagpal, 2002). In der Initiationsphase kann der Organismus durch Inaktivierung oder Ausgrenzung der Kanzerogene eine Reaktion mit der DNA abwehren. Wenn das Genom bereits geschädigt ist, kann durch Reparatur des genetischen Schadens oder Einleitung der Apoptose die Entstehung eines Karzinoms verhindert werden. Diese veränderten Zellen in der Initiationsphase sind morphologisch nicht zu erkennen.

In der Phase der Promotion kommt es zur Fixierung des Schadens und durch den Verlust der Apoptosefähigkeit zur Ausbildung von morphologisch erkennbaren präneoplastischen Zellen, sogenannten Dysplasien.

Erst in der 3. Phase, der Manifestation und Progression, entsteht aufgrund einer zunehmend genetischen Instabilität aus einem benignen Tumor ein infiltrierender, metastasierender Tumor.

Auch histopathologisch kann sich diese Transformation vom benignen zum malignen Tumor manifestieren. Bei der geringgradigen Dysplasie (Grad 1) weist das zuvor regelrechte Plattenepithel der Schleimhaut geringgradige Zell- und Kernatypien auf

¹ Protoonkogene sind Gene, die für das normale Zellwachstum benötigt werden.

² Antionkogene codieren für Proteine, die bei DNA-Schäden die Zellen an der Proliferation hindern.

³ Der Promotor fördert die Entstehung von Genmutationen.

und die Basalzellschicht ist etwas verbreitert. Durch deutliche Zell und Kernatypien, ein Übergreifen der vermehrten Basalzellen auf weiter oberhalb liegende Epithelschichten und vermehrte Mitosen ist die mittelgradige Dysplasie (Grad 2) gekennzeichnet. Bei der hochgradigen Dysplasie/Carcinoma in situ (Grad 3) fehlt die Epithelschichtung völlig. Das histopathologische Bild ist charakterisiert durch zahlreiche Mitosen, atypische Mitosen sowie pleomorphe und hyperchromatische Zellkerne. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist zugunsten der Kerne verschoben.

2.2.2 Invasion und Metastasierung

Im Verlauf der Progression durchdringen Tumorzellen die Basalmembran und wandern in das subepitheliale Bindegewebe ein. Dieser Vorgang wird Invasion genannt und ist Voraussetzung für das Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband und die intravasale Ausbreitung, wodurch sie dann in einer anderen Region des Körpers als Tochtergeschwulst (Metastase) weiterwachsen können. Metastasierte Tumorzellen sind in der Lage, jahrelang in einer Art Latenzzeit (*tumor dormancy*) zu überdauern, um sich dann als Spätrezidiv klinisch zu manifestieren (Pantel und Brakenhoff, 2004).

Prinzipiell basiert die Tumorzellmigration auf ähnlichen oder identischen Vorgängen, die bei der physiologischen Fortbewegung z.B. von embryonalen oder immunkompetenten Zellen vorkommen. Durch lokale Proteolyse kommt es zur Ablösung von Tumorzellen des Primärtumors, die dann einzeln (*individual cell migration*) oder in Zellverbänden (*collective migration*) migrieren. Die Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, mit Hilfe von Adhäsionsproteinen, beispielsweise Integrinen, fokale Kontakte zur extrazellulären Matrix (EZM) herzustellen, die später durch Proteasen wieder gelöst werden können. Durch die koordinierte Bildung und Lösung der Kontaktstellen und durch die Kontraktion des Aktinmyosingerüsts der Zelle können die Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, sich fortzubewegen (Friedl und Wolf, 2003). Nach dem Eindringen in Lymph- oder Blutgefäße (Intravasation) werden die Tumorzellen in andere Regionen des Körpers mitgeführt. Dort heften sich die Tumorzellen an organspezifische Adhäsionsmoleküle (*homing*), treten aus dem Gefäßsystem aus (Extravasation) und werden entweder apoptotisch, proliferieren und bilden Metastasen oder überdauern als dormante Zellen. Über den bevorzugten Ort der Extravasation wurden von Paget (1889) und Ewing (1928) frühzeitig Theorien entwickelt. Paget vermutete in der „*Seed and Soil*“-Theorie („Aussaat und Boden“),

dass Tumorzellen ortsspezifisch disseminieren, da sie, um proliferieren zu können, auf ein bestimmtes Umgebungsmilieu angewiesen sind. Ewing diskutierte mechanisch-hämodynamische Ursachen der Metastasenausbreitung. Beide Theorien ergänzen sich und werden durch jüngste experimentelle Studien untermauert (Chambers et al., 2002).

Zu den Proteasen, die neben der lokalen Proteolyse für das Eindringen in die Gefäße und die Invasion in andere Bereiche des Körpers von enormer Bedeutung sind, werden die Matrix-Metalloproteasen (MMP) sowie die verwandten Proteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie, die Serinproteasen, zu denen Plasmin und Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) gehören, die Zysteinproteasen, zu denen Cathepsin B und L gerechnet werden und die Aspartatprotease Cathepsin D gezählt. Proteasen können von Tumor- oder Stromazellen produziert werden und befinden sich häufig perizellulär (Nöel et al., 1997; Sutinen et al., 1998; Egeblad und Werb, 2002).

Durch das genaue Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumordinvasion und Tumordissemination eröffnet sich die Möglichkeit, molekulare Mediatoren gezielt zu inhibieren. Auf diese Weise könnte möglicherweise die Lymphknotenbesiedlung reduziert und damit die Überlebensrate gesteigert werden (Howell und Grandis, 2005).

2.2.3 Metastasierungsmodelle

Nach dem traditionellen Metastasierungsmodell wird die Fähigkeit zur Metastasierung erst in späteren Tumorstadien erworben. Nur wenige Tumorzellen von Subklonen des Primärtumors mit vermehrtem Metastasierungspotential sind in der Lage zu migrieren und Metastasen auszubilden (Fidler und Kripke, 1977). Neuere Untersuchungen an Mammakarzinomen deuten allerdings darauf hin, dass bereits in frühen Stadien der Karzinogenese die Mehrzahl der Tumorzellen das Potential zur Metastasierung besitzt. Wenn das Potential zur Metastasierung bereits zu Beginn der Karzinogenese vorhanden ist, sind möglicherweise dieselben Gene sowohl für das Wachstum des Primärtumors als auch für die Metastasierung verantwortlich (Bernards und Weinberg, 2002). Inwiefern die Tumorzellen selbst am Prozess der Metastasierung beteiligt sind, ist bisher ungeklärt, da in vielen Studien Tumorzellen nicht isoliert untersucht werden, sondern in Assoziation mit den jeweils

umgebenden Zellen wie Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Pantel und Brakenhoff, 2004).

Die Streuung (Dissemination) der Tumorzellen erfolgt wahrscheinlich auf zwei unterschiedlichen Wegen, entweder hämatogen oder lymphogen. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen, dass das Genexpressionsmuster von Mammakarzinomen, die entweder lymphogen oder hämatogen disseminieren, kaum Überschneidungen aufweist (Wölfle et al., 2003). Vermutlich wird bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung des Primärtumors neben dem Potential zur Metastasierung auch der Weg für die Metastasierung festgelegt. So metastasieren Mammakarzinome gelegentlich primär hämatogen und bilden in entfernten Körperregionen Metastasen, während die Lymphknoten tumorfrei bleiben.

Die Metastasierung der oralen PEK erfolgt überwiegend lymphogen. Disseminierte Tumorzellen (DTZ) proliferieren in den Lymphknoten und bilden solide Metastasen, während die Tumorzellen in fernen Regionen absterben oder als dormante Zellen überdauern. In späteren Tumorstadien migrieren von der Lymphknotenmetastase gelöste Tumorzellen an andere Orte, um Sekundärmetastasen zu bilden. Möglicherweise ist die Fähigkeit zur Fernmetastasierung erst durch die Entwicklung von Metastasen im Lymphknotengewebe gegeben (Gath und Brakenhoff, 1999; Pantel und Brakenhoff, 2004).

2.3 Disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen

Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung von Karzinomerkrankungen in den letzten Jahrzehnten haben dazu geführt, dass immer häufiger Tumorgewebe frühzeitig entdeckt und vollständig entfernt werden konnte. Die therapeutischen Interventionen und die Lebenserwartung der Patienten sind zunehmend abhängig von einer frühzeitigen Metastasierung. Zur Zeit der Erstdiagnose können die oft okkulten disseminierten Tumorzellen mit konventionellen Methoden nicht diagnostiziert werden (Pantel et al., 1999; Pantel und Brakenhoff, 2004). Okkulte Metastasen werden laut Hermanek (1999) in Mikrometastasen (MM) und Metastasen eingeteilt. MM stellen das früheste Stadium einer Lymphknotenmetastase dar, d.h. sie sind Voraussetzung für die Entstehung einer Tumorzellkolonie. MM sind histologisch definiert als Karzinomherd, der in keiner Schnittebene mehr als 2 mm in seiner größten Ausdehnung aufweist (van den Brekel, 1996; Woolgar, 1999b;

Hamakawa et al., 2000). Vereinzelt disseminierte Tumorzellen (DTZ) sind von dieser Definition ausgeschlossen.

Die Halslymphknoten stellen ein bevorzugtes Organ für die Primärmetastasierung der oralen/oropharyngealen Karzinome dar. Da einer Studie zufolge der Pathologe bei einem Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbten Paraffinschnitt nur eine 1%ige Chance hat, eine kleine Metastase (drei Zellen im Durchmesser) zu identifizieren (Gusterson und Ott, 1990), wurden für die frühzeitige Aufdeckung der DTZ/MM neue Methoden (immunzytochemische und molekulare Analysen) etabliert. Die prognostischen Faktoren des Patienten werden in der Diagnostik hauptsächlich am Primärtumorgewebe ermittelt. Das metastatische Potential des Primärtumors kann nur indirekt abgeschätzt werden. Der Nachweis von Lymphknotenmetastasen oder DTZ/MM ist Ausdruck für die Metastasierung von Tumorzellen (Diel, 2001). Lymphknoten, Knochenmark und Blut zählen zu den geeigneten mesenchymalen Kompartimenten des Körpers, in denen sich gewebefremde epitheliale DTZ nachweisen lassen. Das Material der Lymphknoten ist aufgrund der begrenzten Lymphknotendisektion im Gegensatz zum Blut nur limitiert vorhanden und evaluierbar (Pantel et al., 1999). Der Nachweis der DTZ/MM und kleiner Tumorzellcluster wurde in die 6. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren aufgenommen. Die Detektion dieser Zellen gilt jedoch nicht als Metastasierung (UICC, 2002).

2.3.1 Detektion von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten

Das Standard-Nachweisverfahren von DTZ/MM ist die immunhistochemische Detektion. Diese Methode basiert auf der Erkennung von epithelialen oder tumorassoziierten Antigenen durch monoklonale Antikörper. Dabei haben sich Primärantikörper, die gegen Zytokeratine (*cytokeratine*, CK) gerichtet sind, als relativ spezifisch erwiesen, da lymphatisches Gewebe keine CK exprimiert (Pantel und Brakenhoff, 2004). CK kommen im Zytoplasma als Bestandteil des Zytoskeletts von Epithelzellen vor. Auch Karzinome beispielsweise orale/oropharyngeale PEK und ihre DTZ/MM enthalten CK. CK dienen der Formgebung und Organisation der Zellen. Die Genfamilie der CK besteht aus mehr als 20 verschiedenen Mitgliedern (Moll et al., 1982; Moll, 1994). Sie werden in zwei Gruppen (Untergruppe Typ I oder saures CK 9-20 und Untergruppe Typ II oder neutral-basisches CK 1-8) unterteilt, die

typischer aber nicht notwendigerweise gemeinsam als spezifisches Paar mit einem komplexen Expressionsmuster auftreten (Jacques et al., 2005). Keratinfilamente sind Heteropolymere, die aus jeweils zwei unterschiedlichen Arten von CK, zwei CK von Untergruppe Typ I und zwei von Untergruppe Typ II, gebildet werden. Jede epitheliale Zelle exprimiert demzufolge mindestens zwei unterschiedliche CK. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass unterschiedliche Epithelien jeweils charakteristische CK-Expressionen mit typisch topographischen Eigenschaften aufweisen (Cooper et al., 1985; Miettinen, 1994). So produzieren beispielsweise einfache Epithelien der Leber und des Pankreas CK 8 und CK 18, während alle Plattenepithelien CK 5 und CK 14 exprimieren (Moll et al., 1982; Sawaf et al., 1991). Karzinome enthalten gewöhnlich CK ihres normalen Ursprungsgewebes und entwickeln gelegentlich neue oder reduzieren die Expression bestimmter CK (Schaafsma und Ramaekers, 1994).

Aufgrund der Heterogenität der einzelnen Tumorzellen sollte für eine effektive immunhistochemische Detektion eine Kombination von verschiedenen Anti-CK-Antikörpern verwendet werden (Pantel et al., 1999; Lugo et al., 2003). Die detektierten „epithelialen Fremdzellen“ in den Lymphknoten werden in der vorliegenden Arbeit auch als „Zytokeratin-positve Zellen“ (CK-positive Zellen, *cytokeratinpositive cells*, CK+) bezeichnet. CK-positive Zellen in Lymphknoten konnten bei einer Reihe von Tumorentitäten detektiert werden (Matsumoto, 2000; Freneaux et al., 2002; Komukai et al., 2002; Palma et al., 2003).

Molekulare Nachweismethoden wie die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bzw. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) scheinen neue und viel versprechende Ansätze zum Nachweis von Tumorzellen zu sein. Mit diesen Methoden werden keine einzelnen exprimierten Proteine, sondern tumorspezifisch veränderte mRNA- oder DNA-Sequenzen in Gewebeproben auffindig gemacht. Der Vorteil liegt in der hohen Zielgenauigkeit und Spezifität des Verfahrens. Bei der RT-PCR wird zuerst die RNA in DNA umgewandelt und anschließend mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt. Die amplifizierte DNA wird mittels fluoreszierender DNA-Sequenz gelelektrophoretisch oder durch Southern Blot und Hybridisierung sichtbar gemacht.

2.3.2 Klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten

Obwohl in umfangreichen Studien zahlreiche Biomarker der Karzinome und ihr Nutzen für die Prognose untersucht wurden, ist der Lymphknotenstatus nach wie vor der wichtigste prognostische Faktor für Patienten mit PEK im Kopf- und Halsbereich (Osaki et al., 1996; Woolgar et al., 1995). Die Anwesenheit und Anzahl von multiplen Lymphknotenmetastasen, das Primärtumorstadium sowie die Lokalisation des Primärtumors sind nachweislich mit einer signifikant ungünstigeren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert (Jones et al., 1994; Pinsolle et al., 1997; Woolgar, 1999b). In Bezug darauf wird erwartet, dass eine frühzeitige Detektion von DTZ in den Halslymphknoten das Überleben der Patienten positiv beeinflusst. Einige Arbeitsgruppen konnten an unterschiedlichen Karzinomen den Nachweis von DTZ in Lymphknoten und deren prognostische Bedeutung bei Patienten ohne Fernmetastasierung bestätigen (Tabelle 2.4). Diese prospektiven Studien zeigen, dass der Lymphknotenstatus bei Karzinomen eine signifikante Aussagekraft für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben besitzt. Einige Untersucher dokumentierten signifikante Korrelationen des Lymphknotenstatus zu den Faktoren Tumorgröße, Tumorinvasion und vaskuläre Invasion (Bettelheim et al., 1990, Endo et al., 2005), während andere keinen signifikanten Zusammenhang darstellen konnten (Matsumoto et al., 2000, Rhee et al., 2002). Diese Studien unterstützen die Bedeutung der Ermittlung des realen Lymphknotenstatus, um möglicherweise das *Tumorstaging* zu verbessern und klinische Entscheidungen über zusätzliche adjuvante Therapien zielgerichtet treffen zu können.

Obwohl es erwiesen scheint, dass die regionale Tumorzellausbreitung entscheidend für die Prognose des Patienten ist, konnte in mehreren Studien kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auffinden von DTZ und der prognostischen Relevanz gefunden werden (Calaluce et al., 1998; Glickman et al., 1999; Woolgar, 1999; Sato et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Tanabe et al., 2003).

Diese Diskrepanzen sind wahrscheinlich auf eine ungenügende Standardisierung der Methoden zurückzuführen. Darüber hinaus könnte die geringe Anzahl an untersuchten Patienten für die fehlende prognostische Aussagekraft verantwortlich sein.

Tabelle 2.4 Übersicht einiger immunhistochemischer Studien an verschiedenen Tumorentitäten mit prognostischer Relevanz von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten

Tumorlokalisation	Detekt. Antigen	Anzahl der Patienten mit DTZ/ Gesamtpatientenzahl (%)	Signifikante prognostische Bedeutung	Autoren ¹
Orale/oropharyn. PEK	AE1/AE3	2/40 (5%)	-	Enepekides et al., 1999
Mammakarzinom	CK ⁴ , EMA ⁵	21/150 (14%)	RFÜ ² , GÜ ³	Trojani et al., 1987
Ösophaguskarzinom	AE1/AE3	33/59 (55,3%)	RFÜ, GÜ	Matsumoto et al., 2000
Magenkarzinom	CAM5.2 ⁶	8/34 (23,5%)	GÜ	Maehara et al., 1996
Magenkarzinom	AE1/AE3	19/180 (10,6%)	GÜ	Ishigami et al., 2003
Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Ber-Ep4 ⁷	29/93 (31,2%) pN0=20/73 pN1=9/20	RFÜ, GÜ	Izbicki et al., 1996
Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Ber-Ep4	27/125 (21,6%)	RFÜ, GÜ	Kuboschok et al., 1999
Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Ber-Ep4	27/125 (21,6%) pN0=11/70 pN1=4/25 pN2=12/30	RFÜ, GÜ	Passlick und Pantel, 2000

¹Alle Forschergruppen untersuchten Lymphknoten an unterschiedlichen Tumorentitäten, ²RFÜ: Rezidiv-Freies-Überleben, ³GÜ: Gesamtüberleben, ⁴CK: Zytokeratin, ⁵EMA: *epithelial membrane antigen*, ⁶CAM 5.2: gegen Zytokeratine 8 und 18 gerichtet, ⁷Ber-Ep4: 17-1A Antigen (=Ep-CAM), AE1/AE3: Pan-CK-Antikörper

In einer Reihe von Untersuchungen an Mammakarzinomen wurde die klinische Relevanz von DTZ im Knochenmark, deren Präsenz mit einer nachweislich

schlechteren Prognose korreliert, nachgewiesen (Pantel et al., 1999; Braun et al., 2000a). Braun et al. (2005) bestätigen dies in einer Langzeitstudie an 4703 Patienten. In einer weiteren Studie mit 484 nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen war der Nachweis von DTZ/MM in axillären Lymphknoten und/oder im Knochenmark ebenso mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Gerber et al., 2001). Der Nachweis von DTZ/MM in Lymphknoten scheint interessanterweise nicht mit dem KM-Status zu korrelieren. Möglicherweise werden die hämatogene und lymphatische Metastasierung durch unterschiedliche Gene reguliert (Braun et al., 2001; Gerber et al., 2001).

Im Gegensatz zur aufwendigen und für die Patienten unangenehme Knochenmarksaspiration scheint die Detektion von DTZ/MM im Blut eine viel versprechende Alternative. Die Blutentnahme ist eine gering invasive Methode, die beliebig oft zur Probengewinnung wiederholt werden kann. Prospektive Studien einer Reihe von Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass auch DTZ/MM im Blut beim primären Mammakarzinom eine signifikante und unabhängige prognostische Aussagekraft für das rezidivfreie Überleben und für das Gesamtüberleben besitzen (Cristofanilli et al. 2004; Christifanilli et al., 2005; Hayes et al. 2006; Riethdorf et al. 2007). Müller et al. (2005) untersuchten DTZ/MM sowohl im Knochenmark als auch im Blut und fanden eine signifikante Korrelation. 33,3% (3/9 Patienten) der Patienten mit positivem Knochenmarkstatus zeigten gleichzeitig DTZ im Blut, während bei nur 2,3% (2/44 Patienten) der Patienten ohne DTZ/MM im Knochenmark DTZ im Blut nachweisbar waren (Müller et al., 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Von 78 Patienten mit histologisch gesicherten PEK im oropharyngealen Bereich, die sich zwischen 1996 und 2003 in der Nordwestdeutschen Kieferklinik (Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie) und in der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf einer Tumorresektion einschließlich Lymphknotendissektion unterzogen, wurden in der vorliegenden Arbeit 667 Lymphknoten untersucht. Das mittlere Alter der Patienten betrug 63 Jahre (von 33 bis 87 Jahren). Das Verhältnis von männlich zu weiblich lag bei etwa 2:1 (50 Männer und 28 Frauen).

Die Operationspräparate einschließlich Lymphknoten wurden routinemäßig unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation nach UICC durch Pathologen im ehemaligen Institut für Oralpathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf beurteilt.

Aus den Berichten zur pathologisch-anatomischen Begutachtung konnte entnommen werden, dass 24 der Patienten Lymphknotenmetastasen hatten. Die übrigen 54 (N0) Patienten waren metastasenfrem. In die Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen (DTZ)/Mikrometastasen (MM) gingen einerseits weitere metastasenfrem Lymphknoten von Patienten ein, bei denen bereits histologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen vorlagen, und andererseits lagen metastasenfrem Lymphknoten von Patienten mit Tumoren vor, die nicht lymphatisch metastasiert waren.

Von den primär metastasenfrem Lymphknoten der Patienten wurden im Abstand von 150 µm 4 Schnittstufen angefertigt und mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein von DTZ/MM untersucht. 54 Patienten befanden sich im Lymphknotenstadium N0, 17 Patienten im Stadium N1, 5 Patienten im Stadium N2b und 2 Patienten im Stadium N2c.

Die klinisch-histologischen Parameter der untersuchten Fälle sind im Folgenden in Tabelle 3.1a und 3.1b aufgeführt.

Tabelle 3.1a Patienten und Tumorcharakterisierung

Anzahl der Patienten	78
männlich/weiblich	50/28
Alter	
Mittelwert	62, 58
Range	33 – 87
pT-Stadium	
pT1	34
pT2	23
pT3	4
pT4	13
pTx	4
Lokalisation	
MB	29
Zunge	16
Oropharynx	5
WSH	5
Alveolarkamm	5
MB/Oropharynx	1
WSH/MB	2
Zunge/MB	7
Alveolarkamm/MB	6
WSH/Alveolarkamm	1
unbekannt	1
pN-Stadium	
pN0	54
pN1	17
pN2b	5
pN2c	2

Tabelle 3.1b

Übersicht der untersuchten Fälle unter Berücksichtigung der Tumorgröße, des Lymphknotenstatus, des *grading*, des Geschlechtes und des Alters

lfd. Nr.	pT	pN	Lokalisation	grading	Geschlecht	Alter
1	4	1	MB, Kieferwinkel links	G2	f	75
2	4	1	MB, Alveolarkamm	G2	f	84
3	2	1	Oropharynx	G3	m	67
4	2	1	Alveolarkamm	G2	f	61
5	4	1	Zunge	G2	m	52
6	1	1	MB, Unterkiefer rechts	G2	f	52
7	2	1	MB	G2	m	49
8	1	2b	MB, retromolar rechts	G3	m	65
9	1	1	Zunge	G1	f	65
10	1	1	Zunge	G2	m	49
11	4	2b	Zunge	G2	m	45
12	2	1	WSH, MB	G1	m	53
13	2	1	WSH, MB	G1	m	54
14	4	1	MB	G2	m	68
15	1	1	MB	G2	m	64
16	4	1	WSH	G2	m	87
17	2	2b	Oropharynx	G3	f	68
18	4	1	Zunge, MB	G2	m	44

19	x	1			f	78
20	2	1	MB	G1	f	78
21	2	2b	Zunge	G2	m	42
22	3	2c	Zunge	G2	m	46
23	3	2c	Alveolarkamm	G3	f	63
24	2	2b	MB, Unterkiefer	G2	m	67
25	1	0	Zunge, MB	G2	m	55
26	1	0	MB, Alveolarkamm	G2	f	67
27	4	0	Alveolarkamm	G2	m	61
28	3	0	MB	G2	f	63
29	1	0	MB	G2	f	64
30	x	0	WSH, Alveolarkamm	G2	f	84
31	1	0	Zunge	G3	m	59
32	4	0	MB	G2	m	68
33	1	0	MB	G2	m	45
34	1	0	MB	G3	m	77
35	1	0	MB, Alveolarkamm	G2	m	58
36	1	0	WSH	G2	f	83
37	4	0	Zunge	G2	m	56
38	3	0	MB	G2	f	47

39	1	0	MB	G2	m	62
40	1	0	MB	G2	m	73
41	1	0	Oropharynx	G1	f	76
42	1	0	WSH	G1	m	71
43	2	0	MB	G3	m	62
44	1	0	MB	G2	m	47
45	1	0	MB	G3	m	45
46	1	0	MB	G2	m	54
47	1	0	Alveolarkamm	G1	m	62
48	2	0	MB, intermaxillär	G2	m	61
49	2	0	MB	G3	m	52
50	2	0	Zunge	G1	m	68
51	1	0	Alveolarkamm, MB	G3	m	56
52	2	0	Zunge	G1	m	33
53	2	0	WSH	G3	m	68
54	1	0	MB	G3	m	56
55	1	0	Zunge	G1	m	80
56	2	0	Zunge	G2	m	63
57	1	0	Alveolarkamm	G2	f	76
58	2	0	Oropharynx	G2	f	65

59	2	0	Zunge	G2	m	50
60	1	0	MB	G2	m	64
61	2	0	WSH	G2	f	63
62	1	0	MB	G2	m	46
63	1	0	Zunge, retromolar	G2	m	47
64	1	0	Zunge	G2	f	54
65	4	0	MB, Alveolarkamm	G2	m	66
66	1	0	Oropharynx	G2	f	45
67	x	0	MB	G2	f	55
68	1	0	MB	G3	f	65
69	2	0	Zunge, MB	G1	f	77
70	1	0	MB	G3	f	65
71	2	0	MB	G2	m	49
72	1	0	MB		f	70
73	4	0	MB	G2	m	60
74	1	0	MB	G2	m	87
75	4	0	Zunge, MB	G2	m	49
76	2	0	Zunge	G3	m	69
77	2	0	MB	G2	m	54
78	x	0	Zunge		f	62

3.2 Materialien und Reagenzien für die immunhistochemischen Analysen

In den Tabellen 3.2, 3.3 und 3.4 sind alle Reagenzien aufgeführt, die für die immunhistochemischen Analysen benötigt wurden.

