

Aus dem Institut für Tumorbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Pantel

**Phänotypische Charakterisierung von
SCID-Maus-Xenograft-Tumoren aus Zelllinien von
Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nurşen Kurt

aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 17.12.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Rainald Knecht

Maşallah



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	3
2. Einleitung	5
2.1. Tumoren der Kopf-Hals-Region	5
2.1.1. Definition	5
2.1.2. Ursachen	6
2.1.3. Prognose	7
2.1.4. Symptome	7
2.1.5. Diagnose	8
2.1.6. Klassifikation	8
2.1.7. Therapie	10
2.1.7.1. Therapiewahl nach Stadieneinteilung	10
2.1.7.2. Operative Therapien	11
2.2. Charakterisierung und Detektion der Tumorzellen	12
2.2.1. Zytokeratin-Antikörper 34 β E12	12
2.2.2. Epithelial growth factor receptor (EGFR)	13
2.2.3. Tumorsuppressorprotein p53	13
2.2.4. Epithelial cell adhesions molecule (EpCAM)	14
2.3. Invasion und Metastasierung	15
2.3.1. Matrixmetalloproteasen (MMP)	15
2.3.2. Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP)	21
2.3.3. A disintegrin and metalloproteases (ADAM)	22
2.3.4. Extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN)	25

2.4.	Stammzellmarker	26
2.4.1.	Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH-1)	26
2.4.2.	p63	27
2.5.	Plattenepithelkarzinom-Zelllinien	28
3.	Material und Methoden	30
3.1.	Material	30
3.1.1.	Untersuchungsmaterial	30
3.1.2.	Antikörper	32
3.1.2.1.	Für die immunhistochemischen Analysen verwendete Antikörper	32
3.1.2.2.	Verwendete Antikörper und Ribosonden für die nicht-radioaktiven RNA/RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierungen	34
3.1.3.	Geräte und Materialien	34
3.1.4.	Verwendete Reagenzien, Kits und Puffer für die immunhistochemischen Färbungen	36
3.1.5.	Verwendete Reagenzien und Puffer für die nicht-radioaktiven RNA/RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierungen	38
3.2.	Methoden	42
3.2.1.	Anfertigung der Paraffinschnitte	42
3.2.2.	Immunhistochemische Analysen	43
3.2.3.	Nicht-radioaktive RNA/RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierungen	48
3.2.3.1.	Teil 1 (1.Tag)	48
3.2.3.2.	Teil 2 (2.Tag)	50
3.2.3.3.	Teil 3 (3.Tag)	51
3.2.4.	Statistische Analysen	52
4.	Ergebnisse	53
4.1.	Tumorentstehung	53

4.2.	Auswertungsschema	57
4.3.	Anzahl der untersuchten Tumoren	57
4.4.	Auswertung aller Tumoren und Faktoren	58
4.4.1.	Separate Auflistung der Intensität und des Anteils positiver Zellen für alle immunhistochemisch und über ISH untersuchten Faktoren	58
4.4.2.	Auswertung der Immunfärbungen und <i>in situ</i> -Hybridisierungen nach dem Remmele-Score	60
4.4.2.1.	MMP 1	62
4.4.2.2.	MMP 9	65
4.4.2.3.	ADAM 17	66
4.4.2.4.	TIMP 3	68
4.4.2.5.	ALDH-1	69
4.4.2.6.	EGFR	72
4.4.2.7.	EMMPRIN	73
4.4.2.8.	EpCAM	75
4.4.2.9.	p53	76
4.4.2.10.	p63	77
4.4.2.11.	34ßE12	79
4.5.	Vergleich der einzelnen untersuchten Faktoren innerhalb der Klone einer Zelllinie	81
4.5.1.	Zelllinie VU-SCC-OE-267	81
4.5.2.	Zelllinie 93VU120T-308	82
4.6.	Vergleich der beiden Zelllinien	82
4.7.	Korrelation der einzelnen Faktoren zum Nachweis zirkulierender und disseminierter Tumorzellen	84
4.8.	Nähere Charakterisierung der CTC-/DTC-positiven Tumoren	88

5.	Diskussion	90
5.1.	Charakterisierung und Detektion der Tumorzellen	90
5.1.1.	34 β E12	93
5.1.2.	EGFR	94
5.1.3.	p53	95
5.1.4.	EpCAM	97
5.2.	Invasion und Metastasierung	98
5.2.1.	Matrixmetalloproteasen	98
5.2.2.	ADAM 17	100
5.2.3.	TIMP 3	102
5.2.4.	EMMPRIN	103
5.3.	Stammzellmarker	105
5.3.1.	ALDH-1	106
5.3.2.	p63	107
5.3.3.	EpCAM	109
5.4.	Weitere hervorstechende Eigenschaften	110
6.	Zusammenfassung	113
7.	Literaturverzeichnis	116
8.	Danksagung	131
9.	Lebenslauf	132
10.	Eidesstattliche Versicherung	133

Abkürzungsverzeichnis

267	VU-SCC-OE-267
308	93VU120T-308
34ßE12	Pan-Anti-Zytokeratin-Antikörper
ADAM	a disintegrin and metalloproteases
ALDH 1	Aldehyddehydrogenase 1
AZ	Tumoren der Ausgangszelllinien
AZ'	Ausgangszelllinie
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
CD44	Glykoprotein an der Zelloberfläche, Hyaluronrezeptor
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CTC	zirkulierende Tumorzellen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DE	Deutschland
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DTC	disseminierte Tumorzellen
DTT	Dithiothreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)
E2F	Gene zur Kodierung von Transkriptionsfaktoren der Familie en:E2F
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloprotease inducer
EpCAM	Epithelial cell adhesions molecule
HCl	Salzsäure
HRP	horseradish (engl.)/ Meerrettichperoxidase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kD	Kilodalton
MMP	Matrixmetalloproteasen
MNC	Mononuclear cells
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
n.g.	nicht getestet

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
p21	Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinase 1
p53	Tumorsuppressorprotein p53
p63	Tumorsuppressorprotein p63
PBS	phosphate buffered saline (engl.)/ Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEK	Plattenepithelkarzinom
PFA	Paraformaldehyd
SSC	saline sodium citrate
SS-DNA	Salmon Sperm DNA
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteases
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
t-RNA	transfer-RNA
W	Watt
WBC	White blood cells
ZL	Zelllinie

Arbeitshypothese und Fragestellung

Maligne Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sind zu mehr als 90% Plattenepithelkarzinome, deren Prognose vor allem vom primären Tumorstadium, vom lokalen Invasionsverhalten und von der Metastasierung abhängt. An der insgesamt schlechten Prognose dieser Tumoren hat sich in den letzten Jahrzehnten nur wenig verändert. Gründe dafür sind, dass es sich bei Diagnosestellung häufig um fortgeschrittene Tumorerkrankungen handelt und dass es bisher keine zuverlässigen Marker gibt, die eine über das Staging hinausgehende Charakterisierung des biologischen Tumorverhaltens erlauben. Dies wiederum erschwert die Selektion von Risikofällen mit schlechter Prognose.

Xenografttransplantationen können zur Untersuchung der Tumorigenität humaner Karzinom-Zelllinien und zur Validierung bekannter tumorassoziierter Marker eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Tumoren, die nach subkutaner Transplantation zweier Zelllinien aus oralen Plattenepithelkarzinomen im SCID-Maus-Modell erhalten wurden, auf die Expression verschiedener tumorassoziierter Marker analysiert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Expression ausgewählter tumorassoziierter Faktoren, die bekannterweise mit der Aggressivität dieser Tumorentität korrelieren, auch mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark sowie zirkulierender Tumorzellen im Blut der SCID-Mäuse assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit standen folgende Fragen im Vordergrund des Interesses:

- ▶ Werden Proteasen mit tumorassoziierter proteolytischer Aktivität, wie MMP 1, MMP 9 und ADAM 17 in den Maustumoren differenziell exprimiert?
- ▶ Gibt es Unterschiede in der Expression des MMP-Induktors EMMPRIN, sowie des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR, der in der Entwicklung oraler Plattenepithelkarzinome sehr früh aktiviert wird?
- ▶ Werden in den Xenotransplantaten Tumor-Stammzellmarker wie ALDH-1, p63 und EpCAM exprimiert?

- ▶ Exprimieren die Tumoren Zytokeratine und EpCAM mit unterschiedlicher Intensität? Lassen sich mit Hilfe der Immunhistochemie Rückschlüsse auf das Vorliegen von Mutationen im p53-Gen ziehen?
- ▶ Gibt es wesentliche Unterschiede in der Expression der genannten Faktoren zwischen verschiedenen Zelllinien derselben Tumorentität?
- ▶ Sind Unterschiede unter verschiedenen Klonen einer Tumorzelllinie nachweisbar?
- ▶ Sind zirkulierende (CTC) und disseminierte (DTC) Tumorzellen im Blut und im Knochenmark der SCID-Mäuse nachzuweisen und korreliert der Nachweis mit der Expression der untersuchten tumorassoziierten Faktoren?

Einleitung

2.1. Tumoren der Kopf-Hals-Region

2.1.1. Definition

Unter einem Kopf-Hals-Tumor versteht man eine maligne Neoplasie des oberen Aerodigestivtraktes. Der Aerodigestivtrakt ist ein Komplex aus Geweben, aus denen sich die oberen Atemwege und der obere Teil des Verdauungstraktes gebildet haben. Hierunter fallen demnach der Mund- und Rachenraum, der Nasen- und Nasennebenhöhlenraum und der Kehlkopf. Im Einzelnen wären das die Lippen, die Zunge, der Mundboden, die Mundhöhle, das Zahnfleisch, der Gaumen, die Speicheldrüse, der Rachen, die Nasenhöhle, die Nasennebenhöhlen, der Kehlkopf und das Mittelohr. Bei den Tumoren in diesen Regionen handelt es sich hauptsächlich (bei etwa 90% der Malignome) um Plattenepithelkarzinome, seltener um Adenokarzinome oder Sarkome [1].

Diese Tumoren infiltrieren Nachbarstrukturen sehr früh. Sie metastasieren früh und meist lymphogen [2]. Von Fernmetastasen sind in erster Linie die Lungen und die Pleura, seltener die Leber, das Mediastinum und schließlich auch die Knochen betroffen. In etwa 10% der Fälle findet man ebenfalls Zweittumore im Aerodigestivtrakt [3].

Die Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (Abbildung 1) befinden sich auf dem sechsten Platz der Häufigkeiten aller Malignome und bilden weltweit die fünfthäufigste Karzinomerkrankung. Hierbei sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Auch sieht man eine höhere Erkrankungsrate in entwickelten Ländern im Gegensatz zu Entwicklungsländern [4]. Die Inzidenz in Deutschland beträgt in etwa 50 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei circa 60 Jahren [4, 5, 6].

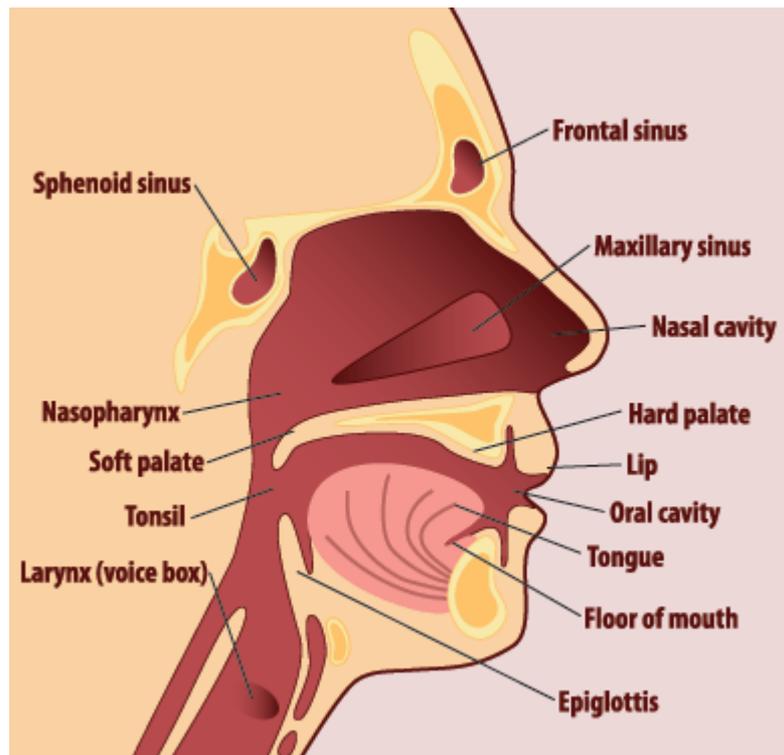


Abbildung 1: Übersicht des Kopf- und Halsraumes [7]

2.1.2. Ursachen

Die Ursachen der Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms sind multifaktoriell. In erster Linie wird der Tabakkonsum dafür verantwortlich gemacht (jeglicher Art des Konsums: Kauen, Rauchen etc.). Als weitere Ursache gilt das Konsumieren von Alkohol, vor allem von hochprozentigem Alkohol. Zwischen den beiden Faktoren besteht zudem ein multiplikativer Effekt [4]. Des Weiteren gelten schlechte Mundhygiene, scharfe Zahnkanten, virale Infektionen (wie z.B. mit den Humanen Papilloma-Viren (HPV) oder eine Epstein-Barr-Virusinfektion (EBV)), UV- und radioaktive Strahlung (wie z.B. bei Strahlenexposition bei Schilddrüsen- und Speicheldrüsenneoplasien), kanzerogene Chemikalien (wie z.B. Asbest, chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke), chronische Traumen (wie z.B. schlecht sitzende Zahnprothesen) und ein geschwächtes Immunsystem als die Tumorgenese beeinflussende Faktoren. [8]

2.1.3. Prognose

Die Prognose lässt sich zum einen aus den patientenabhängigen Faktoren und zum anderen aus den tumorabhängigen Faktoren ersehen. Zu den patientenabhängigen Faktoren zählen unter anderem das Alter, das Geschlecht, der Immunstatus und eventuelle Begleiterkrankungen. Zu den tumorabhängigen Faktoren zählen unter anderem der histologische Typus, die Lokalisation des Primärtumors, die anatomische Ausdehnung, der Differenzierungsgrad und das Proliferationsverhalten der malignen Zellen [4]. Bei dieser Gruppe von Tumoren korreliert die Tumorgöße allerdings nicht ausreichend mit dem biologischen Verhalten, weshalb es allein nicht als ein geeigneter Parameter zur Charakterisierung des biologischen Verhaltens der Tumoren in Frage kommt.

Generell ist zu sagen, dass die Prognose eher schlecht ist, denn die Tumoren werden zumeist in Spätstadien diagnostiziert (Tabelle 1).

Und diese Prognose hat sich in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich geändert. Hierzu wäre es erstrebenswert, die Tumoren schon frühzeitig zu erkennen [4, 8].

Tabelle 1: 5-Jahres-Überlebensrate bei Kopf-Hals-Tumoren nach UICC-Stadieneinteilung [3]

5-Jahres-Überlebensrate in %	
Stadium I	75-90
Stadium II	40-70
Stadium III	20-50
Stadium IV	10-30

2.1.4. Symptome

Die Symptome der Kopf-Hals-Tumoren hängen von der jeweiligen Struktur ab, die betroffen ist. Eine über Wochen dauernde Heiserkeit könnte für einen Kehlkopftumor sprechen, unklare Schluckbeschwerden sind häufig bei Rachentumoren und Fremdkörpergefühle weisen auf Tumoren der Mundhöhle

oder der Zunge hin. Tastbare Lymphknoten, die derb aber wenig schmerzhaft sind, findet man bei bereits metastasierten Kopf-Hals-Tumoren [8].

2.1.5. Diagnose

In den meisten Fällen werden die Tumoren durch ihre anhaltende Symptomatik von den Patienten selbst festgestellt oder beim HNO-Spezialisten durch endoskopische Untersuchungen aufgedeckt [8]. Zur Diagnosesicherung erfolgt eine histologische Untersuchung der Biopsie.