Tabelle 3.2 Materialien und Reagenzien für den Nachweis von DTZ/MM mittels immunhistochemischer Analyse

Material/Reagenz	Bezugsquelle/Firma
Xylol C ₈ H ₁₀	Riedel-deHaën® (Seelze, D)
Alkohol 100%, 96%, 80%	Walter CMP GmbH&Co.KG(Kiel, D)
Zitratpuffer (ChemMate™Target Retrieval Solution) x 10	Dako (Hamburg, D)
Zitratpuffer	BioGenix
H ₂ O ₂ »blocking solution «	Dako
Tris-Base	Sigma (München, D)
NaCl	J.T.Baker
Tween-20	Sigma (München, D)
25% HCl	Riedel-deHaën® (Seelze, D)
Mayers Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
Eukitt	Merck (Darmstadt, D)
Automat- Autostainer	Dako (Hamburg, D)
Proteinase K	Dako (Hamburg, D)
Protease 1	Ventana (Tucson, USA)
„antibody diluent“	Dako (Hamburg, D)
Wirbler	Heidolph (Bremen, D)
Mikrowellenofen Jet 1000 W	Whirlpool (Schorndorf, D)
Brutschrank	Medite GmbH (Burgdorf, D)

Tabelle 3.3 Auflistung der getesteten monoklonalen Antikörper und Isotypkontroll-Antikörper

Name	Herkunft	Isotyp	Bezugsquelle/Firma
Keratin-903	Maus	IgG ₁	Enzo
34βE12	Maus	IgG ₁	Dako
AE1/AE3	Maus	IgG ₁	Novocastra
A45-B/B3	Maus	IgG ₁	Micromet
EMMPRIN	Maus	IgG ₁	BD GmbH
p53 (Ab-6)	Maus	IgG _{2a}	Calbiochem®
p16 ^{INK4}	Maus	IgG ₁	BD GmbH
EGFR	Maus	IgG ₁	Dako
EpCAM	Maus	IgG ₁	Dako
MOPC-21 (Kontrolle)	Maus	IgG ₁	Sigma

Tabelle 3.4 Auflistung der getesteten Enzymkonjugate

Name	Zusammensetzung	Bezugsquelle/Firma
ChemMate™Detection Kit, Peroxidase/DAB Code: K 5001	Biotinylierter Sekundärantikörper, konjugiert mit Streptavidin- Peroxidase, DAB+Chromogen zur Visualisierung	Dako
EnVision™Detection Kit Code: K 5007	Sekundärantikörper mit DAB Substrat Puffer (Peroxidase-Anti- Peroxidase-Technik)	Dako
ChemMate™Detection Kit APAAP, Mouse Code: K 5000	Sekundärantikörper (anti- mouse), APAAP Immunkomplex, Chromogensubstrat (Neufuchsin), Levamisole	Dako

In den Tabellen 3.5 bis 3.7 werden die Ansätze der Puffer und Substratlösungen aufgeführt.

Tabelle 3.5

TBST-Puffer 3l (10fach)	
	181,71 g Tris-Base
	262,98 g NaCl
	15 g Tween-20
	25% HCl (pH Wert 7,6)
	ad 3l Aqua dest.
	1:10 Verdünnung mit Aqua dest.

Tabelle 3.6

TEC-Ansatz 1l (20fach)	
	5 g Tris-Base
	10 g Titriplex III/EDTA
	6,4 g Tri-Na-Citrat-2H ₂ O
	ad 1l Aqua dest. (pH 7,8)
	1:20 Verdünnung mit Aqua dest.

Tabelle 3.7 Neufuchsin-Substratlösungsansatz des ChemMate™Detection Kits
APAAP, Mouse

Endvolumen ml	1,00 ml
AP-Substrat Puffer (Flasche F)	1,00 ml
Chromogen Red 1 (Flasche C)	40 µl
Chromogen Red 2 (Flasche D)	40 µl
Chromogen Red 3 (Flasche E)	40 µl

Auf 10 ml AP(Alkalische Phosphatase)-Substrat kann durch Zugabe von einem Tropfen Levamisol (Flasche G) die endogene Phosphatase blockiert werden.
Die Neufuchsin-Substratlösung erst 20 min vor Gebrauch ansetzen!

Entparaffinisierung der Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe

1. Paraffinschnitte 2 x 10min in Xylol tauchen
2. Paraffinschnitte 2 x 5min in 98% Ethanol tauchen
3. Paraffinschnitte 2 x 5min in 96% Ethanol tauchen
4. Paraffinschnitte 2 x 5min in 80% Ethanol tauchen
5. Paraffinschnitte 2 x 5min in TBST-Puffer waschen

Entwässern der Paraffinschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe

1. Paraffinschnitte 2 x 5min in 80% Ethanol tauchen
2. Paraffinschnitte 2 x 5min in 96% Ethanol tauchen
3. Paraffinschnitte 2 x 5min in 98% Ethanol tauchen
4. Paraffinschnitte 2 x 10min in Xylol tauchen

3.3 Optimierung des immunhistochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen mit Hilfe von Paraffinschnitten von Primärtumoren

Die verschiedenen Optimierungsversuche sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Zunächst wurde die für die Routine-Diagnostik CK-positiver Tumoren etablierte immunhistochemische Nachweismethode ausgetestet und für eine sichere Erfassung von CK-positiven Einzelzellen in Lymphknoten optimiert. Dazu wurde die Invasionsfront mehrerer Primärtumoren genutzt, in der vermehrt Tumoreinzelzellen nachweisbar waren, vergleichbar mit DTZ in Lymphknoten.

Es wurden die monoklonalen Primärantikörper Anti-Keratin-903™ (Enzo, Klon: 34βE12), der gegen CK 1, 5, 10, und 14 gerichtet ist und AE1/AE3, der zwei monoklonale Antikörper beinhaltet, ausgetestet. AE1 detektiert die hochmolekularen CK 10, 14, 15 und 16 sowie das niedermolekulare CK 19. Der Klon AE3 markiert die hochmolekularen CK 1, 2, 3, 4, 5 und 6 sowie das niedrigmolekulare CK 7 und 8. Ausgetestet wurden verschiedene Antikörperverdünnungen mit unterschiedlichen Vorbehandlungen zur Antigendemaskierung, unterschiedliche Inkubationszeiten und Nachweissysteme, wie z.B. die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex), die Avidin-Biotin-Methode oder EnVision™ (Tabelle 3.8). Bei den Immunreaktionen wurde parallel eine Isotypkontrolle für die einzelnen Primärantikörper verwendet. Statt des Primärantikörpers mit gerichteter Spezifität wurde MOPC-21 mit dem identischen Isotyp und irrelevanter Spezifität in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Weiterhin wurde der manuelle immunhistochemische Nachweis mit dem automatischen Nachweis im Dako Autostainer verglichen.

Tabelle 3.8 Darstellung der unterschiedlichen Optimierungsansätze

Antikörper	Konzentrationen	Vorbehandlung	IHC-Methode	manuell bzw. automatisch	PAK-Inkubationszeit
Anti-Keratin-903™ (Enzo)	gebrauchsfertig vom Hersteller	Zitratpuffer/Mikrowelle 1000W für 30min	APPAP-Methode	manuell	4°C über Nacht
Anti-Keratin-903™ (Enzo)	gebrauchsfertig	Zitratpuffer/Mikrowelle 1000W für 30min	APPAP-Methode	manuell	1h bei 37°C
Anti-Keratin-903™ (Enzo)	gebrauchsfertig	Protease1 im Brutschrank bei 37°C für 7min oder Zitratpuffer/Mikrowelle 1000W für 30min	EnVision™ Detektions Kit	manuell	1h bei 37°C
Anti-Keratin-903™ (Enzo) = 34βE12 (Dako)	gebrauchsfertig, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500	Zitratpuffer/Mikrowelle 1000W für 30min	indirekte ABC-Methode	automatisch	
AE1/AE3 (Novocastra)	1:200	Zitratpuffer/Mikrowelle 1000W für 30min	APPAP-Methode	manuell	4°C über Nacht
AE1/AE3	1:100, 1:200	Zitratpuffer/Mikrowelle	APPAP-Methode	manuell	1h bei 37°C

(Novocastra)		1000W für 30min			
AE1/AE3 (Novocastra)	1:25, 1:50, 1:100, 1:200	Protease1 im Brutschrank bei 37°C für 7min	APPAP-Methode	manuell	1h bei 37°C
AE1/AE3 (Novocastra)	1:50, 1:100, 1:200	Protease1 im Brutschrank bei 37°C für 7min	EnVision™Detekti ons Kit	manuell	1h bei 37°C
AE1/AE3 (Novocastra)	1:50, 1:100, 1:200	Protease1 im Brutschrank bei 37°C für 7min	indirekte ABC- Methode	automatisch	

Alle Paraffinschnitte wurden im Vorfeld der immunhistochemischen Analyse 30 min im Brutschrank bei 80°C inkubiert und anschließend entparaffiniert.

Es wurden zunächst verschiedene Methoden zur Optimierung der Detektion von CK an oralen primären PEK getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

3.3.1 Detektion Zytokeratin-positiver Zellen mit den Antikörpern AE1/AE3 oder Keratin-903™

In einem ersten Schritt wurde zum Nachweis von DTZ die manuelle immunhistochemische Analyse unter Verwendung der APAAP-Methode (Abbildung 3.1) getestet. Zur Antigendemaskierung wurden die Paraffinschnitte mit Zitratpuffer (pH 6,0) für 30min in der Mikrowelle vorbehandelt.

Die monoklonalen Pan-CK-Antikörper aus der Maus Keratin-903™ (Enzo, Klon: 34βE12, IgG₁) und AE1/AE3 (IgG₁, Dako) dienten als Primärantikörper.

Keratin-903™ ist laut Angabe des Herstellers gebrauchsfertig. AE1/AE3 wurde in einer Konzentration von 1:200 mit dem Verdünnungsmedium „antibody diluent“ (Dako) verwendet. MOPC-21 (IgG₁) wurde in einer Konzentration von 1:1000 als Isotypkontroll-Antikörper eingesetzt. Der Brücken- oder Sekundärantikörper ist ein Anti-Maus-Antikörper, der von Kaninchen gebildet wurde. Danach wurden die Paraffinschnitte mit einer APAAP-Lösung inkubiert. Das Enzymkonjugat APAAP besteht aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und einem Anti-Enzymkomplex, dem monoklonalen Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper, der aus derselben Spezies wie der Primärantikörper stammt. Der Sekundärantikörper kann dadurch den Primärantikörper mit APAAP verbinden. So entstand eine Vernetzung und damit eine Verstärkung der Reaktion, was die Empfindlichkeit der Methode erhöhte. Je zwei Moleküle Enzym sind an einen Antikörper gebunden.

Zur Substratentwicklung diente eine Neufuchsin-Substratlösung. Durch den Zusatz von Levamisol zur Substratlösung wurde die endogene alkalische Phosphatase-Aktivität gehemmt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun. Primäre orale PEK dienten als Positivkontrolle.

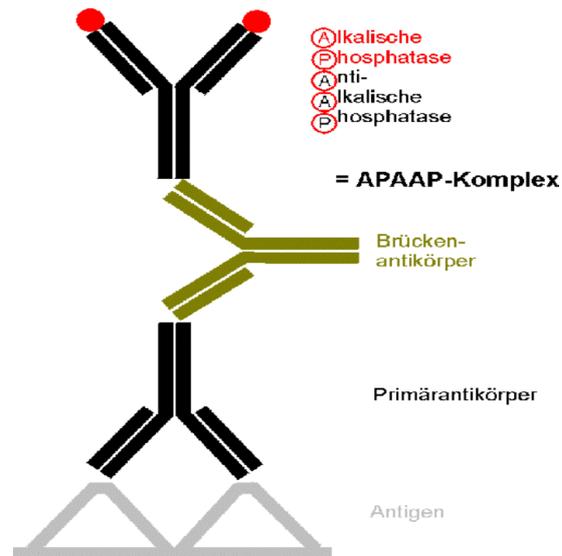


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der APAAP-Methode zur Markierung von CK (Dako, Hamburg)

Durchführung der APAAP-Methode zur Detektion von oralen/oropharyngealen PEK

1. Vorbehandlung in Zitratpuffer (Dako) im Mikrowellenofen bei 1000W 30min inkubieren
2. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
3. 100 μ l Lösung mit Primärantikörper Keratin-903™ (gebrauchsfertig), AE1/AE3 (Konzentration 1:200) bzw. 100 μ l Lösung mit Isotypkontroll-Antikörper (MOPC-21, Verdünnung 1:1000) auftragen und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubieren
4. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
5. „ChemMate™Detection Kit APAAP, Mouse“
 - Sekundärantikörper (Flasche A) auftragen und 30min inkubieren
 - 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
 - APAAP-Immunkomplex (Flasche B) auftragen und 30min inkubieren
 - 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
 - Neufuchsin-Substratlösung auftragen und Farbreaktion beobachten
6. Abstoppen der Farbreaktion in Aqua dest.
7. Zellkernfärbung mit Hämalaun

8. Bläuen unter Leitungswasser
9. Entwässern der Paraffinschnitte
10. Paraffinschnitte mit Eukitt eindeckeln

3.3.2 Vorbehandlungen der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden unterschiedlich vorbehandelt. Für den Primärantikörper Keratin-903™ wurde mit Zitratpuffer (Dako) im Mikrowellenofen bei 1000W 30min inkubiert. Für den Primärantikörper AE1/AE3 wurden die Paraffinschnitte entweder sieben Minuten mit Protease1 im Brutschrank bei 37°C oder mit Zitratpuffer (Dako) im Mikrowellenofen vorbehandelt. Für den Isotypkontroll-Antikörper MOPC-21 wurden die Paraffinschnitte sieben Minuten mit Protease1 im Brutschrank bei 37°C vorbehandelt.

Nach Zugabe der Primärantikörper wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Keratin-903™ wurde als gebrauchsfertige Lösung verwendet. AE1/AE3 wurde in den Konzentrationen 1:100 und 1:200 für beide Vorbehandlungen verwendet. Die Negativkontrolle wurde mit dem Isotypkontroll-Antikörper 1:500 und 1:1000 verdünnt eingesetzt.

3.3.3 EnVision™ Nachweissystem

Zur weiteren Optimierung der immunhistochemischen Analyse wurde das EnVision™ Detektions Kit eingesetzt. Die Vorbehandlung der Paraffinschnitte erfolgte für Keratin-903™ einerseits mit Zitratpuffer (30min, Mikrowellenofen 1000W) und für einen weiteren Paraffinschnitt mit Protease1, für AE1/AE3 und MOPC-21 mit Protease1 (7min bei 37°C). Die Paraffinschnitte wurden entweder mit Primärantikörper Keratin-903™, mit AE1/AE3 1:50, 1:100 bzw. 1:200 konzentriert oder mit MOPC-21 in einer 1:1000 Konzentration inkubiert. Die weiteren Schritte für die Analyse mit dem EnVision™ Detection Kit (Code: K5007) wurden nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt.

Durchführung der immunhistochemischen Analyse mit dem EnVision™ Detction Kit (Code: K5007)

1. Vorbehandlung für Keratin-903™ mit Zitratpuffer (Dako) 30min im Mikrowellenofen bei 1000W
AE1/AE3 und MOPC-21 mit Protease1 7min bei 37°C inkubieren

2. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
3. Inkubation mit Primärantikörper 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank
4. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
5. EnVision™Detection Kit
-Paraffinschnitte mit Lösung A 10min inkubieren
6. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
7. Paraffinschnitte 5-10min mit DAB inkubieren
8. Farbentwicklung in Aqua dest. stoppen
9. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun 10sec
10. Paraffinschnitte entwässern
11. Paraffinschnitte mit Eukitt eindeckeln

3.3.4 Manuelle und automatische Methode

Nach der Vorbehandlung der Paraffinschnitte (Keratin-903™-Zitratpuffer, 30min im Mikrowellenofen; AE1/AE3 und MOPC-21 7min mit Protease1 inkubieren) wurden einerseits die Primärantikörper AE1/AE3 in den Konzentrationen von 1:25, von 1:50 und der Isotypkontroll-Antikörper MOPC-21 in einer Konzentration von 1:25 mit der APAAP-Methode (ChemMate™Detection Kit, Dako) durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind dem Protokoll 3.3.1 zu entnehmen. Andererseits wurden Paraffinschnitte mit Keratin-903™ in der durch den Hersteller vorgegebenen Konzentration mit AE1/AE3 in den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:200 und der Isotypkontroll-Antikörper MOPC-21 in einer Konzentration von 1:50 im automatischen System mit der indirekten Avidin-Biotin-Complex Methode (ABC-Methode) getestet (Abbildung 3.2).

Zuerst wurden die Paraffinschnitte zur Antigendemaskierung mit Zitratpuffer für 30min im Mikrowellenofen bei 1000 W inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in Aqua dest. überführt. Als Nachweissystem diente das ChemMate™Peroxidase/DAB Kit (Dako). Nach Angaben des Herstellers (Dako Cytomation) handelt es sich bei der Anwendung des Kits um ein dreistufiges Verfahren. Zuerst erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Im zweiten Schritt wird der biotinylierte Sekundärantikörper (Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobuline) an den Primärantikörper gebunden.

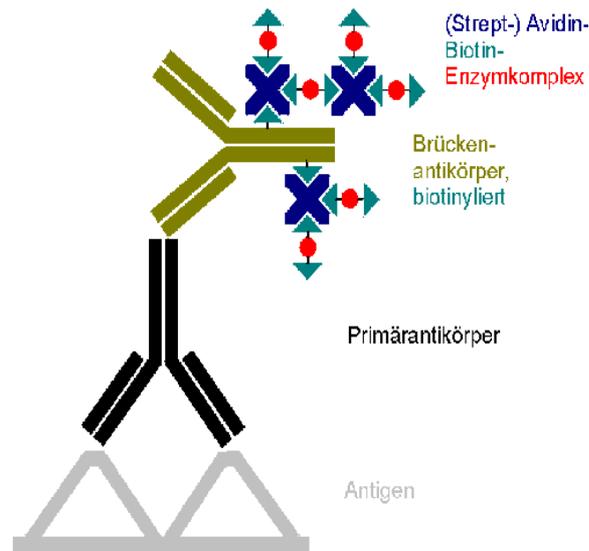


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der ABC-Methode zum Nachweis von Zytokeratinen ($HRP=Streptavidin-Peroxidase$), (Dako, Hamburg)

Die biotinylierten Moleküle des Sekundärantikörpers reagieren andererseits mit an das Enzym Peroxidase konjugierten Streptavidinmolekülen. Aufgrund eines mit sieben Atomen Biotin markierten Spacer-Arms der sekundären Antikörperreagenz ist die Sensivität des Nachweissystems erhöht.

Im dritten Schritt erfolgt die Vernetzung über eine Zweischnitt-Glutaraldehydmethod. Mithilfe von DAB+Chromogen (1-5% 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) wird die Reaktion visualisiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin.

Durchführung der indirekten ABC-Methode im automatischen System

1. Vorbehandlung für Keratin-903™ mit Zitratpuffer (Dako) 30min im Mikrowellenofen bei 1000W
AE1/AE3 und MOPC-21 mit Protease1 7min bei 37°C inkubieren
2. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
3. Vorbereitung des DAKO-Autostainer`s
 - 3.1. Auffüllen von Aqua dest.
 - 3.2. Auffüllen von TBST-Waschpuffer
1 l TBST Waschpuffer verdünnen mit 9 l Aqua dest.
 - 3.3. Primärantikörper Keratin-903™ (gebrauchsfertig)
AE1/AE3 in den Konzentrationen 1:50, 1:100 und 1:200

MOPC-21 in der Konzentration von 1:50

- 3.4. 10 ml Sekundärantikörper, Biotinylierte Anti-Maus und Anti-Ziegen-Immunglobuline, Flasche A
- 3.5. 10 ml H₂O₂ „blocking solution“ zum Blocken der endogenen Peroxidase
- 3.6. 10 ml Streptavidin Peroxidase (HRP), Flasche B
- 3.7. DAB+ Chromogen, das Substratsystem vorbereiten
Ansetzen von DAB+Chromogen 1:50 für 10 ml
 1. Schritt 9,8 ml HRP Substrate Buffer, Flasche D mit
 2. Schritt 0,2 ml DAB+Chromogen, Flasche C in Reagenzröhrchen geben und auf dem Rüttler mischenEinsortieren aller angesetzten Lösungen in den vorgesehenen Behälter des Dako-Autostainer`s.
- 3.8. Objektträger in den Automat einsortieren und mit Pufferlösung benetzen, um ein Austrocknen zu verhindern
4. Dako-Autostainer starten
5. Nach Beendigung des Automatendurchlaufes Aufstellen der Objektträger in Aqua dest.
6. 30 Sekunden in Hämatoxylin tauchen
7. Bläuen unter fließendem Leitungswasser
8. Paraffinschnitte entwässern
9. Eindeckeln mit Eukitt

3.3.5 Reproduktion der immunhistochemischen Analyse mit dem Antikörper Keratin-903™ im automatischen System

Aufgrund der intensiven Immunreaktion des Zytoplasmas einzelner DTZ in den Tumorausläufern mit Keratin-903™ wurden die Paraffinschnitte wiederholt einer Analyse im automatischen System unter Verwendung des Primärantikörpers Keratin-903™ und der indirekten ABC-Methode (ChemMate™Detection Kit, Code: K 5001) unterzogen. Die Paraffinschnitte wurden mit Zitratpuffer (Dako) für 30 min im Mikrowellenofen vorbehandelt.

3.3.6 Detektion Zytokeratin-positiver Zellen mit dem Antikörper 34βE12

Der Primärantikörper Keratin-903™ (Enzo, Klon 34βE12) erwies sich als am besten geeignet, um einzelne Tumorzellen in der Invasionsfront von Primärtumoren zu

detektieren. Da Keratin-903™ nur in einer gebrauchsfertigen Verdünnung vom Hersteller lieferbar ist, wurde um die Farbintensität der Immunreaktion zu optimieren, Keratin-903™ (Enzo) durch 34βE12 (Dako) ausgetauscht. Es handelt sich bei dem monoklonalen Maus-Antikörper Cytokeratin HMW 34βE12 laut Angaben des Herstellers um den gleichen Klon (34βE12), der gegen dieselben CK (1, 5, 10 und 14) gerichtet ist wie der Primärantikörper Keratin-903™. Im Unterschied zu Keratin-903™ besteht bei 34βE12 die Möglichkeit, die Konzentrationen zu variieren. 34βE12 wurde in folgenden Konzentrationen ausgetestet: 1:50, 1:100, 1:200 und 1:500. MOPC-21 wurde in der Konzentration 1:50 als Isotypkontroll-Antikörper eingesetzt.

3.3.7 Auswertung der Optimierungsversuche

Die Auswertung der Immunfärbungen erfolgte nach jedem Durchgang der IHC-Analyse am Mikroskop Olympus CH 40 (Olympus Optical Co, Tokio, J) bei 400-facher Vergrößerung.

Positive Zellen zeigten eine intensive Färbung des Zytoplasmas. Für die Bewertung der Färbung waren folgende Kriterien entscheidend:

1. Alle konventionell zytologisch als Tumorzellen identifizierbaren Zellen müssen eine Immunreaktion zeigen.
2. Die Intensität der Immunreaktion muss reproduzierbar und mäßig bis stark sein.
3. Die Zellen müssen klar abgrenzbar sein.

3.4 Immunhistochemische Detektion zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in den Lymphknotenpräparaten

Bei der Optimierung der immunhistochemischen Analyse zur bestmöglichen Erfassung von Tumoreinzellen in den Primärtumoren erwies sich der monoklonale Pan-CK-Antikörper 34βE12 (Konzentration 1:50) als am besten geeignet.

Für den Nachweis von DTZ/MM an den Lymphknotenpräparaten wurde 34βE12 eingesetzt, der ein optimales Färbesignal bei der immunhistochemischen Reaktion versprach.

3.4.1 Aufbereitung der paraffineingebetteten Lymphknoten/ Anfertigung der Paraffinschnitte

Von den fixierten und in Paraffin eingebetteten Lymphknoten wurden mit dem Schlittenmikrotom (Jung Histoslides 2000, Leica Instruments GmbH, Nussloch, D) 10 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt. In die Untersuchungen wurden ausschließlich Lymphknoten einbezogen, die bereits zuvor vom Pathologen in der routinemäßig durchgeführten H&E-Färbung als metastasenfrem eingestuft wurden.

Pro Patient handelte es sich in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Anzahl an zu untersuchenden Lymphknoten (zwischen einem und acht Paraffinblöcken) um eine unterschiedliche Anzahl von Lymphknoten (zwischen 1 und 12 Lymphknoten pro Block). Von 78 Patienten mit oralen/oropharyngealen PEK wurden 667 zervikale Lymphknoten in 244 Paraffinblöcke eingebettet. Von jedem Paraffinblock wurden im Abstand von 150 µm vier Stufenschnitte angefertigt.

Die Objektträger wurden den Paraffinblöcken entsprechend von außen nach innen von 1 bis 4 nummeriert.

3.4.2 Immunhistochemische Analyse

Der Pan-CK-Antikörper 34βE12 (IgG₁, Dako) erwies sich nach Optimierung der immunhistochemischen Analyse an Primärtumoren als am besten geeignet für die Detektion von DTZ/MM (vgl. 3.3.5). Die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Analyse wurden nach dem im Abschnitt 3.3.4 beschriebenen optimierten Protokoll im automatischen System durchgeführt.

In jeder Immunreaktion wurden Präparate von Primärtumoren als Positivkontrolle mitgeführt. Färbte sich die Positivkontrolle nicht an, wurde die immunhistochemische Reaktion wiederholt. Zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (siehe Abschnitt 3.3).