Im Rahmen des Tumorstagings werden zur Beurteilung der lokoregionalen Ausdehnung des Tumors bildgebende Verfahren eingesetzt. Dazu gehört die sonografische Beurteilung der Halsregion und ein CT- und/oder MRT-Bild des Halses bis zur Schädelbasis. Zur Beurteilung der Lymphknoten- und Fernmetastasen werden weiter eine Röntgenthoraxaufnahme, eine Kontrastmitteluntersuchung des Ösophagus, eine Abdomensonografie und eine Skelettszintigrafie veranlasst.

2.1.6. Klassifikation

Die Einteilung der Tumoren erfolgt nach der TNM-Klassifikation der International Union Against Cancer – UICC (Union internationale contre le cancer, Tabelle 2).

Tabelle 2: TNM-Klassifikation maligner Tumoren

(Wittekind und Wagner 1997 [9], Wittekind et al. 2002 [10])

T Primärtumor	
T 1	Tumor < 2 cm
T 2	Tumor > 2 cm und < 4 cm
T 3	Tumor > 4 cm
T 4	Tumor wächst in Nachbarstrukturen, wie z.B. Knochen, Muskel, Haut ein
N Regionäre Lymphknoten	
N 1	Eine einzelne Lymphknotenmetastase < 3 cm auf der gleichen Seite
N 2 a	Eine einzelne Lymphknotenmetastase > 3 bis 6 cm auf der gleichen Seite
N 2 b	mehrere Lymphknotenmetastasen < 6 cm auf der gleichen Seite
N 2 c	Lymphknotenmetastasen auf beiden Seiten oder auf der Gegenseite < 6 cm
N 3	Lymphknotenmetastase > 6 cm
M Fernmetastasen	
M 0	keine Fernmetastasen
M 1	Vorliegen von Fernmetastasen

Der Residualtumor-Faktor (R-Faktor) beschreibt nach einer erfolgten Behandlung des Tumors, ob das komplette Tumorgewebe entfernt wurde, oder ob Resttumorgewebe verblieben ist (Tabelle 3). Er ist unabhängig von der Art der Behandlung. Bei der chirurgischen Entfernung sollte möglichst eine R₀ – Resektion angestrebt werden.

Tabelle 3: Übersicht R-Faktor (Wittekind und Hermanek 2003 [11])

R Residualtumor	
R _x	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R ₀	kein Residualtumor
R ₁	mikroskopischer Residualtumor
R ₂	makroskopischer Residualtumor

Um die Aggressivität des Tumors beurteilen zu können, wird ein so genanntes „histologisches Grading“ durchgeführt. Hierbei unterscheidet man vier Stufen:

- G_x = der Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden
- G_1 = gut differenziert
- G_2 = mäßig differenziert
- G_3 = schlecht differenziert
- G_4 = undifferenziert.

2.1.7. Therapie

Durch die Lokalisation von Tumoren in so einer sensiblen Region spielt die Therapie für die Psyche und die Lebensqualität des betroffenen Patienten eine herausragende Rolle. Da die Gesichts- und Halsregion nicht nur funktionell, sondern auch kosmetisch von großer Bedeutung ist, ist die Belastungsgrenze der Patienten entsprechend hoch. Die Erhaltung aller Organfunktionen auf der einen Seite, wie zum Beispiel das Aufnehmen von Nahrungsmitteln und das Sprechen, aber auch das Einhalten von Schönheitsidealen auf der anderen Seite soll im Vordergrund stehen. Hierbei spielt die operative Therapie eine entscheidende Rolle. Strahlen- und Chemotherapie spielen ebenfalls eine wesentliche Rolle.

2.1.7.1. Therapiewahl nach Stadieneinteilung

Je nach Patient und dessen Tumorlokalisierung und Stadium werden die drei Therapiedisziplinen gegeneinander abgewogen um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen.

Bei Tumoren des Stadiums I und II ist die Therapie der Wahl die operative Entfernung des Tumors mit nachgeschalteter Strahlen- oder Chemotherapie, wahlweise mit kombinierter Radiochemotherapie.

Bei Tumoren des Stadiums III werden die operative Entfernung des Tumors und eine Radiochemotherapie angestrebt. Da allerdings viele Tumoren in diesem Stadium schon inoperabel sind, weil die Lebensqualität durch die operative

Entfernung des Tumors unzumutbar beeinträchtigt wäre, empfiehlt es sich, eine neoadjuvante Radiochemotherapie durchzuführen.

Bei Tumoren des Stadiums IV ist nur noch eine palliative Therapie möglich, da die Patienten schon oft Fernmetastasen aufweisen und die 5-Jahresüberlebensrate sehr niedrig ist (siehe Tabelle 1, Seite 7). Hierbei steht die Chemotherapie an vorderster Stelle. Operative Eingriffe, aber auch strahlentherapeutische Maßnahmen im Sinne einer palliativen Behandlung sind möglich.

2.1.7.2. Operative Therapien

Die Operation hängt von der Lokalisation und der Ausdehnung des Tumors ab. Mit der so genannten „Neck-Dissection“-Operationstechnik wird der Tumor mitsamt den Lymphknoten entfernt. Hierbei werden alle Lymphknoten der Kopf-Hals-Region entfernt, entweder aus prophylaktischen Gründen oder auf Grund von nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (Abbildung 2). Diese Technik wird noch einmal unterteilt je nachdem, wie radikal bei der operativen Entfernung des Tumors vorgegangen wird.

Bei der radikalen Neck-Dissection werden neben allen Lymphknoten die Muskeln M. sternocleidomastoideus, M. omohyoideus, M. sternohyoideus und M. sternothyroideus entfernt. Des Weiteren werden der Nervus accessorius, die Vena jugularis interna und die Glandula submandibularis mit entfernt.

Bei der modifiziert-radikalen Neck-Dissection werden ebenfalls die oben genannten Strukturen der Kopf-Hals-Region entfernt, wobei mindestens eine nicht-lymphatische Struktur erhalten bleibt.

Bei der erweiterten Neck-Dissection werden auch noch weitere Lymphknotengruppen oder Gewebe mit entfernt.

Bei der funktionellen Neck-Dissection werden nur die Lymphknoten entfernt. Dies hat gegenüber den vorher genannten Methoden den Vorteil, dass die funktionelle Einschränkung bei weitem nicht so hoch ist.

Bei der selektiven Neck-Dissection werden nur bestimmte Lymphknotengruppen entfernt, bei denen Lymphknotenmetastasen schon entdeckt wurden oder vermutet werden [12].

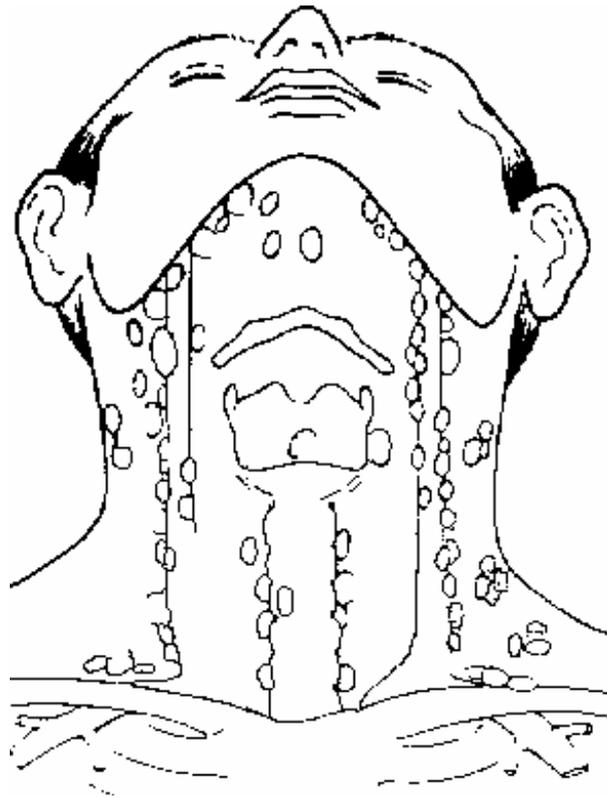


Abbildung 2: Lymphknoten der Kopf-Hals-Region [13]

2.2. Charakterisierung und Detektion der Tumorzellen

Zur Charakterisierung der Tumoren und auch zum Auffinden von zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen habe ich vier verschiedene Marker verwendet.

2.2.1. Zytokeratin-Antikörper 34 β E12

34 β E12 ist ein pan-anti-Zytokeratin-Antikörper. Zytokeratine sind Intermediärfilamente, welche neben den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten das Zytoskelett der Epithelzellen formen. Da es sich bei den vorliegenden Tumoren um Plattenepithelkarzinome handelt, die ebenfalls aus dem Epithelgewebe hervorgehen, sollten sie positiv für Zytokeratine sein, sodass man diese als einen Marker für Tumoren epithelialen Ursprungs verwenden kann. Der monoklonale Antikörper 34 β E12 stellt die hochmolekularen Zytokeratine 5, 6, 10 und 14 dar [45, 46].

2.2.2. Epithelial growth factor receptor (EGFR)

EGFR ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Er gehört zu der Superfamilie der EGF-Rezeptoren. Er fördert das Zellwachstum und korreliert zudem mit Zellproliferation, Migration und Apoptoseaufhebung der Zellen. In vielen epithelialen Tumoren kommt er in erhöhten Konzentrationen vor.

EGFR wird in 90% der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen exprimiert [101, 102]. Die Assoziation zwischen Überexpression des EGFR und ungünstiger Überlebensprognose ist bei Kopf-Hals-Tumoren stärker als bei jedem anderen menschlichen Tumor [101, 103]. Darüber hinaus ist eine EGFR-Überexpression mit Resistenzen gegen Chemo- und Strahlentherapie assoziiert [101,104]. Außerdem ist er in ein komplexes Proteasegeschehen eingeschaltet (siehe Abbildung 3, Seite 25). Deshalb ist es von Interesse, die EGFR-Expressionsmuster zu untersuchen [87, 88, 89, 90].

2.2.3. Tumorsuppressorprotein p53

Das Tumorsuppressorprotein p53, welches seinen Namen seinem Molekulargewicht von 53 kD verdankt, wird auf dem Chromosom 17 kodiert. Dieses Protein ist in den Zellzyklus kontrollierend eingeschaltet. Wenn das p53-Protein durch genetische oder epigenetische Mechanismen, wie z.B. Mutationen, Deletionen oder Hypermethylierungen verändert vorliegt, hat dies weit reichende Folgen für den Zellzyklus und bildet durch das unkontrollierte Wachsen der betroffenen Zellen eine wesentliche Grundlage der Tumorentstehung [14, 15]. Das Protein ist durch eine besondere Signalkaskade an weitere zellzyklusmodulierende Proteine geknüpft. Das Tumorsuppressorprotein p53 aktiviert ein weiteres zellzyklushemmendes Protein, nämlich das p21-Protein. In aktiver Form hemmt dieses Protein die Komplexbildung und dadurch dessen Aktivierung von Cyclin D und CDK 4/6 bzw. von Cyclin E und CDK 2. Dadurch können diese Komplexe das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein durch Ablösung des E2F nicht aktivieren. Somit kommt es im Zellzyklus zum Stillstand. Denn erst durch die Freisetzung von E2F, welches weitere Cycline aktiviert, kommt es zur DNA-Reparatur und DNA-Polymerasebildung mit anschließender Aktivierung des

Zellzyklus [16]. Da das p53-Protein in ca. der Hälfte der oralen Plattenepithelkarzinome mutiert vorliegt, macht man es sich generell zur Identifikation von Tumoren zunutze [14, 110, 111].

Bei den zwei Zelllinien, die mir zur Verfügung standen, hatte die eine Zelllinie p53-Mutationen (Zelllinie: 93VU120T-308), die andere allerdings keine (Zelllinie: VU-SCC-OE-267). Die Mutationen der Zelllinie 93VU120T-308 wurden im Exon 5 des p53-Gens in den Codons 161 und 176 lokalisiert. Der Nachweis des p53-Proteins wurde deshalb als ein zusätzlicher Tumormarker verwendet.

2.2.4. Epithelial cell adhesions molecule (EpCAM)

Das Epithelial Cell Adhesions Molecule (EpCAM) ist, wie der Name schon sagt, ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kD. Es ist ein Transmembran-Glykoprotein und wird auf dem Chromosom 4 kodiert. Es ist nicht nur ein Zelladhäsionsmolekül. Es wurden noch viele weitere Funktionen dieses Proteins aufgedeckt, z.B. in Bezug auf Zellproliferation, Migration und Differenzierung. Es kommt natürlicherweise in der Embryonalzeit in den Lungen, der Leber, dem Pankreas, der Haut und den Keimzellen vor. Es ist zwar in adultem Plattenepithel der Kopf- und Halsschleimhaut nicht vorhanden, kommt aber im Tumorgewebe vor [17]. Fast in allen Plattenepithel- und Adenokarzinomen kann man es nachweisen. Durch seine hohe Expressionsrate in schnell proliferierenden Tumoren epithelialen Ursprungs kann es als Karzinom-Marker Verwendung finden [18].

Neben der Identifikation als Karzinom-Marker wird es nun auch als ein Stammzellmarker diskutiert. Durch die hohe EpCAM-Expression in Tumorzellen wird die gewebespezifische terminale Differenzierung der Zellen gestört. Es korreliert dadurch mit dem Proliferationsstatus und dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen [19, 20].

2.3. Invasion und Metastasierung

Mit der Aggressivität eines Tumors wird vor allem seine Fähigkeit beschrieben, angrenzendes Gewebe zu infiltrieren und sich in anderen Geweben bzw. Organen abzusiedeln. Der wesentliche Schritt zur Migration maligner Zellen ist der Verdau von Komponenten der extrazellulären Matrix. Verschiedene Enzymgruppen, wie die Matrixmetalloproteasen (MMP) und auch die Disintegrin-ähnlichen Matrixmetalloproteasen (ADAM) sind in den sehr komplexen, mehrstufigen Prozess der Invasion und Metastasierung einbezogen. Außerdem haben die Inhibitoren dieser Proteasen, wie die Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMP) bei der Unterdrückung der tumorassoziierten proteolytischen Aktivität eine große Bedeutung. Sie können somit die Invasionsfähigkeit des Tumors reduzieren und die Metastasierung unterdrücken.

Es gibt aber auch andere Proteine, wie den Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer (EMMPRIN) und den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, siehe 2.2.2.), die durch die Aktivierung der Matrixmetalloproteasen oder durch einen positiven Feedback-Mechanismus durch die MMPs auch in den Invasions- und Metastasierungsprozess der Tumorzellen eingreifen können (siehe dazu Abbildung 3, Seite 25).

2.3.1. Matrixmetalloproteasen (MMP)

Die Matrixmetalloproteasen sind eine Gruppe von Proteasen, die die Fähigkeit besitzen, die extrazellulären Matrixproteine zu verdauen [21].

Sie wurden zum ersten Mal von Jerome Gross und Charles Lapierre im Jahre 1962 beschrieben und 6 Jahre später auch in humanen Hautzellen gefunden.

Die Matrixmetalloproteasen bilden mit den Serinproteasen und den Cysteinproteasen die Hauptgruppe der Extrazellulärmatrix-abbauender Enzyme [24].

Durch die Hydrolyse der Proteine der extrazellulären Matrix beeinflussen sie die Zell-Matrix-Wechselwirkung entscheidend. Zu den Matrixmetalloproteasen gehören Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Metalloelastasen. Es wurden schon mehr als 25 Proteasen identifiziert [21, 22, 23, 24, 25].

Diese Proteasen übernehmen auch noch weitere proteolytische Aktivitäten in der Zelle, die erst später aufgedeckt wurden. Sie spalten zum Beispiel auch Oberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren [21, 23, 25].

Der Aufbau der Matrixmetalloproteasen ist bekannt. Sie sind zinkabhängige Proteasen, das heißt in ihrem aktiven Zentrum befindet sich ein Zinkatom. Über dieses findet auch die Aktivierung der MMPs statt. Die Matrixmetalloproteasen bestehen aus mehreren Proteindomänen, die Homologie zueinander aufweisen [26, 28, 30, 32, 41]:

- Die Propeptid-Domäne:

Die Matrixmetalloproteasen werden initial als Zymogene, also inaktive Vorstufen gebildet. Durch einen Cysteinrest am N-terminalen Ende des Propeptids, welches das Zinkatom im aktiven Zentrum bindet, muss das Enzym in der inaktiven Form verharren (Cystein-Schalter). Diese Domäne geht bei der Versetzung des Enzyms in die aktive Form verloren.