3.4.3 Mikroskopische Auswertung

Die Präparate wurden am Lichtmikroskop Olympus CH 40 (Olympus Optical Co, Tokio, J) ausgewertet. Die Lymphknoten variierten in der Größe zwischen 100 µm bis über 10 mm.

Normaler histologischer Befund

Lymphknoten sind eingebettet in das umgebende Bindegewebe, das neben den ortsständigen Zellen wie beispielsweise den Fibroblasten, Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten auch freie Zellen enthält. Dazu gehören Makrophagen, Plasmazellen und Granulozyten. Je nach Lokalisation der Lymphknoten konnten auch Anschnitte von den Speicheldrüsen mit ihrem charakteristischen Läppchenaufbau beobachtet werden. Am einschichtigen, zweireihigen Epithel des Lumens der Ausführungsgänge und an den isoprismatischen Epithelzellen der Schaltstücke konnten ebenfalls Zytokeratine detektiert werden. Aufgrund der Morphologie konnten Verwechslungen mit Tumorzellen ausgeschlossen werden. Bei einigen Präparaten fanden sich Gefäßanschnitte.

Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen

Bei der mikroskopischen Auswertung der Lymphknotenpräparate wurden ausschließlich CK-positive Zellen beachtet, die sich im Lymphknotengewebe befanden. Eventuelle Anfärbungen im Bindegewebe oder anderen Geweben, welche nicht Zielgewebe waren, blieben unberücksichtigt.

Die nachweisbaren DTZ/MM zeigten eine starke zytoplasmatische Immunreaktion.

Zur Identifizierung der DTZ/MM wurden zusätzlich konventionelle zytologische Merkmale atypischer Zellen wie Anisozytose und Kernpolymorphie herangezogen, sowie eine zugunsten des Kerns veränderte Kern-Plasma-Relation.

Alle positiven und fraglich positiven Zellen und Zellverbände wurden von einem erfahrenen Pathologen beurteilt und als Tumorzellen oder Nicht-Tumorzellen kategorisiert.

3.5 Weitere phänotypische und molekulare Charakterisierung der detektierten Mikrometastasen

Die Lymphknotenpräparate, in denen CK-positive Zellen detektiert werden konnten, wurden mittels immunhistochemischer Analysen und RNA-in situ-Hybridisierung zusätzlich phänotypisch charakterisiert. Für die Immunhistochemie wurden folgende Antikörper eingesetzt: p16, p53, AE1/AE3, EMMPRIN, A45-B/B3, EGFR und EpCAM.

In der RNA-RNA-in situ-Hybridisierung kamen folgende Sonden zum Einsatz: MMP1 und MMP2.

3.5.1 Automatische immunhistochemische Analyse

Für die Untersuchungen zum Nachweis von p53, p16^{INK4} und AE1/AE3 in den MM wurde die automatische immunhistochemische Analyse genutzt. Zur Vorbehandlung wurden die Paraffinschnitte für die AE1/AE3-Immunreaktion sieben Minuten mit Protease 1, für EpCAM 20 min im Citratpuffer (Dako) in der Mikrowelle bei 1000 W und für p53 und p16^{INK4} mit TEC-Puffer im Mikrowellenofen für 20min inkubiert. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper in folgenden Verdünnungen inkubiert:

1. p53 1:2000
2. p16^{INK4} 1:100
3. AE1/AE3 1:200
4. EpCAM 1:50

Zur Verdünnung wurde die Lösung "antibody diluent" (Dako) verwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten wie beschrieben unter Abschnitt 3.3.4.

3.5.2 Manueller immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin A45-B/B3, EGFR und EMMPRIN mit dem EnVision™ Nachweissystem

Für die Untersuchungen zum Nachweis von A45, EGFR und EMMPRIN in den MM wurde eine manuelle immunhistochemische Analyse durchgeführt. Die unterschiedlichen Vorbehandlungen und Konzentrationen sowie Inkubationszeiten für jeden Antikörper sind dem nachfolgenden Protokoll zu entnehmen.

1. Vorbehandlung
 - A45: Citratpuffer (BioGenox) im Topf bei 125°C für 5min
 - EGFR: Proteinase K für 6min
 - EMMPRIN: Citratpuffer (Dako) in der Mikrowelle bei 1000 W für 20min
2. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
3. 5min H₂O₂
4. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
5. Primärantikörper
 - A45 1:400 bei 4°C über Nacht
 - EGFR 1:20 bei 4°C über Nacht
 - EMMPRIN 1:1000 bei RT für 30 min inkubieren mit Verdünnungsmedium (Dako)
6. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
7. Dako *EnVision*[™] Kit (SAK+ DAB Substrat Puffer) 15min

8. 2 x 5min in TBST-Puffer waschen
9. Paraffinschnitte 5-10min mit DAB 1:50 inkubieren
10. Färbung der Zellkerne mit Hämalaun ~10 sec
11. Paraffinschnitte entwässern
12. Eindeckeln mit Eukitt

3.5.3 Materialien und Reagenzien für die RNA-in situ-Hybridisierung

Tabelle 3.9 Materialien und Reagenzien zum Nachweis von MMP-1 und MMP-2 mittels RNA-in situ-Hybridisierung

Material/Reagenz	Bezugsquelle/Firma
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	Sigma
Xylol C ₈ H ₁₀	Riedel-deHaën®
Alkohol (100%, 96%, 80%, 30%)	Walter CMP GmbH&Co.KG
Salzsäure HCl 2 M	Riedel-deHaën®
Triton®X -100	Boehringer
Proteinase K	Dako
Glycin	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KG
NaOH 1 M	Merck KG
Triethanolamin	Fluka
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KG
Natriumdihydrat	Merck KG
Tris	Merck KG
EDTA	Merck KG
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dextransulfat	Fluka
Formamid, deionisiert	Sigma
Ficoll Paque™Plus (Tyo 400)	Pharmacia Biotech
Polyvinylpyrolidone	Sigma
BSA (Fraktion V)	Sigma
Poly A (« Polyadenylic acid »)	Boehringer
SS-DNA	
tRNA	Boehringer
Sonde	
RNase A	Boehringer
Schafserum, normal	
Antikörper Sheep-Anti-Dig	Roche
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Sigma
Nuclear Fast Red	Vector
Eukitt	Merck

Ansätze der Puffer und Lösungen für die RNA-*in situ* Hybridisierung

Ansatz von DEPC/H₂O

DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)/H₂O

1 ml DEPC

ad 1000 ml Aqua bidest.

Autoklavieren

Ansatz von HCl

0,2 N HCl, Ansatz ad 200 ml

20 ml 2M HCl

180 ml DEPC/ H₂O

Ansatz von Triton®X- 100

0,3% Triton®X- 100 Ansatz

600 µl Triton®X-100

200 ml DEPC/ PBS

Ansatz von Glycin mit DEPC/H₂O

0,2% Glycin Ansatz mit DEPC/H₂O

0,2g Glycin

100 ml DEPC/ H₂O

Ansatz von Paraformaldehydlösung

4% Paraformaldehydlösung (Einen Tag vorher ansetzen)

8 g PFA

in 200 ml DEPC/PBS auf 60°C erwärmen

6 Tropfen 1 M NaOH zugeben, bis PFA gelöst ist

auf 4°C abkühlen

2 N HCl (pH 7,4)

Ansatz des Acetylierungspuffers

0,1 M Acetylierungspuffer

6,65 ml Triethanolamin
ad 500 ml DEPC/H₂O
37% HCl (pH 8)

Ansatz von SCC

SSC (20x, pH 7,0)

175,3 g NaCl
88,2 g Natriumdihydrat
Aqua bidest. ad 800 ml
NaOH (pH 7,0)
Autoklavieren

Ansatz von Tris-HCl

Tris-HCl, 1 M (pH 7,4)

121,1 g Tris
ad 1000 ml DEPC/ H₂O
37% HCl (pH 7,4)
Autoklavieren

Ansatz von NaCl

NaCl, 3 M

175,3 g NaCl
ad 1000 ml DEPC/ H₂O
Autoklavieren

Ansatz von EDTA

EDTA, 0,5 M (pH 8,0)

186,1 g EDTA
ad 1000 ml DEPC/ H₂O
NaOH (pH 8,0)
Autoklavieren

Ansatz von Dextransulfat 20%

Dextransulfat 20%

10 mg Dextransulfat
50 ml deionisiertes Formamid

Ansatz der Denhardt'schen Lösung

Denhardt'sche Lösung (100 x)

2 g Ficoll Paque™ Plus (Typ 400)
2 g Polyvinylpyrrolidone
2 g BSA (Fraktion V)
DEPC/ H₂O ad 200 ml

Ansatz RNase A- Verdau

RNase A- Verdau

100 µl RNase A
200 ml RNase Puffer

Ansatz MgCl₂(MgCl₂, 1M)

203,3 g MgCl₂
ad 1000 ml DEPC/H₂O

Tabelle 3.10 Proteinase K-Puffer, Ansatz für 400 ml

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 400 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:10	100 mM	40 ml
500 mM EDTA	1:10	50 mM	40 ml
DEPC/H ₂ O			ad 400 ml

Tabelle 3.11 Prähybridisierungs-Mix

Stocklösung	Verdünnung	Prähybridmix- Endkonzentration	Menge für 2 ml (Stock- Lösung)
1 M Tris (pH 7,4)	1:50	20 mM	40 µl
3 M NaCl	1:10	0,3 M	200 µl
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	4 µl
1 M DTT	1:10	100 mM	200 µl
100 % deion. Formamid	1:2	50 %	1000 µl
100 % Denhardt`s	1:100	1x	20 µl
Poly A 10 mg/ml	1:100	100 µg/ml	20 µl
SS- DNA 20 mg/ml	1:40	500 µg/ml	50 µl
t-RNA 20 mg/ml	1:40	500 µg/ml	50 µl
DEPC/H ₂ O			ad 2 ml

Tabelle 3.12 Hybridisierungs-Mix

Stocklösung	Verdünnung	Hybridmix- Endkonzentration	Menge für 500 µl (Stock- Lösung)
1 M Tris (pH 7,4)	1:50	20 mM	10 µl
3 M NaCl	1:10	0,3 M	50 µl
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	1 µl
1 M DTT	1:10	100 mM	50 µl
20% Dextransulfat in 100% deionisier. Formamid	1:2	10% Dextransulfat in 50% deion. Formamid	250 µl
100% Denhardt`s	1:100	1 x	5 µl
Poly A 10 mg/ml	1:100	100 µg/ml	5 µl
SS- DNA 20 mg/ml	1:40	500 µg/ml	12,5 µl
t-RNA 20 mg/ml	1:40	500 µg/ml	12,5 µl
DEPC/ H ₂ O			ad 500 µl
Sonde 50 µg/ Schnitt			

Tabelle 3.13 Waschlösung 1 (200 ml/ Glasträger)

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 200 ml
3 M NaCl	1:10	0,3 M	20 ml
100% deion. Formamid	1:2	50%	100 ml
1 M Tris- HCl 7,5	1:50	2 mM	4 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	400 µl
1 M DTT	1:100	10 mM	2 ml
Aqua bidest.			ad 200 ml

Tabelle 3.14 RNase Puffer (400 ml/ Glasträger)

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 400 ml
3 M NaCl	1:6	0,5 M	66,66 ml
1 M Tris (pH 7,5)	1:100	10 mM	4 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	800 µl
Aqua bidest.			ad 400 ml

Tabelle 3.15 Detektionspuffer 1 (1000 ml/ Glasträger)

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 1l
1 M Tris (pH 7,4)	1:10	0,1 M	100 ml
3 M NaCl	1:20	0,15 M	50 ml
Aqua bidest.			ad 1 l (pH 7,5)

Tabelle 3.16 Detektionspuffer 2 (300 ml/ Glasträger)

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 300 ml
1 M Tris (pH 9,5)	1:10	0,1 M	30 ml
3 M NaCl	1:30	0,1 M	10 ml
1 M MgCl ₂	1:20	50 mM	15 ml
Aqua bidest.			ad 300 ml (pH 9,5)

Tabelle 3.17 Detektionslösung

Stocklösung	Menge für 5 ml
Detektionspuffer 2	5 ml
TritonX- 100	15 µl
BCIP/ NBT	100 µl
Levamisole (0,24 mg/ml)	8,15 µl

Tabelle 3.18 Detektionspuffer 3 (Stopp- Puffer)

Stocklösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 200 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:100	10 mM	2 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	400 µl
Aqua bidest			ad 200 ml (pH 7,5)

3.5.4 RNA-in situ-Hybridisierung

Für die Untersuchungen zum Nachweis von MMP1- und MMP2-mRNA in den MM wurde die RNA-in situ-Hybridisierung genutzt.

Die Plasmide, die zur Herstellung von MMP-1- und MMP-2-Ribosonden verwendet wurden, stammen von Prof. Dr. Hermann Herbst (ehemals Westfälische Wilhelms-Universität Münster).

MMP-1

Ein 735 bp-SstI-EcoRI-Fragment wurde aus pCIIasel in pGEM1 (Promega Biotech Madison, USA) subkloniert.

MMP-2

Ein 1,3 kb-EcoRI-Bg1II-Fragment wurde aus pK 121 in pGEM1 subkloniert.

Die Digoxigenin-markierten Ribosonden wurden von Frau Dr. Riethdorf (Institut für Tumorbologie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte mit 0,2 N HCl für 20 min inkubiert und danach mit 0,3% Triton®X-100 (15 min) behandelt. Um die RNA-assoziierten Proteine zu lysieren, wurden die Präparate weiterhin mit Proteinase K-Puffer (30 min

bei 37°C) und Proteinase K (30 min bei 37°C) vorbehandelt. Die Reaktion wurde dann in 0,2% eiskalter Glycin-Lösung abgestoppt.

Der anschließende Inkubationsschritt mit 4% Paraformaldehyd-Lösung diente der Post-Fixierung der Gewebestrukturen. In Acetylierungspuffer (0,1 M, 3 min) wurden die Präparate äquilibriert, mit 1 ml Acetanhydrid in 200 ml Acetylierungspuffer für 10 Minuten inkubiert und durch Schwenken in Blotpuffer (2x SCC, 5 min) neutralisiert. Anschließend wurden die Präparate bei 50°C für eine Stunde inkubiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde zunächst eine Vorhybridisierung durchgeführt. Diese erfolgte für 2 Stunden in der feuchten Kammer bei 52°C mit 100-200 µl Prähybridisierungs-Mix pro Schnitt.

Zur Sonden-Hybridisierung wurde die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern entfernt und es wurden auf den Schnitt je 20 µl Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung mit 10 ng/µl Digoxigenin-markierte-RNA-Sonde) gegeben, wobei die Flüssigkeit mit einem Deckgläschen verteilt und abgedeckt wurde. Die Hybridisierung fand über Nacht in der feuchten Kammer bei 52°C statt.

Anschließend wurden die Paraffinschnitte in Küvetten überführt und gewaschen (2x SCC, 15min). Nun wurden die Präparate für 10 Minuten bei 60°C in der Waschlösung 1 inkubiert und langsam auf 37°C abgekühlt. Die nicht hybridisierte einzelsträngige RNA wurde im nächsten Schritt mit RNase-A (bei 37°C, 30 min) abgebaut. Es folgten weitere Waschschrte in RNase-Puffer (3 min) und in 0,1xSCC bei 52°C (15 min). Zur Äquilibrierung wurden die Paraffinschnitte für 10 Minuten in 0,1xSCC (bei Raumtemperatur) überführt. Schließlich erfolgt die Detektion der Digoxigenin-markierten Hybride mit dem Enzym (Alkalische Phosphatase) gelabelten Anti-Digoxigenin-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Nuclear Fast Red gegengefärbt.

Durchführung der RNA-in situ-Hybridisierung

1. Tag

Vorbereitung der Paraffinschnitte

1. Paraffinschnitte auf Super Frost-Objektträger mit DEPC/H₂O aufziehen
Von jedem Fall sollten jeweils mindestens zwei Präparate für „Antisense“- und „Sense“-Sonde vorliegen. Die Schnitte wurden in einen RNase-freien Glasträger sortiert (ein Träger für die sense- Schnitte und ein Träger für die

antisense- Schnitte) und in eine gebackene Küvette gesetzt. Dann wurden die Schnitte mindestens 1 Stunde bei 50°C getrocknet (Hybridisierungssofen).

Es wurden ausschließlich RNase-freie (Inkubation der Küvetten für 4 Stunden, 200°C) Küvetten in den weiteren Schritten verwendet.

2. Paraffinschnitte für 2 x 10min in Xylol entparaffinieren
3. Paraffinschnitte in absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 30% Ethanol in DEPC/H₂O ansetzen) jeweils 2min tauchen
4. Paraffinschnitte 5min in DEPC/H₂O tauchen
5. Paraffinschnitte in 0,2 N HCl bei RT für 20min inkubieren
6. Paraffinschnitte in 0,3 % Triton®X-100 für 15min inkubieren
7. Präparate in Proteinase K- Puffer bei 37°C für 30min inkubieren (Schüttler-Wasserbad)
8. Behandlung mit Proteinase K in Proteinase K- Puffer 5 µg/ ml bei 37°C für 30min (Schüttler- Wasserbad)
9. Abstoppen in 0,2 % eiskaltem Glycin für 1min
10. Post- Fixierung in 4 % eiskalter Paraformaldehyd- Lösung für 5min
11. Paraffinschnitte in DEPC/H₂O für 5min bei RT auf dem Schüttler inkubieren
12. Äquilibrieren in 0,1 M Acetylierungspuffer für 3min auf dem Schüttler
13. Schnitte acetylieren mit 1 ml Acetanhydrid und 200 ml Acetylierungspuffer für 10min auf dem Schüttler
(1 ml Acetanhydrid wurde in einer trockenen Küvette vorgelegt und während der Acetylierungspuffer in die Küvette gegossen, der Glasträger musste ca. 10mal auf und ab bewegt werden)
14. Präparate in 2 x SSC/ DEPC/ H₂O für 5min tauchen
15. Präparate bei 50°C für 1h trocknen (Wärmeschrank)

Prähybridisierung

16. 100-200 µl Prähybridisierungsmix pro Schnitt auftragen und in der feuchten Kammer für 2h bei 52°C inkubieren

Hybridisierung

17. Prähybridisierungsmix entfernen und 20 µl Hybridisierungsmix mit 10 ng/µl Digoxigenin-markierte RNA-Sonde auf jeden Paraffinschnitt geben, mit Parafilm-Streifen abdecken

18. Inkubation der Paraffinschnitte der feuchten Kammer über Nacht bei 52°C

2. Tag

Waschen

1. Parafilm-Streifen entfernen und Präparate in 2 x SSC 15min waschen
2. Stringent waschen in Hybridisierungspuffer bei 60°C für 10min
3. RNase A-Verdau bei 37°C für 30min
4. Schnitte in RNase- Puffer bei Raumtemperatur (RT) 3min waschen
5. Schnitte in 0,1 x SSC bei 52°C 15min waschen
6. Schnitte in 0,1 x SSC bei RT 10min äquilibrieren

Detektion

7. Paraffinschnitte in Detektionspuffer 1 bei RT waschen
8. Paraffinschnitte in feuchte Kammer einsortieren und mit normalem Schafserum (20% in Puffer 1 verdünnt) abblocken für 30min
9. Schnitte in Detektionspuffer 1 kurz waschen
10. Inkubation mit Sheep- Anti- Dig- AP bei RT 2h
Ansatz 1:5000
-1 µl Sheep- Anti- Dig- AP
-50 µl Schafserum 1%
-15 µl 0,3% TritonX-100
-in 5000 µl Detektionspuffer 1
11. Präparate 2 x in Detektionspuffer 1 waschen (je 15min auf dem Schüttler)
12. Präparate in Detektionspuffer 2 15min auf dem Schüttler waschen
13. Einsortieren der Paraffinschnitte in die feuchte Kammer Inkubation mit der Detektionslösung (bis zu 4 Tage)
14. Farbentwicklung abstoppen (je nach Farbentwicklung (dunkelviolet)) in Detektionspuffer 3 für 10min
15. Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red
16. Paraffinschnitte in aufsteigende Alkoholreihe (30%, 80%, 90%, 100% Ethanol in DEPC/H₂O je 2min) tauchen
17. Paraffinschnitte in Xylol 2x10min tauchen
18. Eindeckeln der Präparate mit Eukitt

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der immunhistochemischen Analyse zur Detektion von disseminierten Tumorzellen an Paraffinschnitten von Primärtumoren

Zunächst wurde die immunhistochemische Analyse zur Detektion von DTZ an PEK aus dem oropharyngealen Bereich optimiert. Es wurden Antikörper, die in der Routinediagnostik dem Nachweis von epithelial differenzierten Zellen (z.B. Tumorzellen von PEK) dienen, eingesetzt. Dazu wurde die Invasionsfront mehrerer Primärtumoren genutzt, in der vermehrt Tumoreinzelzellen nachweisbar waren, vergleichbar mit DTZ in Lymphknoten. Folgende Kriterien waren entscheidend für die Bewertung der Immunreaktion.

1. Alle konventionell zytologisch als Tumorzellen identifizierbaren Zellen müssen eine Immunreaktion zeigen.
2. Die Intensität der Immunreaktion muss reproduzierbar und mäßig bis stark sein.
3. Die Zellen müssen klar abgrenzbar sein.

Es wurden die zwei Pan-CK-Antikörper AE1/AE3 und 34 β 12 mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten ausgetestet. Die Optimierung der immunhistochemischen Analyse wurde weiterhin durch die Austestung von unterschiedlichen Vorbehandlungen und die Verwendung von sowohl Peroxidase-basierten, als auch APAAP-Detektionssystemen in Erprobung manueller und maschineller Färbung verbessert.

Die Immunfärbung mit dem Pan-CK-Antikörper 34 β 12 am Autostainer ergab deutlich bessere Ergebnisse am Primärtumor als die Detektion mit dem Pan-CK-Antikörper AE1/AE3. Die Zellen des Primärtumors zeigten eine intensive zytoplasmatische Anfärbung. Die Abgrenzung der DTZ in den Ausläufern des Tumors gegen die Struktur des Bindegewebes konnte mit der Immunreaktion mit 34 β E12 besser dargestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die immunhistochemische Analyse mit AE1/AE3 keine deutlichen Zellbegrenzungen. Auch waren morphologisch eindeutig erkennbare Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront der Tumoren mit AE1/AE3 nicht reproduzierbar anfärbbar (Abbildung 4.1).

Daher wurde der monoklonale Antikörper 34 β 12 für die weiteren Untersuchungen an den Lymphknotenschnitten verwendet.

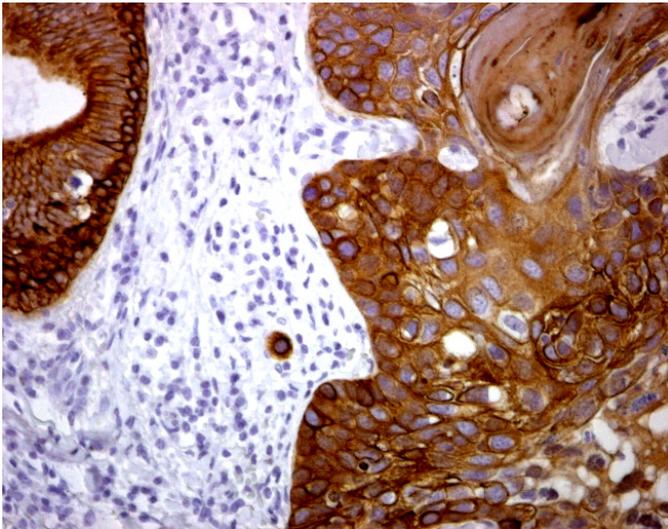


Abb. 4.1A
 Immunhistochemische
 Untersuchung mit Anti-
 Zytokeratin Antikörper
 34βE12:
 Plattenepithelkarzinom mit
 starker brauner
 zytoplasmatischer
 Färbereaktion der
 Tumorzellen (indirekte
 ABC-Methode). 200fache
 Vergrößerung.

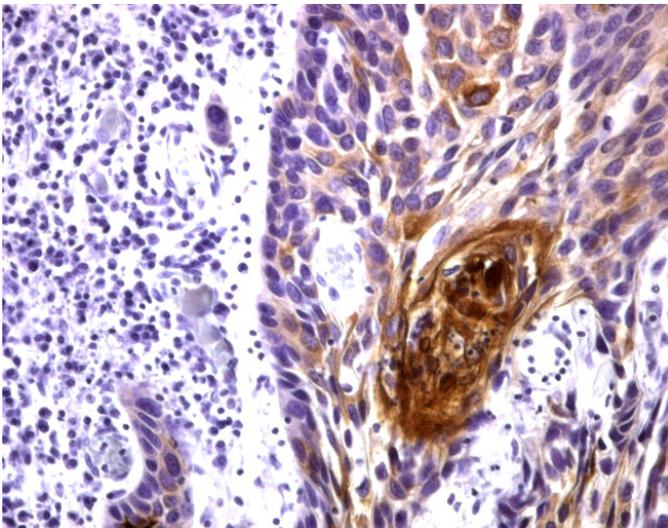


Abb. 4.1B
 Immunhistochemische
 Untersuchung mit Anti-
 Zytokeratin-Antikörper
 AE1/AE3:
 Plattenepithelkarzinom mit
 schwacher brauner
 zytoplasmatischer
 Färbereaktion der Tumorzellen
 (indirekte ABC-Methode).
 200fache Vergrößerung.