- Die katalytische Domäne:

In dieser Domäne wird das Zn^{2+} -Ion gebunden, welches für die Aktivität der Protease unerlässlich ist. Somit bildet es das aktive Zentrum der Protease.

- Die C-terminale Domäne:

Diese Stelle ist substratspezifisch und dient der Komplexbildung mit seinem Inhibitor. Diese Domäne zeigt eine Ähnlichkeit zu dem Serumprotein Haemopexin und wird deshalb auch haemopexinähnliche C-terminale Domäne genannt.

- Die (Angel-) Binde-Region

Dies ist eine weitere Region, die die katalytische und die C-terminale Domäne flexibel miteinander verbindet.

Es gibt verschiedene Ansätze, die Matrixmetalloproteasen zu unterteilen. Dabei spielt die Substratspezifität und die Lokalisation des Enzyms eine wesentliche Rolle (Tabelle 4). Funktionell unterteilt man sie in 4 Hauptgruppen, die oben schon genannt wurden [21, 40, 41]:

Unter die Gruppe der Kollagenasen fallen MMP 1, MMP 8, MMP 13, MMP 18. Diese Kollagenasen können die Tripelhelix des Kollagens fragmentieren.

Unter die Gruppe der Gelatinasen fallen MMP 2 und MMP 9. Diese Gelatinasen sind substratspezifisch für Kollagen Typ IV und Gelatine. Außerdem haben sie eine Besonderheit in ihrem Aufbau. Sie besitzen eine weitere Domäne, welche sie befähigt, Gelatine zu binden.

Unter die Gruppe der Stromelysine fallen MMP 3, MMP 10 und MMP 11. Diese Stromelysine hydrolysieren Proteine der Extrazellulärmatrix, können jedoch nicht die Kollagen-Tripelhelix spalten.

Unter die Gruppe der membranständigen Matrixmetalloproteasen fallen MMP 14, MMP 15, MMP 16, MMP 17, MMP 24 und MMP 25.

Es fallen jedoch nicht alle Matrixmetalloproteasen unter diese vier Gruppen. Die Tabelle 4 gibt einen Gesamtüberblick zu den Matrixmetalloproteasen.

Tabelle 4: Übersicht - Matrixmetalloproteasen (Rosenthal und Matrisian 2006 [21], [26-44])

Name:	Synonym:	Lokalisation:	Substratspezifität:	Bildungsort:
MMP 1	Interstitielle Kollagenase	sezerniert	Kollagen Typ I, II, III, VII, X, Gelatine, Proteoglycan Kernprotein	Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Tumorzellen
MMP 2	Gelatinase-A, 72 kD Gelatinase	sezerniert	Kollagen Typ IV, V, VII, XI, Gelatine	Fibroblasten, Makrophagen, Tumorzellen
MMP 3	Stromelysin 1	sezerniert	Kollagen Typ II, IV, IX, X, XI, Prokollagen, Fibronectin, Laminin, Elastin, Proteoglycan Kernprotein	Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Tumorzellen

Fortsetzung:

Name:	Synonym:	Lokalisation:	Substratspezifität:	Bildungsort:
MMP 7	Matrilysin, PUMP1	sezerniert	Kollagen Typ IV, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Proteoglykan	Makrophagen, Tumorzellen
MMP 8	Neutrophile Kollagenase	sezerniert	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Proteoglycan Kernprotein	Fibroblasten, Endothelzellen
MMP 9	Gelatinase B, 92kD Gelatinase	sezerniert	Kollagen Typ IV, V, Gelatine, Elastin	Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Tumorzellen
MMP 10	Stromelysin 2	sezerniert	Kollagen Typ II, IV, IX, X, XI, Prokollagen, Fibronectin, Laminin, Elastin, Proteoglycan Kernprotein	Fibroblasten, Tumorzellen
MMP 11	Stromelysin 3	sezerniert	α 1 Proteasen- hemmer	Fibroblasten, Tumorzellen
MMP 12	Makrophagen -Elastase	sezerniert	Elastin	unbekannt
MMP 13	Kollagenase 3	sezerniert	Kollagen Typ I, IV, Gelatine, Fibronectin, Proteoglykan, Tenaszin	Fibroblasten
MMP 14	MT1-MMP	membranständig	Kollagen, Prokollagenase 3, Progelatinase A, Proteoglykan, Fibronectin, Tenaszin	Fibroblasten, Tumorzellen

Fortsetzung:

Name:	Synonym:	Lokalisation:	Substratspezifität:	Bildungsort:
MMP 15	MT2-MMP	membranständig	Kollagen, Prokollagenase 3, Progelatinase A, Proteoglykan, Fibronectin, Tenaszin	unbekannt
MMP 16	MT3-MMP	membranständig	Progelatinase A	unbekannt
MMP 17	MT4-MMP	membranständig	Gelatine	unbekannt
MMP 18	Kollagenase 4	-	Kollagen Typ I	unbekannt
MMP 19	RASI-1	-	Kollagen Typ I, IV, Gelatine, Tenaszin, Aggrecan	unbekannt
MMP 20	Enamelysin	sezerniert	Amelogenin	unbekannt
MMP 21	X-MMP	sezerniert	unbekannt	unbekannt
MMP 23 a	CA-MMP	membranständig	unbekannt	unbekannt
MMP 23 b	-	membranständig	unbekannt	unbekannt
MMP 24	MT5-MMP	membranständig	unbekannt	unbekannt
MMP 25	MT6-MMP	membranständig	Gelatine	unbekannt
MMP 26	Matriysin 2	-	unbekannt	unbekannt
MMP 27	MMP-22, C-MMP	-	unbekannt	unbekannt
MMP 28	Epilysin	sezerniert	unbekannt	unbekannt

MT-MMP: membranständige Matrixmetalloproteasen

Die Aktivität der Matrixmetalloproteasen unterliegt einem komplexen Steuerungssystem [21]. Auf fünf Ebenen wird auf die proteolytische Aktivität der MMPs eingegriffen:

I - Zum einen wird die Synthese der Matrixmetalloproteasen überwacht. Dabei wirken Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, HGF), Zytokine, Polypeptidhormone, Prostaglandine und Östrogen synthesessteigernd, während Faktoren, wie Glucocorticoide und Retinsäure synthesehemmende Wirkung haben.

II - Zum anderen werden sie durch die Bindung an Membranrezeptoren kontrolliert.

III - Da die Matrixmetalloproteasen als inaktive Proenzyme synthetisiert werden, kann ihre Aktivität durch spezielle Hydrolyse der jeweiligen Propeptide oder durch Oxidation beeinflusst werden.

IV - Durch spezielle Inhibitoren, wie die TIMPs werden die Matrixmetalloproteasen direkt gehemmt (siehe Punkt 2.3.2).

V - Und schließlich spielt auch der proteolytische Abbau der Proteasen eine Rolle [24, 41].

Die Matrixmetalloproteasen werden von unterschiedlichsten Zellen gebildet. Unter anderem gehören Osteoblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten dazu. Besonders viel werden sie in den Fibroblasten und in inflammatorischem Gewebe gebildet. Auch in Tumorzellen kommen sie vor [21, 27, 29].

Die Matrix beeinflusst grundlegende Prozesse der Zelle, wie die Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion. Durch ihre Fähigkeit, die Extrazellulärmatrix abzubauen, spielen die Matrixmetalloproteasen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und Metastasierung des Tumors [31, 33]. Nicht nur durch ihre Fähigkeit, die extrazellulären Barrieren abzubauen und dadurch die Möglichkeit zum Tumorwachstum und ihrer Metastasierung zu schaffen, sondern auch durch viele weitere komplexe Mechanismen spielen die Matrixmetalloproteasen eine große Rolle in der Tumorbilogie [42, 43, 44]. Dazu gehört u.a. das Wachstum des Tumorgewebes in den Metastasen durch Aktivierung der Wachstumsfaktoren [21]. Weiterhin können sie durch die Verarbeitung der Zelladhäsionsmoleküle die Tumorzellen vor dem natürlichen (apoptotischen) Zelltod schützen. Auch begünstigen sie die Angiogenese des Tumors, indem sie Faktoren, wie den basic fibroblast growth factor (β -FGF), den vascular endothelial growth factor (VEGF) und den transforming growth factor (TGF) aktivieren [21, 33-39]. Die Komplexität der Wirkmechanismen der Matrixmetalloproteasen wird noch nicht im Detail verstanden, aber es scheint so, als gebe es hier Potenzial zur Entwicklung neuartiger tumortherapeutischer Möglichkeiten.