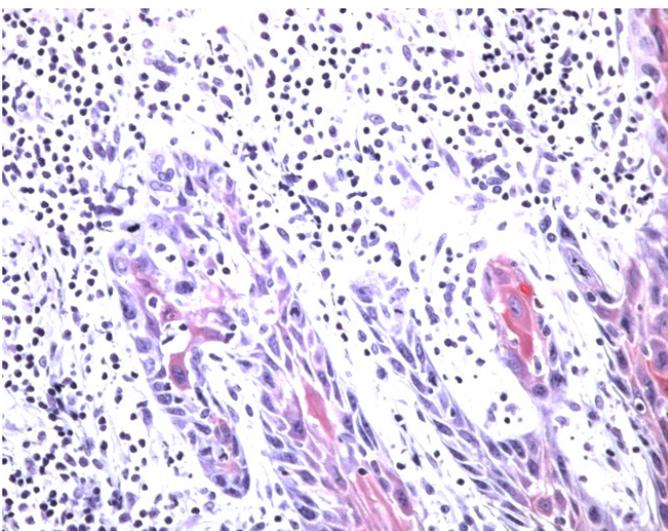


Abb. 4.1C
 Immunhistochemische
 Untersuchung mit Anti-
 Zytokeratin-Antikörper
 AE1/AE3-
 Plattenepithelkarzinom mit
 schwacher unspezifischer
 Färbereaktion der
 keratinisierten Tumorzellen
 (APAAP-Methode). 200fache
 Vergrößerung.

Abb. 4.1 Immunhistochemische Untersuchung an Primärtumoren mit
 verschiedenen Anti-Zytokeratin-Antikörpern

4.2 Immunhistochemischer Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in Lymphknoten

Bei insgesamt 14/667 (2,1%) untersuchten Lymphknoten konnten zusätzlich Tumorzellen gefunden werden. Von den 78 untersuchten Patienten mit oralen/oropharyngealen PEK (pN0 und pN+) wurden bei 9 Patienten (11,5%) MM detektiert (Abbildung 4.2). DTZ konnten nicht nachgewiesen werden.

24 Patienten hatten laut primärem pathologischen Befund Lymphknotenmetastasen (N+). Davon ließen sich bei 4 Patienten (17%) in sieben primär als tumorfrei eingestuftem Lymphknoten in den für diese Untersuchung angefertigten Schnitten MM nachweisen. Diese wurden, mit zwei Ausnahmen, in allen Schnittstufen nachgewiesen (Tabelle 4.1a). In einem Fall konnte in der vierten Schnittstufe keine MM mehr detektiert werden. Im zweiten Fall fehlte der Nachweis der MM in der zweiten Schnittstufe. 2/4 Fällen befanden sich primär im Lymphknotenstadium N1, einer im Lymphknotenstadium N2b und ein Fall im Lymphknotenstadium N2c.

Bei 5/54 (9,3%) Patienten ohne primäre Lymphknotenmetastasierung (N0) konnten MM nachgewiesen werden. Die MM waren in allen Schnittstufen nachweisbar mit Ausnahme von 2 Fällen, in denen sie erst ab der 2. Schnittstufe detektiert werden konnten.

Es handelte sich bei allen nachgewiesenen Ereignissen um MM. DTZ ließen sich nicht nachweisen. In 4/9 Fällen konnten Metastasen > 2 mm nachgewiesen werden.

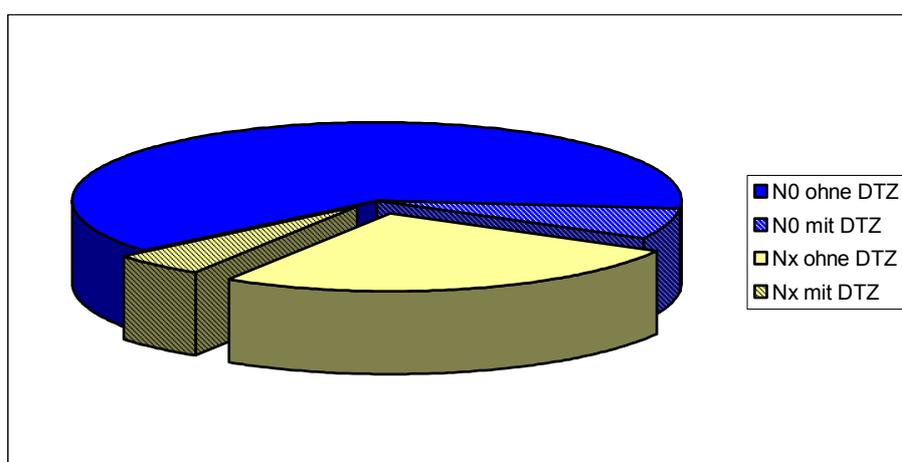


Abbildung 4.2 Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten von Patienten mit nichtmetastasierten (N0) und metastasierten (Nx) PEK

Tabelle 4.1a Patienten mit MM in den Lymphknotenpräparaten, Aussagen zum Geschlecht, Alter, T-Status, N-Status, Lokalisation, Grading (G), Überleben

Patient lfd.Nr.	m/f	Alter	Tumorgröße	pN	Lokalisation	Differenzierungsgrad	Krankheitsverlauf
8	m	66	T1	N2b	MB	G3	verstorben 2002
16	m	87	T4	N1	WSH	G2	verstorben 2002
233	f	63	T3	N2c	Alveolarkamm	G3	verstorben 2003
9	f	66	T1	N1	Zunge	G1	Rezidivfrei
33	m	45	T1	N0	MB	G2	Rezidivfrei
54	m	56	T1	N0	MB	G3	-
66	f	45	T1	N0	Oropharynx	G2	verstorben 2003
34	m	77	T1	N0	MB,	G3	verstorben 2003
65	m	66	T4	N0	MB	G2	verstorben 2003

Alter in Jahren; m=male; f=female

Tabelle 4.1b Anzahl der Mikrometastasen in primär als metastasenfrei eingestuft
LK bei Patienten mit gleichzeitig diagnostizierten
Lymphknotenmetastasen (pN+)

Patient Ild. Nr.	Paraffinschnitt- Stufe 1 (nach 500 µm)	2. Stufe	3. Stufe	4. Stufe	Größe der Metastasen	
					Durchmesser (mm)	Mikro / Makro- Metastase
8	1	1	1	1	<0,2-0,5	Mikrometastase
16	1	1	1	1	< 0,7	Mikrometastase
23 (1)	2	2	2	2	> 2 (Durchmesser) und 0,8 x 0,5	Makrometastase und Mikrometastase
23(2)	1	-	1	1	< 0,8	Mikrometastase
9	2	1	1	-	> 2 (Durchmesser) und 1 (Durchmesser)	Makrometastase und Mikrometastase

Tabelle 4.1c Anzahl der Mikrometastasen in primär metastasenfreien Lymphknoten
bei Patienten mit ausschließlich metastasenfrei diagnostizierten
Lymphknoten (pN0)

Patient	1. Stufe	2.Stufe	3. Stufe	4. Stufe	Größe der Metastase (mm)	Okkulte Metastasen
33	-	1	1	1	0,4x0,05	Mikrometastase
54	2	2	2	2	>2 (Durchmesser)	Makro- /Mikrometastasen
66	1	1	1	1	0,3 (Durchmesser)	Mikrometastase
34	1	1	1	1	1,8 x 1	Mikrometastase
65	-	1	1	1	> 2	Makro- /Mikrometastase

Bei einem der Patienten ohne histopathologische Lymphknotenmetastasierung zeigte sich in der immunhistochemischen Analyse eine bereits makroskopisch sichtbare Immunreaktion von > 2 mm im Durchmesser in der dritten und vierten Schnittstufe. Mikroskopisch konnte dies als Metastase identifiziert werden.

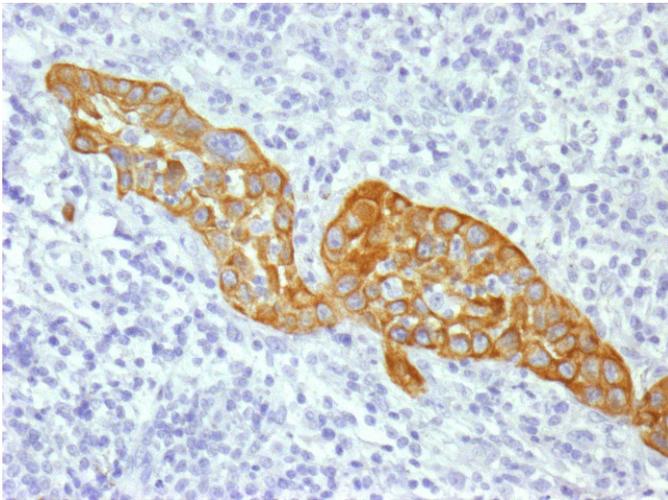


Abb. 4.3
Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Zytokeratin-Antikörper 34βE12: Mikrometastase mit starker, brauner zytoplasmatischer Anfärbung der Tumorzellen. 200fache Vergrößerung.

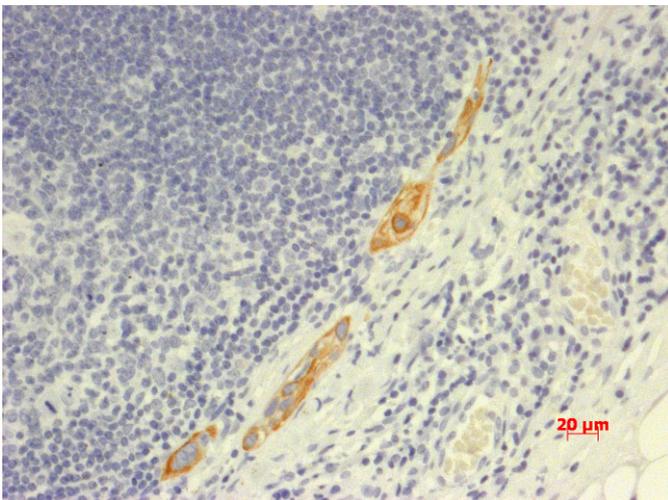


Abb. 4.4
Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Zytokeratin-Antikörper 34βE12: Mikrometastase mit starker zytoplasmatischer Anfärbung der Tumorzellen. 100fache Vergrößerung.

4.3 Häufigkeit der Detektion von Mikrometastasen in Lymphknoten in Korrelation zu histopathologischen und biologischen Faktoren

4.3.1 Mikrometastasen und Lymphknotenstatus

Von 54 untersuchten Patienten mit primärem Status pN0 konnten bei 5 (9,3%) Patienten in insgesamt 7 Lymphknoten MM detektiert werden (Tabelle 4.2). In der Gruppe mit primärem Lymphknotenstatus pN1 konnten bei 2 der insgesamt 17 Patienten (11,8%) in drei primär als metastasenfrie beurteilten Lymphknoten MM gefunden werden.

1/5 Patienten mit Lymphknotenstatus pN2b hatte eine weitere immunhistochemisch nachweisbare MM. In einem untersuchten Fall mit Lymphknotenstatus pN2c wurden zusätzlich in drei Lymphknoten MM detektiert.

Tabelle 4.2 Detektion von MM in Abhängigkeit zum Lymphknotenstatus

Lymphknotenstatus	Anzahl der Patienten (Anzahl der Lymphknoten)	Anzahl der Fälle mit MM	Anzahl der Lymphknoten mit MM
pN0	54 (481)	4 (7,4%)	7/481 (1,5%)
pN1	17 (124)	2 (11,76%)	3/124 (2,4%)
pN2b	5 (33)	1 (20%)	1/33 (3%)
pN2c	2 (29)	1 (50%)	3/29 (10,3%)

Die Wahrscheinlichkeit für die Detektion von MM in primär metastasenfrien Lymphknoten stieg mit zunehmendem Lymphknotenstatus (Tabelle 4.0). Bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus konnten in nur 9,3% der Fälle MM detektiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen bereits 20% der Patienten mit dem Lymphknotenstatus pN2b MM auf. In den primär tumorfreien Lymphknoten der Patienten mit Lymphknotenstatus pN2c fanden sich in 50% MM.

4.3.2 Mikrometastasen und Tumorstadium

Vier Patienten mit MM bei primärem Lymphknotenstatus pN0 hatten ein PEK im Tumorstadium pT1. Ein Patient mit MM bei primärem Lymphknotenstatus pN0 hatte ein PEK im Tumorstadium pT4 (Tabelle 4.3). Die vier Patienten mit primärem Lymphknotenstatus pN+ wiesen Primärtumorstadien von pT1, über pT3 bis pT4 auf. Es besteht keine Korrelation zwischen Tumorstadium und der Detektion von MM.

Tabelle 4.3 Patienten mit MM in Abhängigkeit vom Tumorstadium

	T1 (33)	T2 (25)	T3 (25)	T4 (11)	Gesamt
N0 (54)	4	-	-	1	5
N1 (17)	1	-	-	1	2
N2b (5)	1	-	-	-	1
N2c (2)	-	-	1	-	1

Tabelle 4.4 Primärtumorstadium von den Fällen insgesamt in Abhängigkeit zum pathologischen Metastasierungsstadium

Tumorgröße	Patienten insgesamt	Patienten mit pN0	Patienten mit pN+	Patienten (pN0) mit MM	Patienten mit pN+ und MM
T1	34	29	5	4	2
T2	23	14	9	0	0
T3	4	2	2	0	1
T4	13	6	7	1	1
Tx	4	3	1	0	0
n=ges.	78	54	24	5	4

4.3.3 Mikrometastasen, Geschlecht und Alter

50/78 (64%) untersuchten Patienten waren männlich. 35/50 (70%) männlichen Patienten waren metastasenfrei (n=35). Davon wiederum wiesen 8,6% der Fälle MM auf. 30% der männlichen Patienten wurden durch den Pathologen mit positivem Lymphknotenstatus (n=15) eingestuft, wovon in 13% der Fälle zusätzlich MM detektiert werden konnten (Tabelle 4.5).

28/78 (36%) waren weiblich, wovon 19 (68%) Patientinnen primär keine Lymphknotenmetastasierung (pN0) aufwiesen. Bei 2/19 (10,5%) Patientinnen konnten MM detektiert werden. 9/19 (32%) der Patientinnen hatten primär gesicherte Lymphknotenmetastasen. Davon wiesen 22% (2/9) zusätzlich MM auf.

Aus den vorliegenden Daten ist keine Korrelation zwischen MM und Geschlecht bzw. Alter zu finden.

Tabelle 4.5 Häufigkeit der Detektion von MM in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter

	Anzahl der Patienten	Patienten mit pN(0)	Patienten mit pN(+)	Patienten mit pN(0)+MM	Patienten mit pN(+)+MM
männlich	50	35	15	4	2
weiblich	28	19	9	1	2
gesamt	78	54	24	5	4
Alter (in Jahren)	Patienten insgesamt	pN(0)	Patienten mit pN(+)	Patienten mit pN(0)+MM	Patienten mit pN(+)+MM
Mittelwert	62,58	62,26	63,29	61,33	70
Spanne	33-87	42-84	33-87	45-77	63-87

4.3.4 Mikrometastasen und Lokalisation des Primärtumors

24/29 Patienten mit PEK im Mundboden wurden vom Pathologen als Metastasen-frei eingestuft. Drei Patienten mit detektierten MM hatten ebenfalls PEK im Mundboden. Bei Patienten mit primär nicht metastasierten PEK des Mundbodens/Alveolarkammes und des Oropharynx wurde jeweils eine weitere MM detektiert. Die Lokalisationen der Tumoren mit positivem Lymphknotenstatus, bei denen weitere MM nachgewiesen wurden, sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen.

Zwischen der Lokalisation des Tumors und der Metastasierungshäufigkeit konnte kein Zusammenhang hergestellt werden, aufgrund der einerseits großen Heterogenität und der geringen Fallzahl andererseits.

Tabelle 4.6 Die Häufigkeit der Detektion von MM in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors

Lokalisation des Primärtumors	Patienten insgesamt	Patienten pN(0)	Patienten pN(+)	Patienten pN(0)+MM	Patienten pN(+)+MM
MB	29	24	5	3	1
Zunge	16	10	6	0	1
Oropharynx	5	3	2	1	0
WSH	5	4	1	0	1
Alveolarkamm	5	3	2	0	1
MB/Oropharynx	1	0	1	0	0
WSH/MB	2	0	2	0	0
Zunge/MB	7	4	3	0	0
Alveolarkamm/ MB	6	5	1	1	0
WSH/Alveolarkamm	1	1	0	0	0
Unbekannt	1	0	1	0	0
Insgesamt	78	54	24	5	4

MB=Mundboden; WSH=Wangenschleimhaut

4.3.5 Mikrometastasen und Tumordifferenzierungsgrad

44% (4/9 Patienten) der Patienten mit MM wurden bei PEK mit dem Differenzierungsgrad G2 gefunden. Vier weitere Patienten mit MM hat einen G3 Tumor (Tabelle 4.7). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad des Tumors und dem Nachweis von MM dargestellt werden.

Tabelle 4.7 MM in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors

Differenzierungsgrad des Tumors	Patienten mit MM
G1	1
G2	4
G3	4

4.4 Verlaufsbeobachtung der Patienten mit Zytokeratin-positiven Zellen

67% der Patienten mit CK-positiven Tumorzellen verstarben relativ schnell nach der Operation (Mittelwert in Tagen= 493). Betroffen waren alle Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und/oder Lymphknotenmetastasierung (Tabelle 4.8).

Von den insgesamt 78 untersuchten Patienten sind bereits 16 (20,5 %) verstorben, drei Patienten (3,9 %) haben ein Tumorrezidiv, 32 (41 %) Patienten leben tumorfrei. Bei 27 (34,6 %) Patienten waren die Daten nicht ermittelbar.

10/24 (41,7%) Patienten mit primär bereits positiv eingestuftem Lymphknotenstatus (pN+) sind bereits verstorben. Im Gegensatz dazu sind nur 6/54 (11%) der Patienten mit histopathologisch negativem Lymphknotenstatus (pN0) verstorben.

67% der Patienten mit immunhistochemisch detektierten MM verstarben. 3/5 Patienten mit primär histopathologisch negativem Lymphknotenstatus (pN0) und immunhistologisch gesicherter Mikrometastasierung sind verstorben, einer der Patienten lebt tumorfrei, und in einem Fall konnte keine Aussage zum Verlauf gemacht werden. 3/4 Patienten, die primär histopathologisch Lymphknotenmetastasen hatten und in metastasenfremen Lymphknoten zudem MM aufwiesen, sind verstorben. Einer der Patienten lebt tumorfrei.

Tabelle 4.8 Daten zum Tumorstatus/Überleben der insgesamt 78 untersuchten Patienten

Status	Patienten gesamt	pN0	pN+	pN0 und MM	pN+ und MM
	n=78	n=54	n=24	n=5	n=4
tumorfreie Situation	32	26	6	1	1
Tumorrezidiv	3	2	1	0	0
verstorben	16	6	10	3	3
keine Daten	27	20	7	1	0

4.5 Weitere molekulare und phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen in den Lymphknotenpräparaten

Die Lymphknotenpräparate mit MM wurden durch *in-situ*-Hybridisierung und zusätzliche immunhistochemische Analysen weiter molekular und phänotypisch charakterisiert (siehe Material und Methoden 3.5, sowie Abbildung 4.5-4.10 und Tabelle 4.9).

Dabei konnten bis auf eine Ausnahme alle MM auch mit dem Pan-CK-Antikörper A45-B/B3 detektiert werden.

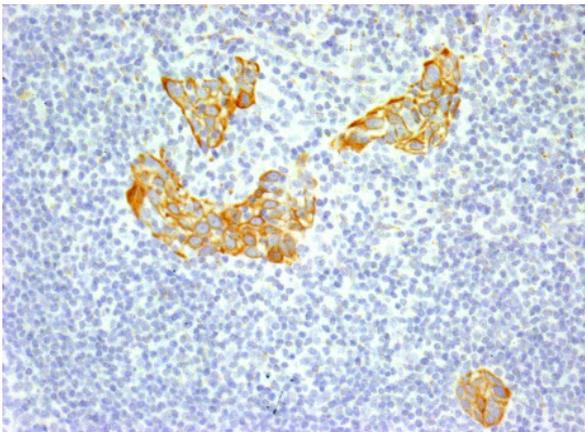


Abb. 4.5
Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3: Mikrometastase mit starker brauner zytoplasmatischer Anfärbung der Tumorzellen. 200fache Vergrößerung.

Mit dem Pan-CK-Antikörper AE1/AE3 wurden nur 70% der MM (7/10) nachgewiesen. Davon zeigten 43% (3/7) eine sehr deutliche und 29% eine schwache Immunreaktion. Interessanterweise ließ sich bei 30% der MM AE1/AE3 nicht detektieren.

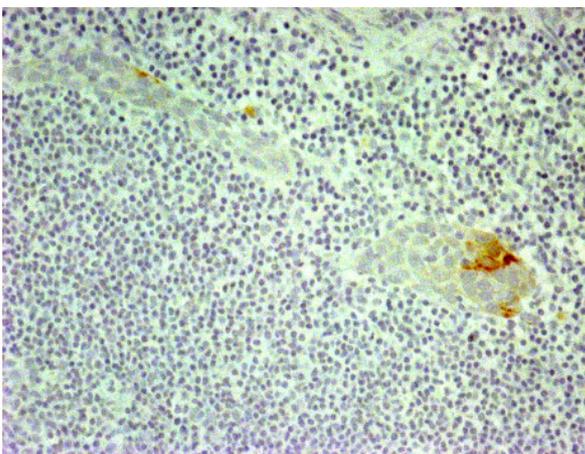


Abb. 4.6
Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3: Mikrometastase mit mäßiger, z.T. fehlender zytoplasmatischer Anfärbung der Tumorzellen. 200fache Vergrößerung.

Eine Expression des EGF-Rezeptors EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) wurde bei allen MM gefunden, während das Lymphknotengewebe keine EGFR-positiven Zellen aufwies. 60% (6/10) der MM zeigten eine Überexpression von EGFR.

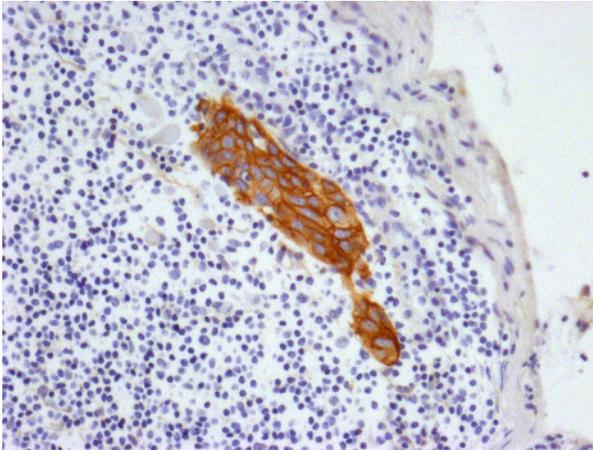


Abb 4.7
Immunhistochemische
Untersuchung mit Anti-EGFR:
Mikrometastase mit starker
brauner membranöser
Anfärbung der Tumorzellen.
200fache Vergrößerung.

Der von Tumorzellen exprimierte MMP-Induktor *Extracellular matrix metalloprotease inducer* (EMMPRIN) konnte in allen MM nachgewiesen werden. Nur 30% der MM ließen sich deutlich anfärben. EMMPRIN-Expression ließ sich auch im gesamten Lymphfollikel nachweisen.

MMP-2-mRNA konnte in einigen Fällen verstärkt in dem Lymphknoten umgebenden Stroma nachgewiesen werden. MMP-1-mRNA wurde in 6/7 MM detektiert, davon in 3 Fällen mit starker Intensität.

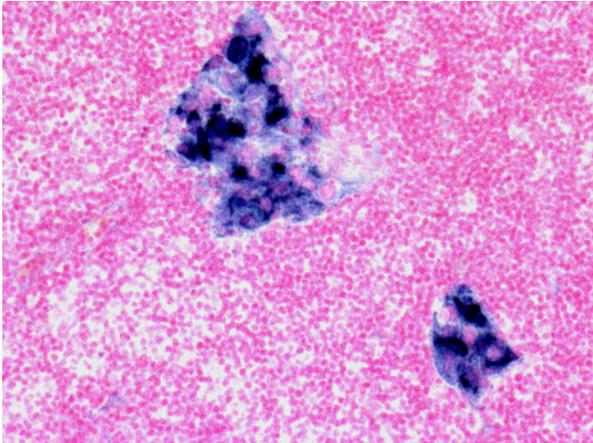


Abb 4.8
Nicht-radioaktive RNA-in situ-Hybridisierung mit MMP-1 mRNA-Nachweis: "Antisense"-Sonde (komplementär zur mRNA-Sequenz). Dunkelblaue Hybridisierungssignale über den Tumorzellen. Rote Kerngegenfärbung. 200fache Vergrößerung

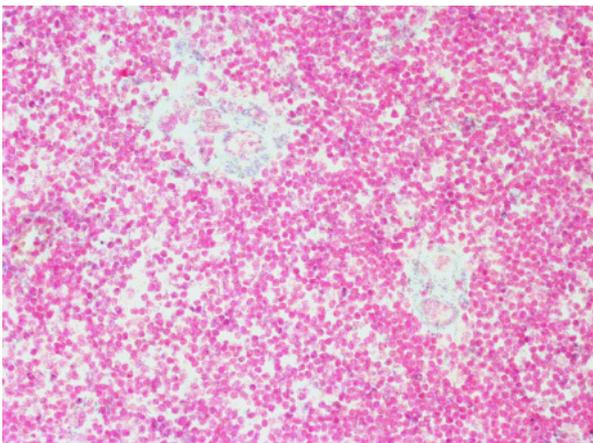


Abb 4.9
Nicht-radioaktive RNA-in situ-Hybridisierung mit MMP-1 mRNA-Nachweis: Negativkontrolle mit „Sense“-Sonde. Fehlende Hybridisierungssignale über den Tumorzellen. Rote Kerngegenfärbung. 200fache Vergrößerung.

Die Expression des Tumorsuppressorgens p16^{INK4} konnte in 8 Fällen nachgewiesen werden. Davon zeigten 62% (5/8) eine deutliche und 38% (3/8) eine schwache Immunreaktion.

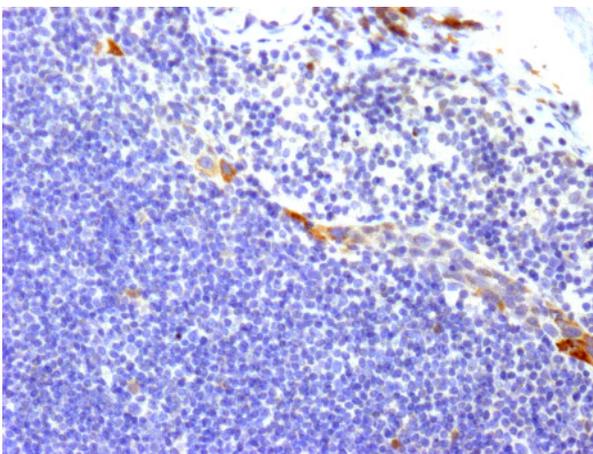


Abb. 4.10
Immunohistochemische Untersuchung mit Anti-p16^{INK4}: Mikrometastase mit mäßiger zytoplasmatischer brauner Anfärbung der Tumorzellen. 200fache Vergrößerung.

Eine Überexpression von p53 wurde in 3/10 (33%) MM detektiert.

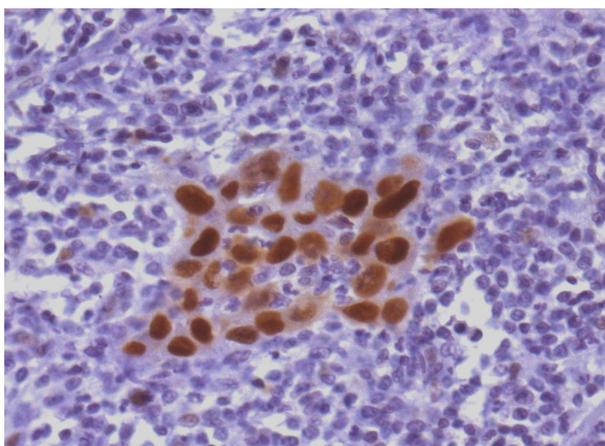


Abb. 4.11
Immunhistochemische
Untersuchung mit Anti-p53:
Mikrometastase mit starker
brauner Anfärbung der
Tumorzellkerne. 200fache
Vergrößerung.

Tabelle 4.9 Molekulare und phänotypische Charakterisierung der Mikrometastasen

	1	2	3(1)	3(2)	4	5	6	7	8	9
EGFR	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	+++
p16	n.g.	++	++	+	++	++	+	-	+	++
p53	n.g.	+	+	+++	-	-	-	-	+++	+++
AE1/AE3	-	+++	++	+	++	+	+++	-	+++	-
A45-B/B3	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	++	+++
EMMPRIN	+	++	n.g.	++	+	+	++	+	+	+
MMP1*	+++	+	++	-	++	+++	n.g.	n.g.	+++	n.g.
MMP2*	++Str	+Str	-	+	+Str	+Str	n.g.	n.g.	-	n.g.
EpCAM	n.g.	+	-	-	-	-	-	n.g.	-	n.g.

+++ starke Immunreaktion; ++ mäßige Immunreaktion; + schwache Immunreaktion; - keine Tumorzellen detektierbar, n.g. nicht getestet, Str Stroma, * mRNA

5 Diskussion

5.1 Optimierung der immunhistochemischen Analyse zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob sich disseminierte Tumorzellen (DTZ)/Mikrometastasen (MM) in lokoregionären Lymphknoten oraler/oropharyngealer PEK nachweisen lassen, die sich der pathologisch-anatomischen Routine-Begutachtung mit konventioneller H&E-Färbung entziehen. Für die Detektion der Tumorzellen sollte ein immunhistochemischer Nachweis mit verschiedenen Anti-CK-Antikörpern getestet, optimiert und an primär als metastasenfrem eingestuften LK durchgeführt werden.

Bekannterweise werden CK von Epithelzellen und Zellen epithelialer Tumoren exprimiert. Die CK-Expression von neoplastisch veränderten Epithelien ähnelt dem Ursprungsgewebe in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung der Karzinome. Alle Plattenepithelien produzieren CK 5 und 14. Nichtverhornende Plattenepithelien wie z.B. das Epithel der Wangenschleimhaut, des Ösophagus und der Alveolarleiste produzieren CK 4 und 13 zusammen mit CK 5 und 14, während verhornende Plattenepithelien der Haut, der Zunge und des Gaumens CK 1, 2 und 10 zusammen mit CK 5 und 14 produzieren (Moll et al., 1982, Clausen et al., 1986; Sawaf et al., 1991). Sesterhenn et al. (2005) untersuchten immunhistologisch das Vorkommen von CK 6, 14, 16 und 17 bei Tumoren aus dem Kopf-/ Halsbereich. CK 14 und 16 waren in 14 von 15 Fällen, CK 6 und 17 in 100% der Fälle detektierbar. In einer weiteren Studie wurde die CK-Expression von normalem Plattenepithel des Ösophagus mit der CK-Expression von PEK des Ösophagus verglichen. CK 19 wurde zu gleichen Anteilen sowohl im PEK als auch im normalen Plattenepithel des Ösophagus produziert. Im Gegensatz dazu wurden CK 8, 7 und 10 ausschließlich im PEK nachgewiesen. CK 18 und 13 wurden zu 97% bzw. 83% der untersuchten Fälle in den PEK detektiert und nur zu ca. 15% im korrespondierenden normalen Gewebe (Lam et al., 1995). PEK werden laut einer Studie von Moll (1991) durch CK 5, 6, 14, 16, 17 identifiziert. Orale PEK, die metastasieren, exprimieren interessanterweise vermehrt CK 5, 6 und 13 (Suo et al., 1993). Über die CK Expression der Lymphknotenmetastasen gibt es bisher kaum Untersuchungen. Es wird davon ausgegangen, dass die CK des Primärtumors ebenfalls in den korrespondierenden Metastasen produziert werden.

In der vorliegenden Studie wurden die Pan-CK-Primärantikörper AE1/AE3 und 34βE12 im Hinblick auf ihre mögliche Anwendung für den Nachweis von MM bis hin zu einzelnen DTZ getestet. Wichtige Auswahlkriterien der Primärantikörper waren neben der reproduzierbaren, intensiven und homogenen Immunreaktion an den Primärtumoren vor allem auch die deutliche Anfärbung und die Abgrenzbarkeit einzelner DTZ in den Ausläufern der Tumoren.

AE1/AE3 ist gegen ein breites Spektrum von CK gerichtet, wobei AE1 CK 10, 14, 15, 16 und 19; AE3 dagegen CK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 detektiert. AE1/AE3 erwies sich mit seinem breiten Nachweisspektrum bereits in zahlreichen Studien an verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise an PEK des Ösophagus, an Gallengangskarzinomen, an kolorektalen und oralen Karzinomen, als zuverlässig (Greenson et al., 1994; Natsugoe et al., 1998; Barrera et al., 2003; Natarajan et al., 2005). Der Pan-CK-Antikörper 34βE12 detektiert CK 1, 5, 10 und 14 und ist ebenso gegen ein breites Spektrum von CK gerichtet. 34βE12 detektiert mindestens vier verschiedene CK.

Einige Studien dokumentieren, dass mesenchymale Gewebe CK exprimieren können. Eine Studie von Franke und Moll (1987) zeigte, dass in lymphatischen Geweben in unterschiedlicher Ausprägung bereits CK 8, 18 und 19 nachgewiesen wurden.

In den eigenen Untersuchungen mit dem Primärantikörper 34βE12 konnte unter Verwendung der ABC-Methode ein besseres Färbesignal erzielt werden als mit AE1/AE3. Dieser zeigte zwar durch eine intensive Immunreaktion das Vorhandensein von Tumorzellen an, einzelne Tumorzellen in den Ausläufern der Karzinome ließen sich jedoch nicht klar abgrenzen. Für die immunhistochemische Analyse der Lymphknotenpräparate erwies sich deshalb der Primärantikörper 34βE12 als am besten geeignet.

5.2 Nachweis von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen in den lokoregionären Lymphknoten oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome

In der vorliegenden Arbeit wurden primär als metastasenfrem beurteilte lokoregionäre Lymphknoten von 78 Patienten auf CK-exprimierende Zellen untersucht. MM wurden bei 9 (11,5%) Patienten detektiert. In der Gruppe der primär als nodal-negativ eingestuft Patienten (pN0) konnten in 9,3% (5/54 Patienten) der Fälle MM

detektiert werden. In der Gruppe der Patienten mit primär nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (pN+) konnten MM in 17% (4/24 Patienten) der primär metastasenfreen Lymphknoten nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte in mehreren Fällen zusätzlich eine Makrometastase detektiert werden. Außerdem ließen sich in 4 Fällen der Patienten, davon 2 mit pN0 und 2 mit pN1 zusätzlich Makrometastasen detektieren.

Wider Erwarten waren mit der eingesetzten Methode keine DTZ detektierbar.

Dieses Ergebnis stimmt mit anderen immunhistochemischen Studien unter Verwendung von Anti-CK-Antikörpern an Oralkarzinomen überein, bei denen in 8% bis 58% MM mittels Pan-CK-Antikörper in Lymphknoten detektiert wurden. Rhee et al. (2002) beobachtete bei der Hälfte der Patienten (n=10) mit oralen PEK ohne Lymphknotenmetastasierung (pN0) MM in den Halslymphknoten. Yoshida et al. (2005) fanden bei einem etwas größeren Patientenkollektiv mit oralen Karzinomen und negativem Lymphknotenstatus (pN0) in 58% der Fälle (14/24 Patienten) MM. Hamakawa et al. (2000) untersuchten dagegen 554 Lymphknoten (N0) von 73 Patienten und wiesen in 21,9% MM nach. In einer Studie von Brennan et al. (1995) konnten bei 21% (6/28 Patienten) der histopathologisch Tumor-negativen Lymphknoten (pN0) MM gefunden werden. Woolgar (1999b) detektierte bei nur 8% der Patienten (14/86) mit bereits positivem Lymphknotenstatus (pN+) MM. Barrera et al. (2003) fanden durch immunhistochemische Analyse mit AE1/AE3 bei 29% (6/21 Patienten) der Patienten mit Nodalstatus (pN0) und bei 45% (5/11 Patienten) der Patienten mit bereits bekannten Lymphknotenmetastasen (pN+) MM. Im Gegensatz dazu konnte Ulanovski et al. (2004) in Lymphknoten mittels immunhistochemischer Analyse keine MM nachweisen.

Für die diskrepanten Ergebnisse in diesen Studien könnten einerseits falsch negative Ergebnisse und andererseits falsch positive Ergebnisse verantwortlich sein.

Die Durchführung der immunhistochemischen Methode mit Unterschieden in der Vorbehandlung der Schnitte, der Verwendung von unterschiedlichen Primärantikörpern sowie unterschiedlichen Nachweissystemen und auch Differenzen in den untersuchten Fallzahlen (zwischen n=10 und n=178 untersuchte Patienten) können zu falsch negativen Resultaten führen. Die untersuchten Lymphknoten stammten zudem von Patienten mit Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation, Größe und Eindringtiefe. Interessanterweise enthalten Karzinome neben den CK ihres normalen Ursprungsgewebes gelegentlich zusätzlich exprimierte CK

(Schaafsma und Ramaekers, 1994). Um MM trotz dieser Veränderung in der CK-Expression nachweisen zu können, wurden Anti-CK-Antikörper mit einem breitem Zytokeratin-Nachweisspektrum (Pan-CK-Antikörper) eingesetzt. Haben der Primärtumor und seine korrespondierenden Metastasen im Laufe der Entwicklung allerdings die Fähigkeit zur Expression aller nachweisbarer CK verloren, so entziehen sich die Tumorzellen der Detektion mit Anti-CK-Antikörpern (Pantel et al., 1999). Durch Untersuchungen an Mammakarzinomen konnte herausgefunden werden, dass die Downregulation einzelner CK im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen Transformation charakteristisch und notwendig für die Invasion und Migration der Tumorzellen ist (Woelfle et al., 2003 und 2004; Willipinski-Stapelfeldt et al., 2005). Die Vielfalt oder der Verlust der CK-Expression der PEK könnten deshalb ebenfalls voneinander abweichende Studienergebnisse erklären.

Trotz dieser Probleme scheint der Gebrauch von Anti-CK-Antikörpern eine ausreichende verlässliche und effektive Methode zum Nachweis von MM in Lymphknoten zu sein. Die Sensitivität der immunhistochemischen Analyse zur Detektion der MM in Lymphknoten mit spezifischen tumorassoziierten Markern entspricht in etwa der einer RT-PCR (Gath und Brakenhoff, 1999). Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Lymphknoten gelingt es immerhin unter 10.000-100.000 Lymphozyten eine einzelne Tumorzelle zu detektieren (Pantel et al., 1994).

Immunhistochemische Versuche können zu falsch positiven Resultaten in Abhängigkeit vom durchführenden Labor und den damit implizierten Diskrepanzen in den unterschiedlichen Versuchsprotokollen führen (Pantel et al., 1996). Mögliche Ursachen hierfür liegen in der Verwendung von unterschiedlichen Primärantikörpern (z.B. A45-B/B3, AE1/AE3, SCC-Antigen), manueller bzw. automatischer Analyse sowie in den Auswertungsverfahren (manuell mikroskopisch, automatische Systeme). Durch die Verwendung des automatischen Systems wurde in dieser Studie versucht, Fehlerquellen, die durch manuelles Färben entstehen können, zu vermeiden (van Houten et al., 2000a und b). Weitere Ursachen für falsch positive Ergebnisse sind benachbarte Epithelstrukturen beispielweise von Speicheldrüsen, die im Einzelfall so angeschnitten sein können, dass sich auch eine morphologische Abgrenzung zu einer MM schwierig gestaltet. Hierin zeigt sich großer Vorteil der *in-situ* Methode gegenüber der PCR, bei der die Möglichkeit besteht, das Gesamtpräparat zu betrachten. Durch die genaue Lokalisation der Lymphknoten

kann man diese Fehlerquelle im Gegensatz zur RT-PCR i.d.R. ausschalten. Weiterhin stellt die Tatsache, dass die Zellen phänotypisch und molekular weiter charakterisiert werden können, den größten Vorteil der Immunhistochemie dar (van Houten et al., 2000b). Neben den unspezifischen Reaktionen ist allerdings eine ektope Expression von Zytokeratinproteinen (z.B. konnten CK 8, CK 19 und CK 20 im Blut und Knochenmark gesunder Probanden und Patienten mit malignen Erkrankungen nachgewiesen werden) in mesenchymalen Zellen nicht vollständig auszuschließen (Pantel et al., 1994; Traweek et al., 1993; Zippelius et al., 1997). Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen exprimieren auch Monozyten des Blutes nachweislich CK (Jung et al., 1998). Zahlreiche Studien an einer großen Anzahl von Kontrollpatienten ohne Tumorleiden zeigten jedoch nur äußerst selten eine CK-Expression in Knochenmarkszellen (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996). Doppelfärbungen mit zytokeratinspezifischen Antikörpern, die für mesenchymale Marker spezifisch sind, könnten Aufschluss bringen. Pantel et al. (1995) untersuchten mit monoklonalen Antikörpern, die gegen das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin und/oder gegen das gemeinsame Leukozytenantigen CD45 gerichtet waren, Knochenmark-Primärkulturen und wiesen keine Expression dieser Marker nach, was eine ektope Expression von mesenchymalen Stromazellen oder Zellen hämatopoetischer Herkunft sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt (Pantel et al., 1995).

Durch die Aufarbeitung der Lymphknoten in mehreren Stufenschnitten und die immunhistochemische Analyse gelang es bereits in mehreren Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten (Izbicki et al., 1997; Natsugoe et al., 1998; Glickman et al., 1999; Hosch et al., 2000), eine größere Anzahl an okkulten Metastasen aufzudecken. In einer Studie von Natsugoe et al. (1998) wurden die Lymphknoten von Ösophaguskarzinomen auf die Anwesenheit von MM untersucht. Von Lymphknoten, deren größte Ausdehnung ≤ 1 cm betrug, wurden zwei Schnittstufen und von Lymphknoten, die $>$ als 1 cm waren, vier Schnittstufen angefertigt und immunhistochemisch analysiert. Sowohl die immunhistochemische Analyse als auch die zusätzlichen Schnittstufen der Gewebe trugen wesentlich zur Detektion der okkulten Metastasen bei. Interessanterweise konnten bei der ersten „üblichen“ Schnittstufe der Lymphknoten in der Hälfte der Fälle keine Tumorzellen gefunden werden. Auch Izbicki et al. (1997) fanden in einer Studie an Lymphknoten

von Patienten mit Ösophaguskarzinomen heraus, dass die Anfertigung mehrerer Schnittstufen jedes Lymphknotens die Detektionsrate steigerte. In beiden Studien wurde festgestellt, dass der immunhistochemische Nachweis von MM signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert war. Der klinische Nutzen wird in beiden Studien deutlich, auch wenn die Anfertigung von zusätzlichen Schnittstufen für die Routinediagnostik aus Zeit- und Kostengründen momentan nicht praktikabel erscheint. In einer anderen Studie von Patienten mit Ösophaguskarzinomen fertigten Glickman et al. (1999) von jedem Lymphknoten fünf Schnittstufen im Abstand von 200 µm an. Sie fanden mittels immunhistochemischer Analyse in 31 von 341 Lymphknoten MM. Davon konnten 50% (n=15) der detektierten Zellen in allen Schnittstufen nachgewiesen werden, 19% (n=6) nur in \geq einer der ersten drei Schnittstufen und 32% (n=10) in der vierten oder/und fünften Schnittstufe. In dieser Studie wurde keine prognostische Relevanz von MM nachgewiesen. Glickman et al. (1999) befürworteten deswegen nicht die aufwendige Anfertigung von zusätzlichen Schnittstufen und die immunhistochemische Analyse.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten durch die Aufarbeitung der Lymphknotenpräparate in vier Stufenschnitten (im Abstand von 150 µm) zusätzliche MM nachgewiesen werden. Bei 2 der 9 Patienten konnten erst ab der zweiten Schnittstufe MM nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Fall konnten in der ersten Schnittstufe zwei MM, in den Schnittstufen zwei und drei nur jeweils noch eine MM und in der letzten Schnittstufe keine MM mehr nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle (56%) jedoch waren die MM, wie bereits auch in der Studie von Glickman et al. (1998) gezeigt wurde, in allen Schnittstufen detektierbar. Da von den Lymphknoten vier Stufenschnitte im Abstand von jeweils 150 µm angefertigt wurden, hat eine MM insgesamt eine horizontale Ausdehnung von mindestens 600 µm.

Um sicher Makrometastasen in der Routinediagnostik identifizieren zu können, müsste jeder Lymphknoten in ca. 2-3 mm dicke Scheiben zerlegt und vollständig eingebettet werden. Von jeder Lymphknotenscheibe wiederum werden 3 Stufen im Abstand von 500 µm angefertigt und routinemäßig mit HE gefärbt. Zum Ausschluss von MM müsste zusätzlich eine immunhistochemische Analyse erfolgen.

Da man MM dieser Größe, es handelt sich dabei nicht um einzelne DTZ, durch H&E-Färbung und ohne zusätzliche Anfertigung von Schnittstufen übersehen kann, ist trotz zusätzlichem Arbeitsaufwand und Kosten für die Immunhistochemie eine Einführung dieser Methode in die Routinediagnostik zu überlegen. Betrachtet man

die Gesamtausdehnung der in verschiedenen Schnittstufen detektierten MM, kann man zum Teil bereits von definierten Metastasen sprechen, deren Erfassung für die Prognose und das weitere therapeutische Management klinisch relevant ist.

Im Besonderen ist die mikroskopische Auswertung sehr zeitintensiv und erfordert zudem eine ausgedehnte Sachkenntnis der morphologischen Strukturen. Die in jüngster Zeit entwickelten Methoden wie beispielsweise automatische mikroskopische Auswertesysteme (*image-analysis system scanner*) bieten neue Möglichkeiten. Sie zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus und ermöglichen, eine größere Anzahl an Präparaten in kurzer Zeit zu analysieren (Pantel et al., 1999). Diese automatischen Auswertesysteme können aber in der Regel nur bestimmte vordefinierte Farbunterschiede wahrnehmen, und die eigentliche Entscheidung, ob es sich bei einem automatisch gefundenen farbmarkierten Objekt überhaupt um eine Zelle und, wenn ja um eine Tumorzelle handelt, kann nur individuell durch mikroskopische Kontrolle der durch den Automaten detektierten Befunde entschieden werden. Das im Institut für Tumorbiologie des UKE verfügbare automatische Auswertesystem ACIS (Automated cellular imaging system, Chromavision, DAKO) bietet diese Möglichkeit am Computerbildschirm.

Von den in der vorliegenden Arbeit manuell ausgewerteten 976 Lymphknotenpräparaten wurden nachträglich und nicht mehr als Bestandteil dieser Arbeit, 852 immunhistochemisch gefärbte LK-Schnitte zusätzlich einer automatischen Auswertung mit Hilfe des automatischen Mikroskopes ACIS (Chromavision) unterzogen. Alle bereits detektierten MM konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Die Evaluierung der erhaltenen Images ergab zusätzlich zu den in den eigenen Untersuchungen gefundenen MM bei 9 Stufenschnitten von 6 Patienten DTZ/MM, die mit der konventionellen mikroskopischen Auswertung trotz immunhistochemischer Färbung nicht erfasst wurden (Riethdorf S, unveröffentlichte Ergebnisse). Mit der automatischen Auswertung kann folglich eine weitere Erhöhung der Sensitivität erreicht werden.

Im Gegensatz zur IHC-Analyse bilden neuere molekulare Nachweismethoden wie beispielsweise die Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bzw. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine viel versprechende Alternative. Dabei können Gewebeproben auf tumorspezifisch veränderte mRNA- oder DNA-Sequenzen analysiert werden (Gath und Brakenhoff, 1999; van Houten et al., 2000b). Der Vorteil

dieser Verfahren bei der Analyse von Knochenmarks- und Blutzellen liegt in der hohen Zielgenauigkeit und Sensitivität. In der von van Houten et al. publizierten Studie konnte eine einzelne Zelle aus 7 ml Blut (entsprechend $2-7 \times 10^7$ weißen Blutzellen) mit Hilfe von E48-Antigen detektiert werden. Für den Nachweis von MM in Lymphknoten gibt es bisher kaum verlässliche tumorzell-spezifische Marker. Das E48-Antigen beispielsweise detektierte sowohl Tumorzellen als auch normales Lymphknotengewebe (van Houten et al., 2000b).

McDonald et al. (1998) untersuchten mit Hilfe der RT-PCR Lymphknoten von 24 Patienten mit oralen/oropharyngealen Karzinomen auf die Anwesenheit von Zytokeratin 5 mRNA. Bei 63% der 16 Patienten mit metastasenfremen Lymphknoten (pN0) und 75% der untersuchten 8 Patienten mit positivem Lymphknotenstatus (pN+) wurden MM nachgewiesen.

Nieuwenhuis et al. (2003) untersuchten mit der quantitativen RT-PCR Halslymphknoten auf das Vorhandensein von mRNA für das Plattenepithel-spezifische Antigen E48 (Ly-6D) (*SCC-specific antigen E48*). E48 wird typischerweise von normalen Zellen des Plattenepithels und von malignen Zellen exprimiert. Bei 22% der Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung pN0 (5/23 Patienten) und 56% der Patienten mit bereits bekannten Lymphknotenmetastasen pN+ wurde E48-Expression in den Lymphknoten nachgewiesen. Patienten mit Lymphknotenstatus pN0, bei denen ein oder mehrere E48 positive Lymphknoten detektiert werden konnten, überlebten signifikant kürzer.

Die Spezifität der RT-PCR kann jedoch durch illegitime Expression von Markergenen durch Nicht-Tumorzellen des Gewebes beeinflusst werden. Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war in den Untersuchungen nicht immer gegeben (Gath und Brakenhoff, 1999; van Houten et al., 2000a und b) Einerseits kann es bei der Probeentnahme durch den Kliniker zur Kontamination der Proben mit Epithelzellen kommen und andererseits können während der technischen Vervielfältigung einiger weniger DNA-Sequenzen Variationen in den Ergebnissen auftreten. Eine Reihe von Markern ist aufgrund der illegitimen Expression (Expression eines einzelnen Transkripts unter 100 bis 1000 Zellen, auf dieser Stufe der Expression werden noch keine Proteine exprimiert und sind somit irrelevant für zelluläre Funktionen) in Zellen, die normalerweise im Lymphknoten vorkommen, nicht anwendbar. Weiterhin können z.B. auch durch die physiologische, irrelevante Expression von Markergenen im Zielgewebe falsch positive Ergebnisse auftreten. In

der immunhistochemischen Analyse dagegen können falsch positive Ereignisse durch Betrachtung der morphologischen Eigenschaften der Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Durch die RT-PCR bzw. das PCR-Verfahren besteht gezielt die Möglichkeit, die Genexpression primärer Tumoren und ihrer korrespondierenden DTZ zu vergleichen (Riethmüller et al., 1999).

5.3 Korrelationen zwischen dem Nachweis von Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten und histopathologischen Faktoren

Bei 9/54 (9,3%) untersuchten Patienten mit primär negativem Lymphknotenstatus konnten MM nachgewiesen werden. Bei Patienten mit bereits histopathologisch positivem Lymphknotenstatus konnten in bis zu 50% der Fälle MM in weiteren primär negativen Lymphknoten detektiert werden. Es ist wie erwartet die Tendenz zu erkennen, dass mit zunehmendem Lymphknotenbefall das Risiko für die Ausbreitung von Tumorzellen in weiteren Lymphknoten deutlich steigt.

Cerezo et al. (1992) und Mamelle et al. (1994) konnten in Studien an multiplen Lymphknoten und ihren Lymphknotenmetastasen signifikante Korrelationen zum Tumorstadium sowie der Lokalisation oraler Primärtumoren ermitteln. In der Literatur nimmt das Risiko für die Lymphknotenmetastasierung mit folgenden Lokalisationen des Primärtumors ab: hypopharyngeale Karzinome (86%), oropharyngeale Karzinome (73%), Karzinome der Mundhöhle (51%) und Karzinome des Larynx (45%) (Mamelle et al., 1994). Auch Krause et al. (1973) und Mendelson et al. (1976). bestätigten in weiteren Studien diesen Zusammenhang. Die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung für PEK der Zunge im Tumorstadium T1, T2 und T3 liegt bei 18%, 33% und 60% im Gegensatz zu PEK des Mundbodens im Tumorstadium T1, T2, T3 38%, 65% und 71%. In einer Untersuchung an Lymphknoten von 93 Patienten mit kutanen PEK erwies sich das Tumorstadium (T1 versus T2-T3) als signifikanter Prognosefaktor für die regionale Lymphknotenmetastasierung (Rodolico et al., 2004). Ambrosch et al. (1995) ermittelten bei der Untersuchung von 76 Patienten mit Karzinomen des oberen Luft- und Verdauungstraktes ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MM und dem Tumorstadium.