In Bezug auf die Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome sind MMP 1 und MMP 9 von besonderem Interesse. Ihre Überexpressionsrate ist assoziiert mit der Prognose des Tumors [21].

2.3.2. Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP)

Die Matrixmetalloproteasen werden spezifisch von den „tissue inhibitors of metalloproteases“ (TIMP) gehemmt. Durch die Kontrollfunktion der Aktivität der MMPs spielen sie eine herausragende Rolle bei der Balancierung des Matrixauf- und Abbaus. Ein gesundes Gewebe zeichnet sich durch das Gleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs aus [47, 48, 49, 50, 51]. Ein gestörtes Gleichgewicht wird u.a. in tumorösem Gewebe gefunden.

Im Jahre 1975 wurde die erste TIMP in humanen Fibroblasten gefunden und ihre hemmende Wirkung auf Kollagenasen beschrieben [46, 52]. Seither wurden drei weitere TIMPs identifiziert (Tabelle 5). Die TIMPs werden in vielen Geweben exprimiert, aber nicht mit gleicher Intensität. Die meisten mesenchymalen und epidermalen Zellen besitzen die Fähigkeit der TIMP-Expression und TIMP 1, 2 und 3 werden zudem in Leukozyten exprimiert [47, 53, 54].

Die TIMPs sind multifunktionelle Proteine. Sie kontrollieren nicht nur den Status der Extrazellulärmatrix, sondern sind darüber hinaus z.B. auch wichtig für die Aktivierung von pro-MMP 2 (durch TIMP 2) und MMP 16 (durch TIMP 3). Sie wirken durch ihre Wachstumsfaktor-Aktivität zellwachstumsfördernd [57, 58, 60]. Sie beeinflussen die Endothelzellproliferation und die vascular endothelial growth factor (VEGF)-vermittelte Angiogenese [50, 55].

Sie bestehen aus zwei verschiedenen Domänen, zum einen aus der N-terminalen Domäne, die zur Inhibition der MMPs befähigt ist und zum anderen aus der C-terminalen Domäne, die die Progelatinase A und B bindet. Ihre Aminosäuresequenzen zeigen zu 40% Homologie zueinander [61].

Tabelle 5: Übersicht - Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteases

(Verstappen et al. 2006 [47])

TIMP:	Vorkommen:	MMP- Hemmung:	Komplexbildung	Genlokus (Chrom.):	Expression:
TIMP 1	Mensch, Affe, Rind, Scharf, Ratte, Maus, Kaninchen	alle MMPs + MT-MMPs	Progelatinase B	X	induzierbar
TIMP 2	Mensch, Rind, Scharf, Ratte, Maus, Kaninchen	alle MMPs - MT-MMPs	Progelatinase A	17	konstitutiv
TIMP 3	Mensch, Ratte, Maus, Huhn	alle MMPs - MT-MMPs	Progelatinase A Extrazellulär- matrix	22	induzierbar
TIMP 4	Mensch, Maus	alle MMPs - MT-MMPs	Progelatinase A	3	stark reguliert und begrenzt

MT-MMP: membranständige Matrixmetalloproteasen

Im Serum von Tumorpatienten findet man erhöhte MMP- und auch TIMP-Werte. Wenn die Überexpressionsrate auf Seiten der MMPs stärker ist, ist das häufig mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden [59].

Bei den oralen Plattenepithelkarzinomen korreliert die Überexpression von MMPs mit dem Tumorwachstum und dessen Metastasierungsverhalten, wohingegen die Überexpression der TIMPs mit der Tumorgöße und dessen Rückgang korreliert [56, 58, 62]. Damit wird deutlich, wie eng die Expressionsraten der MMPs und der TIMPs mit der Prognose der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region verbunden sind.

2.3.3. A disintegrin and metalloproteases (ADAM)

Unter die Familie der „a disintegrin and metalloproteases“ (ADAM) fallen membranständige Typ I Glycoproteine. Disintegrin ist der Name eines Proteins, welches erstmals aus Schlangengift isoliert wurde und sich hier auf dessen

Eigenschaft bezieht, die durch Integrin-vermittelte Bindung von Thrombozyten an Fibrin zu inhibieren. ADAMs bilden die größte Gruppe der Shedding-aktiven Proteasen. Als Shedding wird das Phänomen der Abspaltung extrazellulärer Bereiche membranständiger Proteine (Ektodomänen) bezeichnet, die dadurch befähigt werden, Signaltransduktionsprozesse auszuüben. Mittlerweile sind mehr als 40 ADAMs beschrieben worden.

Die ADAMs gehören mit den MMPs zu der Superfamilie der Metzinkine. Alle Proteine dieser Superfamilie sind zinkabhängige Proteasen [63, 64, 65, 66, 67]. Die ADAMs, die aus 800 bis 1200 Aminosäuren bestehen, sind aus verschiedenen Domänen aufgebaut [69-82]:

- Die Pro-Domäne:

Diese Domäne besteht aus etwa 200 Aminosäuren. Sie geht eine Komplexbildung mit dem Zink²⁺-Ion im aktiven Zentrum ein und gewährleistet dadurch, dass das Enzym in einer inaktiven Vorstufe verharren bleibt. Wird diese Bindung durch Oxidation, Methylierung oder andere Vorgänge gelöst, so geht das Enzym in die aktive Form über.

- Die Metalloprotease-Domäne:

Diese Domäne besteht auch aus etwa 200 Aminosäuren. In dieser Domäne befindet sich das aktive Zentrum mit dem Zink²⁺-Ion.

- Die Disintegrin-Domäne:

Diese Domäne ist kleiner und besteht aus etwa 60 bis 90 Aminosäuren. In dieser Domäne wird eine Bindung mit einem spezifischen Integrin eingegangen.

- Die cysteinreiche Domäne:

Die Funktion dieser aus etwa 160 Aminosäuren bestehenden Domäne ist noch nicht ganz geklärt. Man nimmt an, dass diese Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen zuständig ist, welches die ADAMs dazu befähigt, an ihren Wirkort zu gelangen. Außerdem könnten diese Interaktionen ihre Aktivität steuern.

- Die EGF-ähnliche Domäne:

Die Funktion dieser aus etwa 40 Aminosäuren bestehende Domäne ist ebenso wenig aufgeschlüsselt, wie die der cysteinreichen Domäne. Sie übernimmt wahrscheinlich dieselbe Aufgabe.

- Die Transmembrandomäne:

Da die ADAMs membranständige Typ I Glycoproteine sind, verfügen sie auch über eine hydrophobe Transmembrandomäne, welche sie in der Plasmamembran befestigt.

- Die zytoplasmatische Domäne:

Die Größe dieser Domäne variiert zwischen 40 und 250 Aminosäuren und sie spielt wahrscheinlich bei intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen eine Rolle. Die Transmembran- und auch die zytoplasmatische-Domäne fehlen allerdings bei einigen löslichen Formen der ADAMs, die durch alternatives Spleißen entstehen.

ADAM 17 wurde als erste Shedding-aktive Protease entdeckt. Sie ist maßgeblich an der Abspaltung des tumor necrosis factor- α (TNF- α) von der Zelloberfläche beteiligt und wird deshalb auch synonym tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) genannt. TNF- α ist als Zytokin ein ausschlaggebender Faktor bei Entzündungsprozessen. Durch den Shedding-Vorgang wird das pro-TNF- α , welches an die Zellmembran gebunden ist, in das lösliche TNF- α , also in seine aktive Form überführt. Des Weiteren gehören u.a. die Prozessierung des TNF- α -2-Rezeptors, des ILG-Rezeptors, des NOTCH-1-Rezeptors, des erbB 4-Rezeptors, von APP, HER 4, PrP und L-Selektin zu den Funktionen von ADAM 17 [63, 64, 65, 66, 67].