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MM in Lymphknoten und dem Stadium, der Lokalisation oder dem Differenzierungsgrad des Primärtumors, dem Alter oder dem Geschlecht verzeichnet. Glickman et al. (1999) und Nakamura et al. (2002) untersuchten

immunhistochemisch MM an Lymphknoten von PEK des Ösophagus. Sie konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MM und dem Tumorstadium, der Tumorlokalisation und dem Tumordifferenzierungsgrad feststellen. Sowohl methodische Unterschiede in der immunhistochemischen Analyse als auch unterschiedlich große Fallzahlen sind beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Autoren im Hinblick auf eine Korrelation zwischen MM in Lymphknoten und histopathologischen Faktoren untereinander, mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit zu beachten. Durch die Heterogenität (in Bezug auf die Lokalisation, Größe des Primärtumors) des ausgewählten Patientenkollektives in dieser Studie wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert.

5.4 Phänotypische und molekulare Charakterisierung der Mikrometastasen

Orale/oropharyngeale PEK metastasieren am häufigsten lymphogen. In Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus wird das weitere therapeutische Management entschieden. Ob der Patient bereits Lymphknotenmetastasen aufweist oder entwickelt, ist für die Klinik von außerordentlich großer Bedeutung. Invasion und Metastasierung sind für den Progressionsverlauf maligner Tumoren charakteristisch. Komplexe Prozesse, basierend auf einer Überexpression von Onkogenen (EGFR, K-ras, Cyclin D1) und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen (p53, p16^{INK4}) spielen neben den Interaktionen zwischen den einzelnen Tumorzellen und ihrer Umgebung eine wichtige Rolle. Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin, Catenin α , β und γ), die interzelluläre Bindungen bei gesunden Zellen vermitteln, sind bei malignen Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt bzw. fehlen. Die Expressionsminderung oder Dysregulation des Zelloberflächenmoleküls E-Cadherin scheint beispielsweise mit der Fähigkeit einzelner Tumorzellen, sich vom Tumor lösen zu können, zu korrelieren. Die Fähigkeit der losgelösten Tumorzellen, zeitweise Kontakt mit der extrazellulären Matrix (EZM) aufzunehmen, ist Voraussetzung für die Migration der Zellen. An diesen Zell-Substrat-Interaktionen sind Integrine und CD44 beteiligt (Hardisson, 2003; Tanaka et al., 2003; Howell und Grandis, 2005). Ein weiterer wichtiger Schritt für die Infiltration des umgebenden Gewebes ist die Degradation von Komponenten der EZM (Duffy, 1998). Die Proteolyse von Komponenten der EZM (Kollagen, Glykoproteine, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane) ist notwendig für die erfolgreiche Passage durch umgebende Bindegewebs- und Gefäßbarrieren, für das Eindringen in das Blut- und Lymphgefäßsystem (Intravasation), für den Übertritt

von Tumorzellen aus dem Gefäßsystem (Extravasation) und für die Absiedlung von Metastasen. Zu den proteolytischen Enzymen gehören die Matrix-Metalloproteasen (MMP), die verwandten Proteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie, die Cysteinproteasen, zu denen Cathepsin B und L gehören, die Aspartatprotease Cathepsin D sowie die Serinproteasen, zu denen Plasmin und der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) gerechnet werden (Egeblad und Werb, 2002; Howell und Grandis, 2005).

Die genauen biochemischen, genetischen und zellkinetischen Eigenschaften der Tumoren in Bezug zu ihrer Morphologie sind jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Ihre Erforschung könnte möglicherweise zur gezielten Inhibition molekularer Mediatoren führen. Auf diese Weise könnte sich die Lymphknotenmetastasierung reduzieren lassen und das Überleben der Patienten verbessert werden (Howell und Grandis, 2005). Eine Vielzahl an Arbeiten trugen bisher bereits zur weiteren Charakterisierung von DTZ/MM in Knochenmark, Blut und Lymphknoten von unterschiedlichen Tumorentitäten bei.

Takes et al. (2001) beispielsweise untersuchten in einer Studie an oralen PEK das Metastasierungsverhalten. Sie verglichen die Expression von unterschiedlichen genetischen Markern (p53, Rb, Cyclin D1, myc, bcl-2, EGFR, HER2neu, E-Cadherin, EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*)), die nachweislich an der Tumorprogression beteiligt sind, an Lymphknotenmetastasen und den jeweils korrespondierenden Primärtumoren. Interessanterweise wiesen Primärtumoren und korrespondierende Lymphknotenmetastasen neben vielen genetischen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in der Genexpression auf. Das Zelladhäsionsmolekül EpCAM beispielsweise konnte zu 29% (14/49) in den Primärtumoren im Vergleich zu nur 14% (7/49) in den Metastasen detektiert werden. Diese Differenzen deuten auf eine unterschiedliche Regulation der Kanzerogenese und der Metastasierung hin.

Meng et al. (2004) und Wülfing et al. (2006) fanden bei der Untersuchung an Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen heraus, dass Patientinnen mit HER2neu-negativen Primärtumoren HER2neu-positive zirkulierende Tumorzellen aufweisen können. Möglicherweise entstehen HER2neu-Genamplifikationen erst während der Tumorprogression. In einer anderen Studie konnte eine Koamplifikation von HER2neu und uPAR bei zirkulierenden Tumorzellen im Blut von

Mammakarzinompatientinnen gefunden werden (Meng et al., 2006), was auf eine Kooperation zwischen HER2neu und uPAR bei der Metastasierung hindeutet.

Klein et al. (2002) konnten mittels Genomanalyse die Expression von EMMPRIN in DTZ/MM des Knochenmarkes von Mammakarzinom-Patientinnen nachweisen. In einer weiteren Studie wurden DTZ durch eine Doppelfärbung mit A45-B/B3 und EMMPRIN im Knochenmark, die eine Expression von EMMPRIN zeigten, detektiert (Reimers et al., 2004).

Thurm et al. (2003) untersuchten die Expression von EpCAM mittels Doppelfärbung mit A45-B/B3 und Mab3B10 (gegen EpCAM-Epitop gerichtet) in DTZ/MM des Knochenmarkes aus Patienten mit Mammakarzinomen nach zwei oder mehreren Zyklen Chemotherapie. In 10/35 (28,6%) Knochenmarksproben wurden CK-positive Zellen detektiert. Interessanterweise zeigte keine dieser Zellen eine Koexpression mit EpCAM. Eine Anti-EpCAM-Therapie scheint sich demzufolge nicht für eine nachfolgende adjuvante Therapie zu eignen.

Auch in der vorliegenden Studie wurden die Lymphknotenpräparate, in denen MM nachgewiesen werden konnten, mit folgenden Markern p53, p16^{INK4}, EMMPRIN, EpCAM, AE1/AE3, A45-B/B3, EGFR, MMP1 und MMP2 phänotypisch und molekular näher charakterisiert.

5.4.1 Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 und AE1/AE3

CK sind integrierte Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen, die relativ stabil auch durch Zellen epithelialer Tumoren exprimiert werden. Im Gegensatz zu Mucin-ähnlichen, sogenannten tumor-assoziierten Zellmembranproteinen, die auch durch hämatopoetische Zellen exprimiert werden (Pantel et al., 1994; Schlimok et al., 1987), erwiesen sich CK in einer Reihe von Studien als die derzeit verlässlichsten Marker zur Detektion epithelialer Tumorzellen im Knochenmark und Blut (Gath et al., 1995; Braun et al., 1998; Pantel et al., 1999). Obwohl eine ektope oder illegitime mRNA-Expression von CK in mesenchymalen Zellen nicht vollständig auszuschließen ist (Traweek et al., 1993; Zippelius et al., 1997), zeigen doch zahlreiche Untersuchungen an Patienten ohne nachweisbare maligne Erkrankung, dass eine ektope Expression von CK in Knochenmarkszellen nur sehr selten nachweisbar ist (Pantel et al., 1994, Pantel et al., 1996; Schlimok et al., 1987). AE1/AE3 ist ein Gemisch von zwei verschiedenen Klonen von monoklonalen Anti-

CK-Antikörpern, AE1 und AE3. AE1 detektiert die hochmolekularen CK 10, 14, 15 und 16, sowie das niedrigmolekulare CK 19. Der Klon AE3 markiert die hochmolekularen CK 1, 2, 3, 4, 5 und 6, sowie das CK 7 und 8 mit niedermolekularem Gewicht. A45-B/B3 ist ein Pan-CK-Antikörper. Er entstammt einem hybridisierten Zellklon und ist gegen die Antigenstruktur der CK-Heterodimere 8-18 und 8-19 gerichtet.

Borgen et al. (2006) verglichen die Zuverlässigkeit der immunzytochemischen Detektion von epithelialen Zellen im gesunden Knochenmark mit verschiedenen Anti-CK-Antikörpern (AE1/AE3, A45-B/B3, CK2). Die Analyse mit AE1/AE3 und A45-B/B3 erwies sich als besonders spezifisch. In jeder Analyse wurden gelegentlich hämatopoetische Zellen nachgewiesen. Durch morphologische Klassifizierung dieser Fälle konnten jedoch 90% der falsch positiven Ergebnisse einfach ausgeschlossen werden.

Weitere Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten unterstützen die Zuverlässigkeit der Pan-CK-Antikörper AE1/AE3 und A45-B/B3 zur Detektion von Tumorzellen. Natsugoe et al. (1998) beispielsweise untersuchten Lymphknoten von Ösophaguskarzinomen mit AE1/AE3. 13/41 (36,6%) zuvor als metastasenfrei eingestufte Lymphknoten enthielten DTZ/MM und bei 12/28 (42,9%) Lymphknoten im Stadium pN1 wurden zusätzliche DTZ/MM gefunden. In einer Studie an Kolorektalkarzinomen wurden in 14/50 (28%) Fällen CK-positive Zellen in Lymphknoten detektiert. Interessanterweise korrelierte deren Anwesenheit mit einer signifikant schlechteren Prognose (Greenson et al., 1994). Ishigami et al. (2003) detektierten mit AE1/AE3 bei 19/180 Lymphknoten-negativen Patienten mit Magenkarzinom DTZ/MM, deren Nachweis ebenfalls mit einem kürzeren Überleben korrelierte. Natarajan et al. (2005) evaluierte den Gebrauch von AE1/AE3 für die Detektion von DTZ/MM in Lymphknoten von Gallengangskarzinomen. AE1/AE3 detektierte zu 100% sowohl die Primärtumoren als auch deren korrespondierende Lymphknotenmetastasen. Daraufhin wurden bei 2/15 (13%) Fällen mit histologisch metastasenfreien Lymphknoten CK-positive Zellen in Lymphknoten gefunden. In einer weiteren Studie an oralen/oropharyngealen Karzinomen wurden in 13/69 (13,8%) Fällen in metastasenfreien Lymphknoten DTZ/MM detektiert (Kwon et al., 2004). In der vorliegenden Studie konnten mit AE1/AE3 nur 70% (7/10) der MM detektiert werden, wobei nur 30% eine intensive Immunreaktion zeigten. Es wurden nicht wie erwartet aufgrund des breiteren Wirkspektrums an CK alle MM

nachgewiesen. Möglicherweise ist vor allem das breite Wirkspektrum weniger sensitiv. Im Gegensatz dazu konnte A45-B/B3 in 90% der Fälle, bei denen Lymphknotenmikrometastasen durch 34 β 12 detektiert wurden, nachgewiesen werden. Davon zeigten 60 % eine starke Immunreaktion. Schlussfolgernd scheint A45-B/B3 ebenfalls ein geeigneter Primärantikörper für den Nachweis von DTZ/MM in Lymphknoten zu sein. Die Zuverlässigkeit der Detektion durch A45-B/B3 vor allem einzelner Tumorzellen im Knochenmark und Blut erwies sich in mehreren Studien (Gath et al., 1995; Pantel et al., 1995; Braun et al., 2000a). Braun et al. (2000a) demonstrierten zudem in einer klinischen Verlaufskontrollstudie an mehr als 500 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom die prognostische Relevanz von A45-B/B3-positiven Zellen im Knochenmark.

5.4.2 p53

p53 ist ein Tumorsuppressorprotein und kontrolliert am Ende der G1-Phase, bevor die Zelle in die S-Phase eintritt, das Genom auf DNA-Schäden. P53 induziert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund seiner Funktion wird p53 auch der „Wächter“ des Genoms genannt (Lane, 1992). Durch Mutationen im TP53 Gen, das für p53 kodiert, kommt es zur verminderten oder aufgehobenen p53-Synthese mit entsprechend verminderter p53-Konzentration und Funktion. Häufiger allerdings ist das Protein vorhanden, aber mutiert, was zu einem „gain of function“ führen kann. Die Folge daraus ist, dass sich die Zellen mit geschädigter DNA unkontrolliert teilen, es kommt zur Tumorbildung. Unter physiologischen Bedingungen ist die Halbwertszeit von p53 so kurz, dass es immunhistologisch nicht nachweisbar ist. Bei mutiertem p53 kommt es häufig durch eine Konformationsänderung des Proteins zur wesentlichen Verlängerung der Halbwertszeit und Akkumulation. Somit kann p53 dann immunhistologisch nachgewiesen werden (Levine et al., 1991; Wynford-Thomas, 1992; Hall und Lane, 1994). Weiterhin muss mit falsch negativen Ergebnissen, die aufgrund von Artefakten bei der Fixierung des Tumorgewebes entstanden sein könnten, gerechnet werden. Darüber hinaus kann es durch *nonsense*-(sinnentstellende) Mutationen zur Produktion von funktionsunfähigem verkürztem p53 kommen, bei dem die vom Primärantikörper zu erkennenden Determinanten nicht mehr vorhanden sind. Diese *nonsense*-p53-Mutationen führen zudem meistens nicht zu einer verlängerten

Halbwertszeit des Proteins (Wynford-Thomas, 1992; Nylander et al., 1995). Auch mit falsch positiven Ergebnissen muss gerechnet werden, beispielsweise dann, wenn die Sensitivität der immunhistologischen Methode soweit gesteigert wird, dass bereits in physiologischen Mengen vorhandenes Wildtyp-p53 im Zellkern nachgewiesen wird (Hall und Lane, 1994). Weiterhin kann es zur physiologischen Steigerung der Wildtyp-p53-Expression kommen, wenn ein Schaden im Genom aufgetreten ist und mit dem natürlichen Ablauf zur Reparatur des Genomschadens begonnen wird sowie mit der Einleitung der Apoptose (Kastan et al., 1991).

Bei einer Reihe von Tumorerkrankungen, z.B. beim Ovarialkarzinom (Gadducci et al., 1996), beim Kolorektalkarzinom (Houbiers et al., 1995), beim Lungenkarzinom (Lubin et al., 1995) sowie bei oralen/oropharyngealen Karzinomen wurden bisher p53-Autoantikörper beschrieben. Bei oralen/oropharyngealen PEK konnte p53 in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle immunhistologisch nachgewiesen werden (Langdon und Partridge, 1992; Burns et al., 1993). Brennan et al. (1995) konnten mittels molekularer Analysen des p53-Tumorsuppressorgens in 6/28 Lymphknoten, die initial histopathologisch als tumorfrei beurteilt wurden, Tumorzellen nachweisen. In der vorliegenden Studie zeigte sich in 3/10 (30%) Fällen eine starke Immunreaktion. Dieses Ergebnis entspricht den Daten anderer Studien. Takes et al. (2001) verglichen ebenfalls immunhistologisch die p53-Expression von Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen. In 25/47 untersuchten Fällen wurde sowohl im Primärtumor als auch in den korrespondierenden Metastasen p53 detektiert. Der genaue Zusammenhang der p53 Expression im Rahmen der Metastasierung ist bisher ungeklärt.

5.4.3 p16^{INK4}

p16^{INK4} gehört ebenfalls zu den Tumorsuppressorgen. Das p16^{INK4}-Genprodukt bindet an die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6, die mit Cyclin D in direktem Zusammenhang stehen. Dadurch werden der Cyclin D1/CDK4/6-Komplex inhibiert und die Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins⁴ (Rb) verhindert. Damit verbunden ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. Vom Transkriptionsfaktor E2F hängt wiederum die Transaktivierung von Genen ab, die eine entscheidene Rolle im Zellzyklus einnehmen, die den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase steuern (Forastiere et al., 2001; Hardisson, 2003).

⁴ Das Retinoblastomagen (Rb) ist das erste Tumorsuppressorgen, das beim Menschen beschrieben wurde.

Mutationen im p16-Gen oder epigenetischer Verlust der p16-Expression zählen zu den häufigsten p16-Alterationen in oralen PEK. Genetische Veränderungen, die zur Inaktivierung von p16 führen, wurden bei oralen/oropharyngealen PEK in 7 bis 80% der untersuchten Fälle gefunden. Zu den häufigsten pathogenen Ursachen der Inaktivierung von p16^{INK4} zählen neben Punktmutation (Cairns et al., 1994; Merlo et al., 1995) oder homozygoter Deletion (Kamb et al., 1994; Reed et al., 1996) eine Hemmung der Transkription von p16^{INK4} durch Hypermethylierung des 5' CpG-Abschnittes innerhalb des Promotors (Little und Wainwright, 1995; Merlo et al., 1995; Gonzalez et al., 1997; Song et al., 2000). Das p16 Protein wurde mit monoklonalem Antikörper nachgewiesen und zeigte, wie bereits in einigen Studien beschrieben, eine zytoplasmatische und nukleäre Färbung der Tumorzellen (Milde-Langosch et al., 1998; Shintani et al., 2000).

Einen Verlust der p16-Expression zeigten Studien an adenoidzystischen Speicheldrüsenkarzinomen in 13,6% der Fälle (Shintani et al., 2000), an oralen PEK in 13% (Miracca et al., 1999) und an Speicheldrüsenkarzinomen in 20% der untersuchten Fälle (Etges et al., 2003).

Poetsch et al. (2003) verglichen p16-Alterationen bei basoloiden oralen PEK mit nichtbasoloiden oralen PEK mittels immunhistochemischer und molekular genetischer Methoden. Immunhistochemisch konnte der Verlust von p16 in allen basoloiden PEK festgestellt werden. Das entscheidende Merkmal der basoloiden PEK waren Alterationen des p16-Genes. Im Gegensatz dazu zeigte nur die Hälfte aller nichtbasoloiden PEK einen Verlust der Heterogenität bei den verschiedenen Mikrosatelliten Markern. Interessanterweise konnte durch PCR-Analyse bei allen basoloiden PEK DNA des humanen Papillomavirus (HPV) gefunden werden. Bei den nichtbasoloiden PEK wurden nur in 17% der Fälle HPV-DNA nachgewiesen (Poetsch et al., 2003).

Interessanterweise belegen unterschiedliche Studien, dass auch eine erhöhte p16-Expression entweder als Folge einer Amplifikation protoonkogener Faktoren (CDK4, E2F) oder als Folge einer Alteration der Tumorsuppressoren (z.B. Rb) in der Regulationsbahn INK4a-CDK4(6)-Rb-E2F (Johnson, 1995; Lukas et al., 1995, Emig et al., 1998; Shintani et al., 2000) von Bedeutung für die Tumorprogression sind. Demnach weisen Fälle mit p16-Überexpression Rb-Alterationen im Sinne einer Rückkoppelung auf. Studien an Zervixkarzinomen (Keating et al., 2001; Klaes et al., 2001) und oralen Karzinomen (Klussmann et al., 2003) zeigten, dass die

Überexpression von p16 sowohl mit der Präsenz einer Hochrisiko-HPV-Infektion als auch mit der HPV E6/E7-mRNA Expression korreliert (Klaes et al., 2001; Keating et al., 2001; Riethdorf et al., 2002; Klussmann et al., 2003). Humane Papillomaviren gelten als Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen. Die HPV-Typen 16 und 18 sind die häufigsten Hochrisiko-Typen. Die bedeutende Rolle dieser onkogenen Typen für die Entstehung von Karzinomen der Zervix (nahezu 100% HPV positiv) ist anerkannt.

In der vorliegenden Studie zeigten 80% (8/10) der MM in den lokoregionalen Lymphknoten eine positive Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper gegen p16-Protein, davon waren 62,5% (5/8) mäßig positiv und 12,5% (1/8) schwach positiv. Lediglich 10% zeigten keine p16-Expression.

5.4.4 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ist ein Protoonkogen. Er nimmt in der Regulation von normalen zellulären Prozessen und als Onkogen in der Pathophysiologie von hyperproliferativen Erkrankungen wie beispielsweise Krebserkrankungen eine Schlüsselrolle ein. EGFR (erbB1) gehört zur erbB-Familie. Es ist ein Transmembranglykoprotein und besitzt Tyrosinkinaseaktivität. Die Aktivierung von EGFR durch EGF induziert eine starke Autophosphorylierung des EGFR sowie die Phosphorylierung verschiedener Zytoskelett-assoziiierter Proteine. Es kommt unter anderem zur Stimulierung der ras/raf-1/mitogenaktivierten Proteinkinase, der Phosphatidylinositol-3-Kinase und des Phospholipase-C γ -Signalweges. Die Aktivierung dieser Kaskaden endet mit der Transkription von Genen, die für das koordinierte Zellwachstum verantwortlich sind (Quon et al., 2001; Ford und Grandis, 2003). Eine Überexpression von EGFR wurde bei unterschiedlichen Tumorentitäten entdeckt, z.B. Brustkrebs, Lungenkrebs und besonders häufig bei oralen PEK (Ke et al., 1998; Howell und Grandis, 2005).

In einigen Studien an oralen PEK konnte eine Korrelation zwischen der Überexpression von EGFR und dem Überleben der Patienten festgestellt werden. Maurizi et al. (1996) beobachteten bei 74 Patienten mit operativ behandelten Larynxkarzinomen, dass die 2-Jahres-rezidivfreie-Überlebensrate für Patienten mit EGFR-positiven Karzinomen 58% im Gegensatz zu 82% bei Patienten mit EGFR-negativen Karzinomen betrug. Dassonville et al. (1993) bestätigten in einer prospektiven Studie an 109 Patienten, die chemotherapeutisch behandelt wurden,

die prognostische Relevanz der Überexpression von EGFR. Unabhängig vom Tumorstadium wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Überexpression von EGFR und einer ungünstigen Überlebensrate sowie dem ansteigenden Rezidiv-Risiko bestätigt. Wen et al. (1996) fanden keinen Zusammenhang zwischen der Überexpression von EGFR und dem Überleben der 68 untersuchten Larynxkarzinom-Patienten. In einer aktuellen Studie wiesen 92,3% (48/52) der oralen PEK eine EGFR-Expression auf und 63,4% (33/52) der oralen PEK zeigten eine Überexpression von EGFR. Ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von EGFR und den klinischen Faktoren wie Tumorstadium, regionale Lymphknotenmetastasierung oder Fernmetastasierung konnte nicht gefunden werden. Zwischen Tumorinvasion und EGFR-Überexpression wurde eine statistisch signifikante Korrelation gefunden (Hiraishi et al., 2006).

Über die EGFR-Expression in Lymphknotenmetastasen gibt es bisher kaum Studierhebungen. Takes et al. (2001) fanden heraus, dass die Expression von EGFR in oralen Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen ähnlich waren. Während sich in 60% der PEK und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen EGFR nicht nachweisen ließ, konnte eine EGFR-Expression in 15% der untersuchten 47 PEK und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Nur bei 12/47 (26%) Patienten wurde eine Diskordanz zwischen PEK und Lymphknotenmetastasen festgestellt. Bei 42% der 12 Patienten konnte in den Lymphknotenmetastasen eine Expression von EGFR nachgewiesen werden, obwohl ihre korrespondierenden PEK kein EGFR produzierten. In der vorliegenden Studie konnte sowohl bei den untersuchten MM als auch bei den korrespondierenden Primärtumoren (unpublizierte Daten, Dr. S. Riethdorf) EGFR zu 100% immunhistochemisch nachgewiesen werden. Eine Überexpression von EGFR konnte in 67% der MM gefunden werden. Ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von EGFR der MM und ihrer Primärtumoren und klinischer Faktoren oder dem Überleben der Patienten konnte jedoch aufgrund der geringen Fallzahl und der Heterogenität der untersuchten Fälle nicht hergestellt werden.

Interessanterweise ist die Expression von EGFR sowohl in Primärtumoren als auch in Lymphknotenmetastasen nachweisbar. Die genaue Bedeutung für die Kanzerogenese und die Metastasierung müssen jedoch noch aufgeklärt werden, um EGFR gezielt in neuen molekularen Krebstherapien zu inhibieren.

5.4.5 EMMPRIN

EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloprotease inducer*) wird u.a. von Tumorzellen exprimiert und stimuliert die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in den Fibroblasten in der Umgebung des Tumorgewebes. EMMPRIN ist ein glykosyliertes Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. In vitro Studien demonstrierten, dass natürliches und rekombinantes EMMPRIN die Expression von MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP14 und MMP15 sowie MT1-MMP induzieren kann (Kataoka et al., 1993; Dalberg et al., 2000). Eine kürzlich publizierte TMA (Tissue Microarray)-Studie an 129 verschiedenen Tumortypen zeigt, dass PEK EMMPRIN in 80-100% der untersuchten Fälle exprimieren. Orale PEK der Mundhöhle waren in 96% und PEK des Larynx in 89% EMMPRIN-positiv (Riethdorf et al., 2006). Aber auch nicht neoplastisch verändertes Gewebe produziert EMMPRIN, z.B. basale epitheliale Zellen, Lymphoblasten und Lymphozyten, bestimmte neuronale Zellen im Cerebellum und Cerebrum sowie Herzmyozyten des linken Ventrikels. Diese Befunde sind beispielsweise vereinbar mit bekannten Funktionen von EMMPRIN in der Regulation von Adhäsionsvorgängen, der Immunzellaktivierung oder Zell-Zell-Wechselwirkungen im Nervensystem.

Eine starke EMMPRIN-Expression konnte insbesondere in PEK nachgewiesen werden (Riethdorf et al., 2006). Weiteren Untersuchungen an primären Mammakarzinomen zufolge korreliert die Expression von EMMPRIN signifikant mit verschiedenen Risikofaktoren wie beispielsweise einer schlechten Differenzierung, der zunehmenden Tumorgröße, dem negativen Rezeptorstatus und dem Tumorspezifischen Überleben (Reimers et al., 2004). Weiterhin wurde bei MM von Knochenmarkszellen die Expression von EMMPRIN zu 89% nachgewiesen, interessanterweise unabhängig von der EMMPRIN-Expression des Primärtumors (Reimers et al., 2004). Klein et al. (2002) untersuchten mittels Genomanalyse einzelne mikrometastatische Zellen des Knochenmarks auf die Expression von EMMPRIN. Sie wiesen bei 82% der CK+(A45/B3) Zellen das Protein EMMPRIN nach. EMMPRIN scheint eine maßgebende Rolle in der Frühmetastasierung zu spielen, da es sowohl in Primärtumoren als auch in DTZ/MM des Knochenmarks bzw. der Lymphknoten sehr häufig nachweisbar ist. Die MM der Lymphknoten in der vorliegenden Studie exprimierten alle EMMPRIN, wobei 30% der MM sogar eine mäßige Überexpression aufwiesen. Interessanterweise befanden sich zwei der Primärtumoren, von denen Lymphknotenmetastasen mit hoher EMMPRIN-

Expression nachgewiesen wurden, im Tumorstadium T3 und T4 mit Differenzierungsgrad G2 und G3 und zeigten ebenfalls eine gesteigerte EMMPRIN-Produktion. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen zunehmender Tumorgröße, Differenzierung der Tumoren und der gesteigerten EMMPRIN-Expression auch bei oralen/oropharyngealen Tumoren zu geben scheint.

5.4.6 Metalloproteinasen 1/ 2

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gehören der Familie der Zink-enthaltenen Endopeptidasen an, die für die Degradierung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Chambers und Matrisian, 1997). Type 1 Kollagenase (MMP-1) spaltet fibrilläres Kollagen. Dies ist wichtig für die Tumorausbreitung im Extrazellulärraum. MMP-2, eine 72 kDa Type 4 Kollagenase, spaltet Type 4 Kollagen, welches in allen Membranen präsent und an der Invasion von Tumoren beteiligt ist (Pyke et al, 1992). MMP fördern das Fortschreiten des Tumorwachstums durch Spaltung diverser Substratgruppen. Neben den strukturellen Komponenten der extrazellulären Matrix zählen auch das *growth-factor-binding-protein*, *growth-factor-precursors*, Tyrosinkinaserzeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und andere Proteinasen zu den MMP-Substraten. Die Expression von MMP ist bei den meisten malignen Tumoren erhöht und korreliert mit einem fortgeschrittenen Stadium, der Invasion, der Metastasierung und einer schlechten Prognose (Coussens et al., 2002, Egeblad und Werb, 2002). MMP-1 wurde in den Fibroblasten des Tumorstromas und bei Lymphknotenmetastasen in Fibroblasten-ähnlichen Zellen beobachtet. Normale orale Mukosa zeigte sich MMP-1 negativ. MMP-2 wurde nur in den peripheren Fibroblasten detektiert, die das neoplastische Gewebe und Lymphknotenmetastasen umgeben. Metalloproteinasen sind von großer Bedeutung für die Ausbreitung der Primärtumoren und Metastasen (Sutinen et al., 1998). In der vorliegenden Analyse konnte MMP-2-mRNA nur in Stromazellen nachgewiesen werden. Untersuchungen an größeren Fallzahlen müssen zeigen, ob es durch Befall der Lymphknoten mit Tumorzellen zu einer verstärkten MMP-2-Produktion in dem Lymphknoten umgebenden Stroma kommen kann. MMP-1-mRNA hingegen wurde in 5/6 Lymphknotenmikrometastasen detektiert und in einigen Fällen sogar mit starker Intensität. Auch hier ist es interessant zu untersuchen, ob Primärtumoren mit starker MMP-1-Expression mit höherer Frequenz einer Lymphknotenmetastasierung und –

mikrometastasierung assoziiert sind. Hierzu müssten jedoch Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl durchgeführt werden.

5.4.7 EpCAM

Ep-CAM (*Epithelial cell adhesion molecule*, auch 17-1A Antigen, EGP40 oder GA733-2 genannt) ist ein Transmembran-Glykoprotein, das die Cadherin vermittelten Zell-Zell-Interaktionen moduliert (Litvinov et al., 1997, Balzar et al., 1999). Physiologischerweise wird Ep-CAM im adulten menschlichen Gewebe ausschließlich in basolateralen Zellmembranen von Drüsengewebe und Übergangsepithelien gebildet. Normales Plattenepithel ist Ep-CAM negativ (Balzar et al., 1999). Im Rahmen der Karzinogenese wird Ep-CAM interessanterweise von Plattenepithelien der Mundhöhle und der Lunge „neu“ gebildet. Die Expression steigert sich mit fortschreitender Transformation von der Dysplasie zum invasiven Karzinom (Winter et al., 2003). Obwohl die biologische Rolle von Ep-CAM für gesundes und maligne transformiertes Gewebe noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnte in verschiedenen Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten eine Überexpression beobachtet werden, die mit der schlechten Prognose beispielsweise für Mammakarzinome (Gastl et al., 2000) und Ösophaguskarzinome (Stoecklein et al., 2006) assoziiert ist. In weiteren Studien an Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen (Kuboschok et al., 1999; Passlick und Pantel, 2000) korrelierte die Detektion von DTZ/MM in Lymphknoten mittels Ep-CAM mit einem schlechteren Gesamtüberleben. In DTZ/MM des Knochenmarkes und des Blutes konnte im Gegensatz dazu eine verminderte Expression von EpCAM beobachtet werden (Rao et al., 2005; Thurm et al., 2003). Auch Takes et al. (1997) beobachteten eine Korrelation zwischen dem Verlust der Expression von EpCAM und der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Ein Vergleich der Expression von EpCAM von Primärtumoren mit den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen konnte aufzeigen, dass 29% (14/49) der oropharyngealen Primärtumoren und nur 14% (7/49) der Lymphknotenmetastasen EpCAM positiv waren (Takes et al., 2001). In der vorliegenden Untersuchung konnte die Expression von EpCAM in keiner MM nachgewiesen werden. Eine in vitro Studie zeigte, dass die Überexpression von EpCAM zu einer Abnahme der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion und damit zur Abtrennung von EpCAM-positiven Zellen von der ursprünglichen Zellpopulation führte (Litvinov et al., 1997). Möglicherweise führt dieses Phänomen in vivo zur

Entwicklung von Metastasen. Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren in vitro-Studie an Kolorektalkarzinomen nachgewiesen werden, dass eine hohe Expression von EpCAM das metastatische Potential reduziert (Basak et al., 1998). Zusammenfassend scheint die Expression von EpCAM in Metastasen verglichen mit dem Primärtumor häufiger reduziert als ansteigend zu sein (Takes et al., 2001).

5.5 Klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen

In verschiedenen Studien konnten DTZ/MM in Lymphknoten und im Knochenmark mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern mittels Immunhistochemie oder der RT-PCR in vielen verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden.

Die klinische Signifikanz von DTZ/MM in Lymphknoten ist nach wie vor ungeklärt. Einige Autoren berichten, dass es keinen Einfluss von DTZ/MM auf die Prognose gibt (Sato et al., 2001; Woolgar, 1999b). In einer Studie von Yoshida et al. (2005) an oralen PEK fand sich keine Korrelation zwischen der Präsenz von Lymphknotenmikrometastasen und dem rezidivfreien sowie dem Gesamtüberleben für diese Patienten.

Im Gegensatz dazu haben andere Studien an anderen Tumorentitäten wie beispielsweise Mamma- (International Breast Cancer Study Group, 1990), Kolon- (Greenon et al., 1994), Magen- (Maehara et al., 1996), Ösophagus- (Izbicki et al., 1997) und Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Passlick et al., 1994) demonstriert, dass die Detektion von DTZ/MM in histopathologisch negativ eingestuften Lymphknoten für die Prognose relevant ist.

In einer Studie an Lymphknoten von Ösophaguskarzinompatienten wurden in 50% (15/30 Patienten) der Fälle DTZ/MM mit Hilfe des Ber-EP4- Antikörpers (gegen EpCAM (*epithelial cell adhesions molecule*) gerichtet) an histopathologisch negativ eingestuften Lymphknoten nachgewiesen. Patienten mit Lymphknoten-DTZ/MM wiesen ein reduziertes tumorfreies Überleben und Gesamtüberleben auf (Izbicki et al., 1997). Interessanterweise zeigten diese Patienten einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie die Patienten mit bereits anhand der H&E Färbung detektiertem histopathologisch positiven Lymphknotenstatus. Wiesen Patienten mit regionalem Lymphknotenbefall zusätzlich DTZ/MM in anderen Lymphknoten auf, die zuvor bereits histopathologisch als tumorfrei eingestuft waren, so ergab sich ein kürzeres tumorfreies Überleben sowie Gesamtüberleben. Es ist nicht bekannt, ob DTZ/MM Ausgangspunkt für eine nachfolgende Metastasierung sind oder aber

DTZ/MM bereits die Konsequenz eines fortgeschrittenen Tumorleidens darstellen (Izbicki et al., 1997). In Anlehnung an Paget's „*seed and soil*“ Hypothese sind Tumorzellen für die Proliferation auf ein bestimmtes Umgebungsmilieu angewiesen, beispielsweise sind die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren sowie die Fähigkeit der einzelnen Tumorzellen, mit diesen zu korrespondieren, erforderlich (Paget, 1889). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang keine Korrelation zwischen Ber-EP4 (EpCAM) positiven Tumorzellen und der lymphovaskulären Infiltration gefunden werden (Passlick et al., 1994). Daraus lässt sich schließen, dass nicht alle DTZ/MM die das lymphatische System erreichen, in der Lage sind, in den Lymphknoten Metastasen zu etablieren.

In einer Untersuchung an Lymphknoten von Magenkarzinompatienten konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DTZ/MM und einer schlechteren Prognose gefunden werden. Bei 34 Patienten wurden aufgrund des immunhistochemischen Nachweises von Lymphknotenmetastasen die Tumoren neu eingestuft. Die Patienten mit CK-positiven Zellen in den Lymphknoten hatten nachweislich eine bis zu 50% schlechtere Überlebensrate im Gegensatz zu den Patienten ohne nachweisbare DTZ/MM (3,3 Jahre für Patienten mit CK-positiven Zellen versus 6,6 Jahre für Patienten ohne Nachweis von DTZ/MM) (Maehara et al., 1996). Theoretisch ließe sich aus diesen Studien schlussfolgern, dass eine ausgedehnte radikale Lymphadenektomie die Prognose der Patienten verbessern könnte. In prospektiven Studien an Magen-(Bonenkamp et al., 1999) und Nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (Izbicki et al., 1994) konnte diese Vermutung interessanterweise nicht bestätigt werden. Vielmehr gilt die Anwesenheit von DTZ/MM als Indikator für eine generalisierte Erkrankung dieser Patienten, die auch durch radikale Lymphadenektomie nicht geheilt werden können (Izbicki et al., 2002). Die Beobachtung, dass die Anwesenheit von DTZ/MM in Lymphknoten einen prognostischen Einfluss auf die Entwicklung von Fernmetastasen bei Magen- (Maehara et al., 1996), Ösophagus- (Izbicki et al., 1997) und Nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (Passlick et al., 1994) hat, unterstützt diese Aussage. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig die Evaluierung der Lymphknoten auf der Basis von DTZ/MM ist, um das Risiko für ein weiteres Tumorwachstum abschätzen und um weitere adjuvante Therapien rechtzeitig einleiten zu können.

Hosch et al. (2000) untersuchten in einer weiteren Studie die biologische Relevanz von DTZ/MM in Lymphknoten von Ösophaguskarzinompatienten. Eine aus einem

histopathologisch als metastasenfrem, immunhistochemisch jedoch als DTZ/MM-positiv eingestuftem Lymphknoten etablierte Tumor-Zelllinie zeigte neben den charakteristischen Merkmalen maligner epithelialer Tumorzellen auch nach Transplantation in eine immunsupprimierte Maus tumorgenetische und metastatische Eigenschaften.

Auch die Bedeutung von DTZ/MM im Knochenmark ist noch nicht vollständig aufgeklärt, so wurden in einer Studie von Braun et al. (2000a) in 36% (199/ 552 Mammakarzinompatientinnen) der Fälle CK-positive Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom im Tumorstadium I, II und III detektiert. Interessanterweise wurde nach einer Beobachtungszeit von 38 Monaten festgestellt, dass die Todesrate bei Patientinnen mit nachgewiesenen DTZ/MM im Knochenmark bei 25% lag im Gegensatz zu 6% bei den Patientinnen ohne DTZ/MM. Patientinnen mit histopathologisch negativ eingestuftem Lymphknoten und DTZ/MM im Knochenmark wiesen eine ähnliche Überlebensrate auf wie Patientinnen mit histopathologisch positiven Lymphknoten, aber ohne CK-positive Zellen im Knochenmark. In einer weiteren Analyse von Braun et al. (2005) wurde aus neun verschiedenen Studien die 10-Jahres-Überlebensrate von 4703 Patienten mit Mammakarzinomen im Stadium I, II und III evaluiert. Es hatten nachweislich 30,6 % der Frauen DTZ/MM im Knochenmark. Die Anwesenheit der DTZ/MM war ein unabhängiger signifikanter Prognosefaktor für ein schlechteres Gesamtüberleben. 807 Patienten hatten Mammakarzinome mit einer Tumorgöße von kleiner als 2 cm im Durchmesser, ohne Lymphknotenmetastasierung und ohne DTZ/MM im Knochenmark. Diese Patientengruppe erhielt keine zusätzliche systemische adjuvante Therapie und zeigte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 94%. Bemerkenswerterweise war der Nachweis von zusätzlich detektierten DTZ/MM im Knochenmark in der Geringen-Risiko-Mammakarzinom-Patientinnen-Gruppe mit einer steigenden Mortalität und einem erhöhten Risiko an der Entwicklung von Fernmetastasen in den ersten 5 Jahren assoziiert. Es wäre sinnvoll, das weitere therapeutische Management in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Abwesenheit von DTZ/MM zu entscheiden. So sollten beispielsweise Patienten mit pT1N0 Karzinomen und zusätzlichen DTZ/MM im Knochenmark eine zusätzliche adjuvante Therapie erhalten (Braun et al., 2005).

Die Patientengruppe in der vorliegenden Studie war zu heterogen und zu klein, um eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von MM und der prognostischen Relevanz zu erheben. Trotz allem 67% der Patienten mit immunhistochemisch detektierten MM verstarben. Die Hälfte dieser 67% betraf Patienten mit Karzinomen ohne pathologisch nachweisbare Lymphknotenmetastasierung (N0). Diese Aussage unterstützt die Bedeutung von MM als Prognosefaktor für das weitere therapeutische Management. Es ist notwendig, in zukünftigen Studien ein größeres, homogenes Patientenkollektiv zu untersuchen, um die genaue Bedeutung der DTZ/MM zu erfassen.

Interessanterweise erleiden auch Patienten mit kompletter Remission in bis zu 25% einen systemischen Rückfall. Das könnte auf die Wirksamkeit etablierter Chemotherapien zurückzuführen sein. Chemotherapeutika greifen primär proliferierende Zellen an, wohingegen vermutlich nicht-proliferierende Zellen als *dormant cells* überdauern und sich dem therapeutischen Angriff entziehen können. So konnten im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen aus einer Hochrisiko-Gruppe trotz chemotherapeutischer Behandlung, auch in hohen Dosen, nicht alle DTZ/MM eliminiert werden. Biologische Therapieansätze, z.B. mit Antikörpern, die auch bei nicht-proliferierenden Tumorzellen eine Wirkung erzielen, scheinen konventionelle Chemotherapien sinnvoll zu ergänzen (Braun et al., 2000b; Kasimir-Bauer et al., 2001). In einer Studie erhielten Mammakarzinompatientinnen systemisch mAk 17-1A, der gegen das 17-1A-Antigen (EpCAM) gerichtet ist. Dadurch verringerten sich im Knochenmark die durchschnittliche Anzahl von DTZ/MM sowie die durchschnittliche Anzahl 17-1A-Antigen-positiver DTZ/MM (Braun et al., 1999). Auch Rietmüller et al. (1994) beobachteten Patienten mit Kolorektalkarzinomen im Stadium UICC III nach R0-Resektion, die postoperativ adjuvant mit 5 Infusionen mAK 17-1A therapiert wurden. Die mit mAK behandelten Patienten hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Letalität und der Fernmetastasen im 5-Jahres-Verlauf. Engebraaten et al. (2000) injizierten Ratten Zellen von Mammakarzinomzelllinien, um eine hämatogene Aussaat von Tumorzellen zu stimulieren. Die anschließende Verabreichung von mAk gegen verschiedene Zielantigene der Tumorzellen, die mit sogenannten Immunotoxinen gekoppelt waren, hemmte die Ausbildung von Metastasen deutlich (Engebraaten et al., 2000).

Die vollständige Elimination aller DTZ/MM ist limitiert durch die große Heterogenität solider Tumoren und ihrer DTZ/MM. So zeigen DTZ/MM im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen ein heterogenes Expressionsmuster, so dass monovalente Therapien nur bedingt wirksam sind (Braun et al., 1999). Für die Entwicklung neuer adjuvanter Therapieverfahren ist die Verfügbarkeit von mehreren molekularen Markern notwendig. Dabei ist zu beachten, dass Primärtumoren nicht generell die gleichen molekularen Marker exprimieren wie ihre korrespondierenden DTZ/MM. In mehreren Studien wurde eine signifikante Anzahl an Patienten mit Her2-negativen Primärtumoren, die während des Tumorprogresses hohe Konzentrationen an extrazellulärem Her2 im Serum entwickelten, gefunden (Andersen et al., 1995; Molina et al., 1996; Meng et al., 2004). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Her2-Genamplifikation während der Tumorentstehung erworben wird. Es müssen mittels Immunhistochemie oder molekularer Methoden Verfahren entwickelt werden, die das Antigenexpressionsmuster der DTZ/MM einzelner Patienten erfassen, um individuell abgestimmte Therapien zu ermöglichen. Die Verabreichung einer Kombination von verschiedenen Antikörpern, die auf das individuelle Antigenexpressionsmuster abgestimmt sind, würde die Effektivität der Therapie erhöhen (Braun et al., 1999b). Werden EMMPRIN und EpCAM beispielsweise von den DTZ/MM exprimiert, so könnte ein gegen diese Antigene gerichteter Antikörpercocktail gezielt eingesetzt werden. Dabei muss natürlich berücksichtigt werden, dass diese Marker nicht tumorspezifisch sind und somit auch normale Zellen angegriffen werden können.

6 Zusammenfassung

Literaturdaten zufolge verschlechtert sich die Prognose oraler/oropharyngealer Karzinome durch das Auftreten von Lymphknotenmetastasen deutlich. In 10-26 % der Fälle kommt es trotz metastasenfreier lokoregionärer Lymphknoten zu Fernmetastasen. Dafür verantwortlich sind möglicherweise okkulte Lymphknotenmetastasen, die sich aufgrund ihrer geringen Größe der klinischen und pathologischen Routine-Diagnostik entziehen. Einerseits kommen dafür Mikrometastasen (MM) mit einer Größe zwischen $> 0,2$ mm und < 2 mm in Frage. Andererseits können es vielleicht auch noch kleinere Tumorzellcluster oder disseminierte Tumorzellen (DTZ) sein, die diagnostisch nicht erfasst werden, aber wichtiges Zeichen einer metastatischen Aussaat sind. Die prognostische Relevanz von MM/DTZ in lokoregionären Lymphknoten oraler/oropharyngealer Karzinome ist bisher unklar, und es gibt auch keine sicheren Daten über die Häufigkeit. Wichtige Zielstellung der vorliegenden Arbeit war deshalb, für künftige Studien zu prüfen, wie sich MM/DTZ in lokoregionären Lymphknoten reproduzierbar nachweisen lassen.

Zunächst wurden mittels Immunhistochemie die Pan-CK-Antikörper AE1/AE3 und 34 β E12 mit unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Methoden (Vorbehandlungen, verschiedene Inkubationszeiten, manuelle contra automatische Färbung, verschiedene Nachweissysteme) an Primärtumoren getestet, um einen reproduzierbaren Nachweis von Tumor-Einzelzellen zu erreichen. Aufgrund folgender Kriterien wurde die Immunreaktion ausgewertet:

1. Alle konventionell zytologisch als Tumorzellen identifizierbaren Zellen müssen eine Immunreaktion zeigen.
2. Die Intensität der Immunreaktion muss reproduzierbar und mäßig bis stark sein.
3. Die Zellen müssen klar abgrenzbar sein.

Der monoklonale Pan-CK-Antikörper erwies sich zur Erfassung von DTZ/MM für die weitere Untersuchung an den tumorfreien Lymphknoten von Patienten mit Lymphknotenstatus pN0 und pNx als am besten geeignet.

Von 78 untersuchten Patienten mit oralen/oropharyngealen PEK wurden 667 Formalin fixierte zervikale Lymphknoten, die in 244 Paraffinblöcken eingebettet waren, auf die Anwesenheit von CK-positiven Zellen untersucht. Von jedem

Paraffinblock wurden jeweils vier Stufenschnitte im Intervall von 150 µm angefertigt und mit dem Pan-CK-Antikörper 34βE12 (DAKO, Hamburg, Germany) im automatischen System (DAKO Cytomation) immunhistochemisch behandelt. Anschließend wurden die Lymphknotenpräparate manuell am Lichtmikroskop ausgewertet. Die CK-positiven Lymphknoten wurden phänotypisch noch weiter charakterisiert.

Insgesamt konnten bei 9/76 (11,5%) untersuchten Patienten MM detektiert werden, davon bei 5 Patienten mit primär als metastasenfrei eingestuften Karzinomen. Vier der Patienten wiesen zuvor bereits einen positiven Lymphknotenstatus (von pN1-pN2b) auf. Es konnte die Tendenz beobachtet werden, dass mit steigendem Lymphknotenstatus die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von MM zunimmt. Es gab keinen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von MM und dem Tumorstadium, dem Grad der Differenzierung, der Lokalisation des Primärtumors, dem Geschlecht oder Alter.

MM sind durch eine immunhistochemische Analyse mit dem Pan-CK-Antikörper 34βE12 im automatischen System zuverlässig detektierbar. Das ist eine sehr wichtige Information für künftige neue Konzepte in der pathologischen Routinediagnostik. Aufgrund der kleinen untersuchten Fallzahl ist keine Aussage zur prognostischen Relevanz der detektierten MM möglich. Die Daten können jedoch als solide Basis für eine umfangreichere Studie zur prognostischen Relevanz von MM dienen.