Als ADAM 17-Inhibitor gilt TIMP 3, wohingegen TIMP 1, 2 und 4 nicht zur Inhibition von ADAM 17 befähigt sind [68, 69].

Da ADAM 17 eine große Rolle bei der Freisetzung diverser membranständiger Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Rezeptoren, Liganden und Enzyme spielt, ist seine Expressionsrate bei Tumorerkrankungen interessant. Durch seine Aktivität, Adhäsionsmoleküle, wie CD44 und auch Zytokine, wie TNF- α zu spalten, wird ADAM 17 als begünstigender Faktor in der Malignität von

Tumoren, also Migration von Tumorzellen und Metastasierung angesehen, u.a. auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. Die Korrelation der ADAM 17-Expression mit der Lymphknotenmetastasierung wurde in dem Institut für Tumorbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bereits festgestellt.

2.3.4. Extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN)

Der extracellular matrix metalloprotease inducer, früher auch als TCSF (tumor collagenase stimulatory factor) bekannt, ist ein Protein, welches zur Aktivierung der MMPs fähig ist (Abbildung 3). Es ist ein transmembranes Glykoprotein, welches man auf Leukozyten, Keratinozyten, Endothelzellen, aber vor allem auf Tumorzellen findet. Das EMMPRIN-kodierende Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und es gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. EMMPRIN stimuliert die MMP-Freisetzung aus den peritumoralen Fibroblasten und Endothelzellen [83, 84, 85, 86].

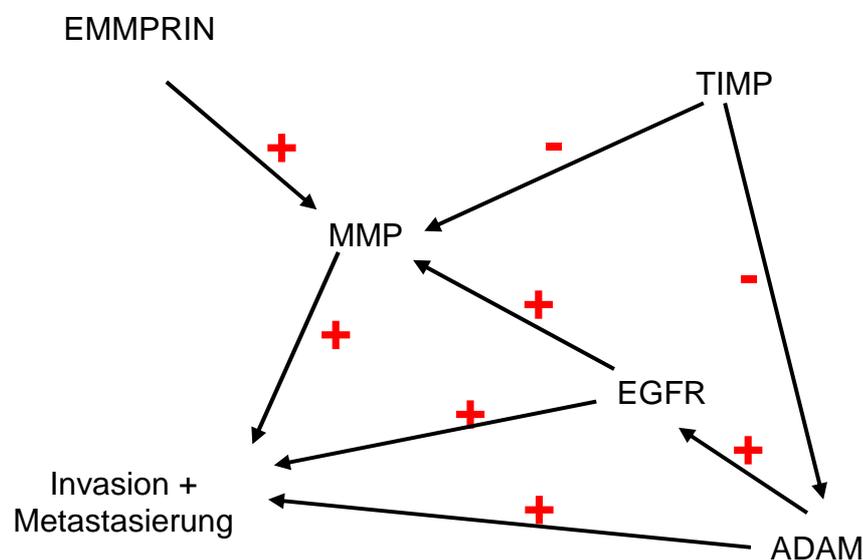


Abbildung 3: Zusammenhang ausgewählter Proteine im Invasions- und Metastasierungsgeschehen

2.4. Stammzellmarker

Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe auszudifferenzieren, werden als Stammzellen bezeichnet. Wenn sich Stammzellen teilen, können sich aus den Tochterzellen wieder Stammzellen und auch ausdifferenzierte, gewebespezifische Zellen bilden. Das bezeichnet man als asymmetrische Teilung. Die Stammzellen können sich uneingeschränkt vermehren und sie bilden die Grundlage der Entstehung und des Fortbestehen der höher entwickelten Organismen.

Auch Tumoren entstehen aus veränderten Zellen mit Stammzeleigenschaften. Diese „Tumorstammzellen“ persistieren als eine kleine Gruppe von Zellen im Tumor und besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung. Wahrscheinlich bilden diese Zellen die Grundlage der Tumoren und sind zudem auch schwerer zu eliminieren, da sie nicht, wie die ausdifferenzierten Tumorzellen, abnormal stark proliferieren. Nicht proliferationsaktive Tumorstammzellen werden für die Metastasenbildung und die Rezidivbildung der Tumoren nach erfolgreicher Behandlung verantwortlich gemacht [105].

Stammzellen exprimieren bestimmte Zelloberflächenproteine, aber auch Proteine im Zytoplasma und Zellkern, die ihre Stammzeleigenschaften bestimmen. Durch geeignete Antikörper könnte man nun diese Stammzellproteine auffinden und dadurch möglicherweise die tumorigenen Stammzellen und damit das tumorigene Potenzial charakterisieren.

2.4.1. Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH-1)

Auf dem menschlichen Genom sind 10 Aldehyddehydrogenase-Gene vorhanden. Die Aldehyddehydrogenasen werden in die drei Gruppen 1-3 eingeteilt. Die Aldehyddehydrogenase 1 ist ein Enzym, welches Aldehyde irreversibel zu Carbonsäure oxidiert. Sie spielt eine essentielle Rolle beim Alkoholabbau durch Detoxifikation von kanzerogenen Stoffen. Sie ist vor allem im Zytosol und in den Mitochondrien der Leberzellen lokalisiert. Aber sie ist auch bei allen anderen Zellen mehr oder weniger stark enthalten, allerdings vermehrt in Tumorzellen. Neuere Studien ergaben, dass erhöhte ALDH-1-Aktivitäten bei Subpopulationen der Tumorzellen nachweisbar sind, die eine

weite Spanne an Differenzierungsmöglichkeiten haben und höchste Wachstumskapazitäten aufweisen. Deshalb fungiert ALDH-1 neuen Studien zufolge als ein Tumormarker [91, 92, 93]. Da das Enzym aber auch in anderen Zellen vorkommt, ist es nicht als primärer, sondern eher als ein zusätzlicher Tumormarker zum Nachweis von Stammzeleigenschaften geeignet.

2.4.2. p63

Das p63-Gen kodiert ausgehend von zwei Promotoren für zwei verschiedene Isoformen von p53-homologen Proteinen [14, 16]. Sie zeigen hohe Sequenz- und Strukturhomologie zum p53-Protein und gehören deshalb zu der p53-Protein-Familie [16, 94, 95, 96, 97]. Sie regulieren und modulieren Proteine, die für die Proliferation und Differenzierung von Zellen zuständig sind und spielen deshalb eine Schlüsselrolle in der Zellzyklusregulation. Die zwei Isoformen sind zum einen die lange Form des p63-Proteins TAp63 und zum anderen die kurze Form Δ Np63. Jede dieser zwei Isoformen wird noch weiter in α , β und γ unterteilt (Δ Np63-alpha, Δ Np63-beta, Δ Np63-gamma und TAp63-alpha, TAp63-beta, TAp63-gamma). Das Molekulargewicht der p63-Isoformen beträgt dabei für α 66kD, für β 52kD und für γ 45kD. Die TA-Form hat eine sehr ähnliche Funktion wie das p53-Protein. Eine Vielzahl von Genen wird von ihr aktiviert, die eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Transkription, der epithelialen Differenzierung, der Zelladhäsion, des Zellzyklusarrestes und der Apoptose haben und weitere zelluläre Funktionen übernehmen, wohingegen die Δ Np63-Form einen transkriptionell inhibitorischen Effekt auf bestimmte, den Zellzyklus herabregulierende Gene ausübt [16, 94, 95, 96, 97, 98]. Zellen, die p63 unterexprimieren, haben nahezu keine messbaren apoptotischen Aktivitäten [16]. Das p63-Protein gilt als Stammzellmarker und wird vor allem in den Stammzellen mehrschichtiger Plattenepithelzellen exprimiert. Eine Überexpression im Zellkern spricht dabei für eine erhöhte Proliferationsrate, eine Überexpression im Zytoplasma dagegen eher für eine stärkere Entdifferenzierung der Tumorzellen.