7 Literaturverzeichnis

Alvi A, Johnson JT: Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head and Neck* 19: 500-505, 1997

Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U: Micrometastasis in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing and prognostic value of depth of invasion. *Head and Neck* 17: 473-479, 1995

Andersen TI, Paus E, Nesland JM, McKenzie SJ, Borresen AL: Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. Relationship to ERBB2 gene amplification and c-erbB-2 protein overexpression in tumour. *Acta Oncol* 34: 499-504, 1995

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV: The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). *J Mol Med* 77: 699-712, 1999

Barrera JE, Miller ME, Said S, Jafek BW, Campana JP, Shroyer KR: Detection of occult micrometastases in patients with head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* 113 (5): 892-896, 2003

Basak S, Speicher D, Eck S, Wunner W, Maul G, Simmons MS, Herlyn D: Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *N Natl Cancer Inst* 90: 691-697, 1998

Bernards R, Weinberg RA: A progression puzzle. *Nature* 418: 823; 2002

Bettelheim R, Price KN, Gelber RD, Davis BW, Castiglione M, Goldhirsch A, Neville AM: Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group *Lancet* 335: 1565-1568, 1990

Blot JW, DeVessa SS, McLaughlin JK: Oral and pharyngeal cancer. *Cancer Surv* 19: 23-45, 1994

Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie. 3. Auflage Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH München, S.640-656, 2004

Boeninghaus HG, Lenarz TH: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, 12.Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005

Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, van de Velde CJ: Extended lymph-node dissection for gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group. *N Engl J Med* 340: 908-914, 1999

Borgen E, Pantel K, Schlimok G, Müller P, Otte M, Renolen A, Ehnle S, Coith C, Nesland JM, Naume B: A european interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. *Clin Cytometry* 70B: 400-409, 2006

Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 42: 19-38, 1992

Braun S, Pantel K: Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treatment* 52: 201-216, 1998

Braun S, Hepp F, Kantenich CRM, Janni W, Pantel K, Riethmüller G, Willegroth F, Sommer HL: Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 5: 3999-4004, 1999

Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K: Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implication for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer* 84: 1-5, 1999b

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med* 342: 525-533, 2000a

Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K: Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18: 80-86, 2000b

Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F: Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 19: 1468-1475, 2001

Braun S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vinent-Salamon A, Pantel K: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353: 793-802, 2005

Brennan JA, Mao L, Hruban RH et al: Molecular assessments of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332: 429-435, 1995

Buckley JG, MacLennan K: Cervical node metastases in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution. *Head and Neck* 22: 380-385, 2000

Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, Parkinson EK: Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 67 : 1274-84, 1993

Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schawb D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D: Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265 (5170): 415-417, 1994

Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW: Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *J Surg Oncol* 67: 194-202, 1998

Callery CD, Spiro RH, Strong EW: Changing trends in the management of squamous cell carcinoma of the tongue. *Am J Surg* 148: 449-454, 1984

Cerezo L, Millan I, Torre A, Argon G, Otero J: Prognostic factors of survival and tumor control in cervical lymph node metastases from head and neck cancer. A multivariate study of 492 cases. *Cancer* 69 (5): 1224-1234, 1992

Chambers AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270, 1997

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572, 2002

Clausen H, Vedtofte P, Moe D, Dabelsteen E, Sun TT, Dale B: Differentiation-dependent expression of keratins in human oral epithelia. *J Invest Dermatol* 86: 249-254, 1986

Cooper D, Schermer A, Sun TT: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications and limitations. *Lab Invest* 52: 243-256, 1985

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science (Wash. DC)* 295:2387-2392, 2002

Cristofanilli M, Budd G, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF : Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351: 781-791, 2004

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW: Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 1420-1430, 2005

Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Backdahl M: Gelatinase A, membrane type I matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 24: 334-340, 2000

Das BR, Nagpal JK: Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 8 (11): 258-267, 2002

Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, Demard F, Milano G: Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract. *J Clin Oncol* 11: 1873-1878, 1993

Diel IJ: Bone marrow staging for breast cancer: is it better than axillary node dissection. *Semin Oncol* 28: 236-244, 2001

Di Martino E, Rieger M, Hassan H, Hausmann R, Reinecke T, Lohmann M, Westhofen M: Zur Problematik multipler primärer Karzinome bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignomen. *Laryngo-Rhino-Otologie* 79: 711-718, 2000 a

Di Martino E, Nowak B, Krombach G, Sellhaus B, Hausmann R, Crenmerius U, Büll U, Westhofen M: Ergebnisse der prätherapeutischen Lymphknotendiagnostik bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otologie* 79: 201-206, 2000 b

Don D, Anzai Y, Lufkin RB, Fu Y-S, Calcaterra TC: Evaluation of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 105: 669-674, 1995

Duffy MJ: Cancer metastasis: biological and clinical aspects. *Ir J Med Sci* 167: 4-8, 1998

Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174, 2002

Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP: Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer* 78: 1661-1668, 1998

Endo K, Kohnoe S, Okamura T, Haraguchi M, Nishiyama K, Toh Y, Baba H, Maehara Y: Evaluation of endoscopic mucosal resection and nodal micrometastasis in pN0 submucosal gastric cancer. *Oncol Rep* 13 (6): 1059-1063, 2005

Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Black MJ, Rochon L: Occult cervical metastases: Immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120: 713-717; 1999

Engebraaten O, Sivam G, Juell S, Fodstad O: Systemic immunotoxin treatment inhibits formation of human breast cancer metastasis and tumor growth in nude rats. *Int J Cancer* 88: 970-976, 2000

Etges A, Pinto DS, Kowalski LP, Soares FA, Araujo VC: Salivary duct carcinoma: immunohistochemical profile of an aggressive salivary gland tumour. *J Clin Pathol* 56(12): 914-918, 2003

Ewing J: Neoplastic Diseases. 6.Auflage, Philadelphia: WB Saunders, 1928

Feinmesser R, Freemann JL, Feinmesser M, Noyek A, Mullen JB: Role of modern imaging in decision-making for elective neck dissection. *Head and neck* 14: 173-176, 1992

Ferlito A, Shana AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V: Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL* 63: 202-207, 2001

Fidler IJ, Kripke ML: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197: 893-895, 1977

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: Head and neck cancer. Review Article. *N Engl J Med* 345 (26): 1890-1900, 2001

Ford AC, Grandis JR: Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head and Neck* 25: 67-73, 2003

Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP: Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 166: 360-365, 1993

Franceschi S, Levi V, La Vecchia C, Conti E, Dal Maso L, Barzan L, Talamini R: Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 83: 1-4, 1999

Franke WW, Moll R: Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 and 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes, tonsils and spleen. *Differentiation* 36 (2): 145-163, 1987

Fréneaux P, Nos C, Vincent- Salomon A, Genin P, Sigal- Zafrani B, Al Ghuzlan A, Birolini MJ, Clough K, Sastre- Garau X : Histological detection of minimal metastatic involvement in axillary sentinel nodes: a rational basis for a sensitive methodology usable in daily practice. *Modern Pathology* 15: 641-646, 2002

Friedl P, Wolf K: Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 3: 362-374, 2003

Gadducci A, Ferdeghini M, Buttitta F, Fanucchi A, Annicchiarico C, Prontera C, Bevilacqua G, Genazzani AR: Preoperative serum antibodies against the p53 protein in patients with ovarian and endometrial cancer. *Anticancer Res* 16: 3519-3524, 1996

Garewal H: Antioxidants in oral cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 62: 1410S- 1416S, 1995

Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G: Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet* 356: 1981-1982, 2000

Gath HJ, Brakenhoff RH: Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 18: 109-126, 1999

Gath HJ, Heissler E, Hell B, Bier J, Riethmüller G, Pantel K: Immunocytologic detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Int J Oral Maxillofac Surg* 24: 351-355, 1995

Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K: Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 19 (4): 960-971, 2001

Glickman JN, Torres C, Wang HH, Turner JR, Shahsafaei A, Richards WG, Sugarbaker DJ, Odze RD: The prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 85 (4): 769-778, 1999

Gonzalez MV, Pello MF, Lopez-Larrea C, Suarez C, Menendez MJ, Coto E: Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 50: 509-512, 1997

Greenon JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW : Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 73: 563-569, 1994

Grimm G :Geschwülste im Mund- und Kieferbereich. In: Schwenzer N, Grimm G, Hrsg. *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Spezielle Chirurgie* , Band 2 , 2. Auflage. Stuttgart : Thieme, 253-357 , 1990

Gusterson B, Ott R: Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer (letter). *Lancet* 336: 434-435, 1990

Hall PA, Lane DP: P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? – revisited. *J Pathol* 172: 1-4, 1994

Hamakawa H, Takemura K, Sumida T, Kayahara H, Tanaka H, Sogawa K: Histological study on pN upgrading of oral cancer. *Virchows Arch* 437: 116-121, 2000

Hannahs KJ, Hooper JA, Sigler A: Nursing care of the head and neck cancer patient. In: Suen JY, Myers EN (eds) *Cancer of the Head and Neck*. Churchill Livingstone, New York, pp 839, 1981

Hardisson D: Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260: 502-508, 2003

Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LWW: Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12 (14): 4218-4224, 2006

Hermanek P, Sobin LH: International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumors. 4th edition 2nd revision, Springer Verlag Berlin (1992)

Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 86: 2668-2673, 1999

Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S: Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 12 (2): 87-91, 2006

Hong WK, Bromer RH, Amato DA, Shapshay S, Vincent M, Vaughan C, Willett B, Katz A, Welch J, Fofonoff S: Patterns of relapse in locally advanced head and neck cancer patients who achieved complete remission after combined modality therapy. *Cancer* 56 (6): 1242-1245, 1985

Horch H, Austermann KH, Bill J, Burckhardt A, Machtens E, Maerker R, Metelmann H, Mühling J, Reinert S, Reuther J, Zöller J: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Band II, Urban & Schwarzenberg, München, 1998

Hosch SB, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schuhmacher U et al: Malignant potential and prognostic impact of occult disseminated tumor cells in patients with esophageal cancer. *Cancer Res* 60: 6836-6840, 2000

Houbiers JGA, van der Burg SH, van de Watering LMG, Tollenaar RAEM, Brand A, van de Velde CJH, Meliefs CJM: Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 72: 637-641, 1995

Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M: Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister, Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie 4 Suppl. 1: 216-225, 2000

Howell GMS, Grandis JR: Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck* 27: 710-717, 2005

International Breast Cancer Study Group: Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 335: 1565-1568, 1990

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Watanabe T, Aridome K, Hokita S, Aikou T: Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. *Am Surg* 69 (7): 573-577, 2003

Izbicki JR, Thetter O, Habekost M, Karg O, Passlick B, Kubuschok B, Busch C, Haeussinger K, Knoefel WT, Pantel K: Radical systematic mediastinal lymphadenectomy in non-small cell lung cancer: a prospective controlled randomized clinical trial. *Br J Surg* 81:229-235, 1994

Izbicki JR, Passlick B, Hosch SB, Kubuschok B, Schneider C, Busch C, Knoefel WT, Thetter O, Pantel K: Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small-cell lung cancer: significance of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112 (3): 623-630, 1996

Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K: Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 337: 1188-1194, 1997

Izbicki JR, Pantel K, Hosch SB: Micrometastasis in solid epithelial tumors: Impact on surgical oncology. *Surg* 131: 1-5, 2002

Jacques C, deAquino AM, Ramos-e-Silva M: Cytokeratins and dermatology. *Skinmed* 4: 354-360, 2005

Johnson DG: Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. *Oncogene* 11(9): 1685-1692, 1995

Jones AS, Roland NJ, Field JK, Phillips DE: The level of cervical lymph node metastases: their prognostic relevance and relationship with head and neck squamous carcinoma primary sites. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 19: 63-69, 1994

Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kroger N, Gutensohn K, Wagener C, Neumaier M, Zander AR: Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 78: 1194-1198, 1998

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitjian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994

Kasimir-Bauer S, Mayer S, Bojko P, Borquez D, Neumann R, Seeber S: Survival of tumor cells in stem cell preparations and bone marrow of patients with high-risk or metastatic breast cancer after receiving dose-intensive or high-dose chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7: 1582-1589, 2001

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW : Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-11, 1991

Kataoka H, DeCasto R, Zucker S, Biswas C: Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 53: 3154-3158, 1993

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP: Ki 67, cyclin E and p16INK4A are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervix neoplasia. *Am J Surg Pathol* 25: 884-891, 2001

Ke LD, Adler-Storthz K, Clayman GL, Yung AWK, Chen Z: Differential expression of epidermal growth factor receptor in human head and neck cancer. *Head and Neck* 20: 320-327, 1998

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel DM: Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92: 276-284, 2001

Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B; Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmüller G: Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 20: 387-392, 2002

Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG: Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 162: 747-753, 2003

Kokemüller H, Brachvogel P, Eckardt A, Hausamen J: Effektivität der Neck dissection beim metastasierenden Mundhöhlenkarzinom. *Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie* 6: 91-97; 2002

Komukai S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K: Significance of immunohistochemical nodal micrometastasis as a prognostic indicator in potentially curable esophageal carcinoma. *Brit J Surg* 89: 213-219; 2002

Krause CJ, Lee JG, McCabe BF: Carcinoma of the oral cavity. *Arch Otolaryngol* 97: 354-358, 1973

Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K: Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-lung-cancer. *J Clin Oncol* 17: 19-24, 1999

Kwon SY, Kim HJ, Woo JS, Jung KY, Kim I: The usefulness of cytokeratin immunohistochemistry in detection of lymph node micrometastasis in neck dissection specimens. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131(3): 300-306, 2004

Lam KY, Loke SL, Shen XC, Ma LT: Cytokeratin expression in non-neoplastic oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Virchows Arch* 426: 345-349, 1995

Lane DP : P53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992

Langdon JD, Partridge M: Expression of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 30 : 214-20, 1992

La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E: Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 33 (5): 302-312, 1997

Leemanns CR, Tiwari R, van der Waal I, Karim AB, Nauta JJ, Snow GB: The efficacy of comprehensive neck dissection with or without postoperative radiotherapy in nodal metastases of squamous cell carcinoma in the upper respiratory and digestive tracts. *Laryngoscope* 100: 1194-1198, 1990

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, Van der Waal I, Snow GB: Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 71: 452-456, 1993

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB: Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73 (1): 187-190, 1994

Lefebvre JL, Castelain B, Torre JC, Delobelle-Deroide A, Vankemmel B: Lymph node invasion in hypopharynx and lateral epilynx carcinoma: a prognostic factor. *Head and Neck* 10: 14-18, 1987

Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991

Lindberg R: Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 29: 1446-1449, 1972

Little M, Wainwright B: Methylation and p16: suppressing the suppressor. *Nature Med* 1 : 633-634, 1995

Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO: Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139:1337-1348, 1997

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA: Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people- a comprehensive review. *Oral Oncol* 37: 401-418, 2001

Lockart PB, Norris Jr CM, Pulliam C: Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Oral Oncol* 34: 133-139, 1998

Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1160-1176, 2003

Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Trédaniel J, Legros Y, Cazals D, Hirsch A, Soussi T: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Medicine* 7 (1): 701-702, 1995

Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel K, Rusch V: Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *J Clin Oncol* 21 (13): 2609-2615, 2003

Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J: Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res* 55(21): 4818-4823, 1995

Machant FE, Lowry LD, Moffit JJ, Sabbagh R: Current national trends in posttreatment follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Otolaryngol* 14: 88-93, 1993

Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, Kohnoe S, Sugimachi K: Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 119: 397-402, 1996

Maier H, Fischer G, Sennwald E, Heller WD: Berufliche Risikofaktoren für Rachenkrebs. Ergebnisse der Heidelberger Rachenkrebsstudie. *HNO* 42: 530-549, 1994

Maier H, Tisch M, Enderle D, Dietz A, Weidauer H: Berufliche Exposition gegenüber Farben, Lacken und Lösungsmittel und Krebsrisiko im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes. *HNO* 45: 905-908, 1997

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J: Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 168: 494-498, 1994

Mashberg A, Samit A: Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancer. *CA Cancer J Clin* 45: 328-351, 1995

Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Sakamoto F, Okumura H, Sakita H, Baba M, Takao S, Aikou T: Clinical significance of lymph node micrometastasis of pN0 esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 153: 189-197, 2000

Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G, Mancuso S: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 74: 1243-1257, 1996

McDonald LA, Walker DM, Gibbins JR: Cervical lymph node involvement in head and neck cancer detectable as expression of a spliced transcript of type II keratin K5. *Oral Oncol* 34: 276-283, 1998

Mendelson BC, Woods JE, Beahrs OH: Neck dissection in the treatment of carcinoma of the anterior two-thirds of the tongue. *Surg Gynol Obstet* 143: 75-80, 1976

Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LWMM, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J: Her-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progress. *Med Sciences* 101 (25): 9393-9398, 2004

Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LWMM, Lane N, Wang J, Uhr J: uPAR and Her-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Med Sciences* 103 (46): 17361-17365, 2006

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielsen E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D: 5 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1(7): 686-692, 1995

Miettinen M: Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathol Ann* 28: 113-143, 1994

Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G, Lönning T: p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. *Int J Cancer* 75: 61-65, 1998

Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA: High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer* 81: 677-683, 1999

Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, Farrus B, Latre ML, Gimenez N, Hage M, Estape J, Ballesta AM: C-erb-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Res* 16: 2295-2300, 1996

Moll R: Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. *Acta Histochem Suppl* 41: 117-127, 1991

Moll R: Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. *Int J Biol Markers* 9: 63-69, 1994

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982

Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K: Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 11(10): 3678-3685, 2005

Muir C, Weiland L: Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer* 75: 147-153, 1995

Nagpal JK, Patnaik S, Das BR: Prevalence of high-risk Human Papilloma Virus Types and its association with p53 Codon-72 polymorphism in tobacco addicted Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer* 97: 649-653, 2002

Nakamura T, Ide H, Eguchi R, Hayashi K, Ota M, Takasaki K: Clinical implication of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative (pN0) esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 79: 224-229, 2002

Natarajan S, Xu F, Gilchrist K, Weber SM: Cytokeratin is a superior marker for detection of micrometastatic biliary tract carcinoma. *J Surg Res* 125 (1): 9-15, 2005

Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, Feith M, Höfler H, Siewert JR: Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 83: 858-866, 1998

Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C: Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 86: 122-127, 2000

Nieuwenhuis EJC, Leemans CR, Kummer A, Denkers F, Snow GB, Brakenhoff RB: Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 83: 1233-1240, 2003

Nöel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM: Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 17: 221-239, 1997

Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G: P53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 71: 826-830, 1995

O'Brien PH, Carlson R, Streubner EA, Stanley CT: Distant metastases in epidermoid cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 27: 304-307, 1971

Osaki T, Hirota J, Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E: Clinical and histopathologic characteristics of tongue and gingiva carcinomas with occult and clinically evident cervical lymph-node metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25 (4): 274-278, 1996

Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573; 1889

Palma RT, Waisberg J, Bromberg SH, Simao AB, Godoy AC: Micrometastasis in regional lymph nodes of extirpated colorectal carcinoma: immunohistochemical study using anti-cytokeratin antibodies AE1/AE3. *Colorectal Dis* 5 (2): 164-168, 2003

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki IR, Riethmüller G: Methodological analysis of immunohistochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3: 163-173, 1994

Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmer W, Schlimok G, Weckermann D, Obernedder R, Fanning E, Riethmüller G.: Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel sources of tumour cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 87 (15): 1162-1168, 1995

Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Häussinger K, Thetter O, Riethmüller G: Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347: 649-653, 1996

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91: 1113-1124, 1999

Pantel K, Otte M: Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 11: 327-337, 2001

Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev Cancer* 4: 448-456, 2004

Pantel K, Wölfle U: Detection and molecular charakterisation of disseminated tumour cells: Implications for anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756: 53-64, 2005

Passlick B, Izbicki JR, Kuboschock B, Nathrath W, Thetter O, Pichlmeier U, Schweiberer L, Riethmüller G, Pantel K: Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 12: 1827-1832, 1994

Passlick B, Pantel K: Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes. *Recent Results in Cancer Research* 157, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2000

Paz IB, Cook N, Odem-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79(3): 595-604, 1997

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa , 2nd edition. Berlin: Springer , 1997

Pinsolle J, Pinsolle V, Majoufre C, Duroux S, Demeaux H, Siberchicot F: Prognostic value of histologic findings in neck dissection for squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 145-148, 1997

Poetsch M, Lorenz G, Bankau A, Kleist B: Basaloid in contrast to nonbasaloid head and neck squamous cell carcinomas display aberrations especially in cellcycle control genes. *Head and Neck* 25 (11): 904-910, 2003

Popella C, Bödeker R, Glanz H, Köhl S: Mehrfachkarzinome im oberen Aerodigestivtrakt. *Laryngo-Rhino-Otologie* 78: 671-678, 1999

Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K: Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancer by in situ hybridization. *Cancer Res* 52: 1336-1341, 1992

Quon H, Liu FF, Cummings BJ: Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck* 23: 147-159, 2001

Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW: Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol* 27: 49-57, 2005

Reed AL; Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D: High frequency of p16 (CDKN/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 3630-3633, 1996

Reichert PA: Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest* 5: 207-213, 2001

Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Jänicke F, Sauter G, Pantel K: Expression of extracellular matrix metalloproteinases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10: 3422-3428, 2004

Rhee D, Wenig BM, Smith RV: The significance of immunohistochemically demonstrated nodal micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 112: 1970-1974, 2002

Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Löning T, Crum CP: Human papillomviruses expression of p16 and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol* 33: 899-904, 2002

Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K: High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119: 1800-1810, 2006

Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell-search system. *Clin Cancer Res* 13 (3): 920-928, 2007

Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichelmayer R, et al: Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes C colorectal carcinoma. *Lancet* 343: 1177, 1994

Riethmüller G, Klein CA, Pantel K: Hunting down the seminal cells of clinical metastases. *Immunol Today* 20: 294-296, 1999

Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, Di Bernado C: Lymph node metastasis in lower li squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27^{kip1} protein expression. *Oral Oncol* 40: 92-98, 2004

Sato F, Shimada Y, Li Z, Watanabe G, Maeda M, Imamura M: Lymph node micrometastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Brit J Surg* 88: 426-432, 2001

Sawaf MH, Ouhayoun JP, Forrest N: Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification. *J Biol* 19: 187-198, 1991

Schaafsma HE, Ramaekers FCS: Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. *Pathol Ann* 29: 21-62, 1994

Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, et al: Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti 17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8672-8676, 1987

Sesterhenn AM, Mandic R, Dünne AA, Werner JA: Cytokeratins 6 and 16 are frequently expressed in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and fresh biopsies. *Anticancer Res* 25: 2675-2680, 2005

Shah JP, Candela FC, Poddar AK: The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 66: 109-113, 1990

Shintani S, Mihara M, Nakahara J, Kiyota A, Yoshihama Y, Ueyama Y, Matsumura T: Infrequent alternations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclinD1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer res* 20: (3B). 2169-2175, 2000

Snow GB, Annayas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA: Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol* 7: 185-192, 1982

Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ: Methylation of specific CpG sites in the promotor region could significantly down regulate p16(INK4A) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 87: 236-240, 2000

Spiro RH: The management of neck nodes in head and neck cancer:a surgeon's view. *Bull NY Acad Med* 61: 629-637, 1985

Stell PM, Morton RP, Singh SD: Cervical lymph node metastases: the significance of the level of the lymph node. *Clin Oncol* 9: 101-107, 1983

Stockel M, Moons K, tenBroek F, van Rijk P, Hordijk G: 18F- Fluorodeoxyglucose Dual-head positron emission tomography as a procedure for detecting simultaneous primary tumors in cases of head and neck cancer. *Cancer* 86: 2370-2377, 1999

Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Esch JS, Knoefel WT, Hosch SB: Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer* 6:165: 1-8, 2006

Suo Z, Holm R, Nesland JM: Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. *Histopathology* 23 (1): 45-54, 1993

Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T: Expression of the matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2, -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Brit J Cancer* 77: 2239-2245, 1998

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV, van Krieken JH: Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 412-419, 1997

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, Han J, van Krieken JM: Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* 194: 298-302, 2001

Tanabe T, Nishimaki T, Watanabe H, Ajioka Y, Akazawa K, Komukai S, Hatakeyama K: Immunohistochemically detected micrometastasis in lymph nodes from superficial esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 82: 153-159, 2003

Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M: Expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89: 557-563, 2003

Thurm H, Ebel S, Kentenich C, Hensen A, Riethdorf S, Coith C, Wallwiener D, Braun S, Oberhoff C, Jänicke F, Pantel K : Rare expression of epithelia cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 9: 2598-2604, 2003

Traweek ST, Liu J, Battifora H: Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 142 (4): 1111-1118, 1993

Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G: Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 55: 303-306, 1987

UICC: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 2002

Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Druzd T, Shpitzer T, Gutman D, Feinmesser R: Value of minimal residual disease in patients with early cancer of the tongue. *Am J Otolaryngol* 25: 240-244, 2004

Van den Brekel MW, Stel HV, van der Valk P, van der Waal I, Meyer CJ, Snow GB: Micrometastases from squamous cell carcinoma in neck dissection specimens. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 249: 349-353, 1992

Van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Golding RP, Meyer CJ, Snow GB: Modern imaging techniques and ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250(1): 11-17, 1993

Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJL, Freemann JL, Castelijns JA, Snow GB: The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope* 106: 987-991, 1996

Van Houten VMM, van den Brekel MWM, Denkers F, Colnot DR, Westerga J, van Diest PJ, Snow GB, Brakenhoff RH: Molecular diagnosis of head and neck cancer. *Recent Results in Cancer Research* 157: 90-106; Springer Verlag Berlin-Heidelberg 2000a

Van Houten VMM, Maarten PT, van den Brekel MWM, Denkers F, Wishaupt RGA, Kummer JA, Snow GB, Brakenhoff RH: Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head and neck cancer: methods, reliability, pitfalls and solutions. *Clin Cancer Res* 6: 3803-3816, 2000b

Vikram B: Changing patterns of failure in advanced head and neck cancer. *Arch-Otolaryngol* 110: 564-565, 1984

Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima H: Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 106: 884-888, 1996

Wilkinson EJ, Hause L: Probability in lymph node sectioning. *Cancer* 33: 1269-1274, 1974

Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K: Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11:8006-8014, 2005

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV: The epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163: 2139-2148, 2003

Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Jänicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K: Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63: 5679-5684, 2003

Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K: Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2670-2674, 2004

Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S: Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl* 77 (5): 325-331, 1995

Woolgar JA: Pathology of the N0 neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37: 205-209, 1999a

Woolgar JA: Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37(3): 181-186, 1999b

Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B: Her2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12 (6): 1715-1720, 2006

Wynford-Thomas D: P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166 : 329-30, 1992

Yoshida K, Kashima K, Suenaga S, Nomi N, Shuto J, Suzuki M: Immunohistochemical detection of cervical lymph node micrometastases from T2N0 tongue cancer. *Acta Otolaryngol* 125: 654-658, 2005

Zarbo RJ, Crissman JD: The surgical pathology of head and neck cancer. *Semin Oncol* 15: 10-19, 1988

Zbaeren P, Lehmann W: Frequency and sites of distant metastases in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 762-764, 1987

Zippelius A, Kupfer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmüller G, Pantel K: Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 15: 2701-2708, 1997

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. L. Riethdorf, meinem Mentor und Frau Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. S. Riethdorf. Sie überließen mir dieses Thema und unterstützten mich durch erkenntnisreiche Diskussionen und Anregungen.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus auch bei Herrn Prof. Dr. med. K. Pantel und den Mitarbeitern des Institutes für Tumorbiologie für ihre Hilfe bei fachlichen und organisatorischen Problemen.

Herrn Prof. Dr. med. Th. Löning und dem Team der Pathologie danke ich für die ausgezeichneten Rahmenbedingungen. Frau I. Brandt und Frau M. Stoupiec danke ich herzlich für die Unterstützung beim Erlernen und der Durchführung der immunhistochemischen Analyse und der RNA-*in situ*-Hybridisierung.

Für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials danke ich der Nordwestdeutschen Kieferklinik (Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie) und der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Die zahlreichen Freunde, die mir bei der Formatierung und Korrektur dieser Arbeit geholfen haben, kann ich nicht alle aufzählen, aber ich danke Euch herzlich.

Zum Schluß möchte ich Axel Stellings und meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung danken.

Lebenslauf

Name	Franziska Waltraud Gärtner
Geburtsdatum	05. März 1977
Geburtsort	Potsdam
Anschrift	Am Burgfried 3, 24939 Flensburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1983-1989	Polytechnische Oberschule Arthur Becker / Berlinchen
1989-1996	Gymnasium Wittstock, Abitur 1996

Studium

1996-1999	Studium der Biologie, Universität Rostock, Vordiplom 02/99
1999	Studium der Biologie, Humboldt Universität Berlin
April 2000-2006	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
Mai 2006	Approbation als Ärztin

Wissenschaftliche Ausbildung

seit Juni 2004	Dissertation „Nachweis von Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten von Patienten mit oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen“ im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
----------------	--

Klinische Tätigkeit

seit August 2006	Assistenzärztin in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie, Diakonissenkrankenhaus Flensburg
------------------	--

Flensburg, den 17.03.2008

Franziska Gärtner

Eidesstattliche Erklärung

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 in einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Flensburg, den 17.03.2008

Franziska Gärtner