2.5. Plattenepithelkarzinom-Zelllinien

Es standen ursprünglich sieben Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien zur Verfügung. Diese wurden in Kooperation mit dem Institut für Anatomie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf subkutan als Xenograft-Implantate in SCID-Mäuse transplantiert. Zu diesen Zelllinien gehörte u.a. die Zelllinie VU-SCC-OE, die ursprünglich aus einer Lymphknotenmetastase eines 61 jährigen Rezidivpatienten etabliert wurde. Der Sitz des Primärtumors war hier die Mundhöhle (Welters et al. 1997 [99], Tabelle 6). Eine weitere Zelllinie (93VU120T) wurde im Laboratory of Human Genetics an der Vrije Universiteit in Amsterdam etabliert. Diese Zelllinie stammt aus einer Biopsie einer 67 jährigen Frau mit dem Sitz des Primärtumors an der Zunge. Der Tumor wurde nach der TNM-Klassifikation als T3N1 eingestuft [99].

Für die Untersuchung des Invasions- und Progressionsverhaltens dieser Tumorklasse sind Xenograft-Tumormodelle in SCID-Mäusen eine geeignete Methode.

Xenograft steht hierbei für die Methode der Implantation von Geweben oder Organen einer Spezies in den Körper einer anderen Spezies und SCID steht für „severe combined immunodeficiency“, einem schweren kombinierten Immundefekt. Diese Mäuse besitzen demnach keine B- und T-Zellen. Jede Zelllinie wurde in fünf SCID-Mäuse implantiert, sodass insgesamt ein Repertoire aus 35 Mäusen entstand. Nur drei dieser Zelllinien formten Tumoren, und zwar jeweils nur in einer SCID-Maus. Diese Tumoren wurden nach der Entnahme homogenisiert und als Primärkultur vermehrt. Durch geeignete Verdünnungen gelang es, aus diesen Tumoren jeweils klonale Zelllinien zu generieren, die aus Einzelzellen entstanden sind.

Jeweils 5 Zelllinienklone (je 1×10^6 Zellen) zweier Ausgangszelllinien (VU-SCC-OE-267 und 93VU120T-308) wurden erneut in bis zu 6 SCID-Mäuse transplantiert. Zusätzlich wurden 7 SCID-Mäuse mit der ursprünglichen Zelllinie VU-SCC-OE und eine SCID-Maus mit der ursprünglichen Zelllinie 93VU-120T xenotransplantiert, wobei jetzt in allen 52 Mäusen Tumorbildung verzeichnet werden konnte. Die Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 entwickelten sich

innerhalb von vier bis zwölf Wochen und die der Zelllinie 93VU-120T-308 innerhalb von fünf Wochen bis 4 Monaten.

Tumorgewebe zuzüglich der Lungen, der Leber, der Milz und der Oberschenkelknochen für Knochenmarkanalysen sowie Blutproben wurden diesen Mäusen entnommen und für weitere Analysen aufgearbeitet. Insgesamt stand für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in Paraffin eingebettetes Gewebe von 52 Plattenepithelkarzinomen zur Verfügung.

Tabelle 6: Herkunft der zwei verwendeten Zelllinien (Welters et al. 1997 [99])

Zelllinie:	♀/♂:	Alter:	Lokalisation des Primärtumors:	TNM-Klassifikation:	Histologie:
VU-SCC-OE	Mann	61	Mundhöhle	lokales Rezidiv in einem zervikalen Lymphknoten	mittelgradig differenziertes PEK (G2)
93VU120T	Frau	67	Zunge	T3N1	mittelgradig differenziertes PEK (G2)

PEK: Plattenepithelkarzinom

Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumoren untersucht, die nach subkutaner Xenotransplantation humaner Zelllinien oraler Plattenepithelkarzinome in SCID-Mäusen entstanden sind. Dafür wurden je 5 aus Einzelzellen vermehrte Zellklone aus zwei humanen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien (VU-SCC-267-OE und 93VU120T-308) in jeweils bis zu 7 SCID-Mäuse implantiert.

Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 wurde aus einem Plattenepithelkarzinom etabliert, das nach Xenotransplantation der Zelllinie VU-SCC-OE (Welters et al. 1997 [99]) in einer SCID-Maus entstanden ist. Die Zelllinie 93VU120T-308 konnte aus einem Tumor etabliert werden, der nach Xenotransplantation der Zelllinie 93VU120T (Welters et al. 1997 [99]) entstanden ist. Alle Xenotransplantationsexperimente wurden im Institut für Anatomie II - Experimentelle Morphologie unter Leitung von Prof. Dr. U. Schumacher und mit praktischer Unterstützung durch Frau S. Feldhaus in Kooperation mit Frau Dr. S. Riethdorf (Institut für Tumorbilogie) durchgeführt.

Die Entwicklungszeiten und Massen der Tumoren zum Entnahmezeitpunkt sind in den Tabellen 7 und 8 beschrieben.

Alle in den SCID-Mäusen entstandenen 52 Tumoren lagen zu Beginn der experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation als Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Gewebelöckchen vor. Die Tumorgewebe wurden mit Hilfe der nichtradioaktiven *in situ*-Hybridisierung auf die mRNA-Expression tumorassoziierter Gene (MMP 1, MMP 9, TIMP 3 und ADAM 17) und mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen auf die Proteinexpression von 7 weiteren Faktoren (34 β E12, EpCAM, EMMPRIN, EGFR, ALDH-1, p53 und p63) untersucht.

Tabelle 7: Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267

Tumorentstehungszeit:	Klon:	Bezeichnung:	Tumormasse:
Zelllinie: VU-SCC-OE-267			
35 Tage	Klon 1	380-06	0,2 g
37 Tage	Klon 1	387-1	0,7 g
37 Tage	Klon 1	387-2	0,6 g
37 Tage	Klon 1	387-3	1,3 g
40 Tage	Klon 1	390-06	0,7 g
35 Tage	Klon 2	382-06	0,7 g
40 Tage	Klon 2	389-1	1,07g
40 Tage	Klon 2	389-2	1,0 g
40 Tage	Klon 2	389-3	1,4 g
44 Tage	Klon 2	391-06	0,5 g
30 Tage	Klon 3	358-1	1,3 g
30 Tage	Klon 3	358-2	1,6 g
30 Tage	Klon 3	358-3	1,5 g
30 Tage	Klon 3	358-4	0,8 g
30 Tage	Klon 3	358-5	0,6 g
30 Tage	Klon 4	359-06	0,9 g
35 Tage	Klon 4	378-1	1,0 g
35 Tage	Klon 4	378-2	1,1 g
37 Tage	Klon 4	388-06	0,9 g
30 Tage	Klon 5	360-1	1,2 g
30 Tage	Klon 5	360-2	1,0 g
35 Tage	Klon 5	379-1	0,6 g
35 Tage	Klon 5	379-2	1,3 g
35 Tage	Klon 5	379-3	0,3 g
69 Tage	267 - AZ	2-07	1,5 g
73 Tage	267 - AZ	19-0-07	1,2 g
73 Tage	267 - AZ	19-1-07	0,3 g
73 Tage	267 - AZ	19-2-07	2,7 g
73 Tage	267 - AZ	19-3-07	1,9 g
73 Tage	267 - AZ	19-4-07	0,6 g
42 Tage	267- Ausgangszelllinie	267-A-05	0,5 g

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

Tabelle 8 : Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308

Tumorentstehungszeit:	Klon:	Bezeichnung:	Tumormasse:
Zelllinie: 93VU120T-308			
35 Tage	Klon 1	381-06	0,08 g
44 Tage	Klon 1	392-1	0,1 g
44 Tage	Klon 1	392-2	0,1 g
63 Tage	Klon 1	433-06	
73 Tage	Klon 2	20-2-07	0,6 g
91 Tage	Klon 2	25-1-07	0,9 g
118 Tage	Klon 2	85-1-07	1,3 g
44 Tage	Klon 3	394-06	0,1 g
63 Tage	Klon 3	432-06	
69 Tage	Klon 4	1-1-07	0,1 g
69 Tage	Klon 4	1-2-07	0,1 g
73 Tage	Klon 4	20-1-07	1,0 g
91 Tage	Klon 4	26-1-07	0,5 g
91 Tage	Klon 4	26-2-07	0,6 g
44 Tage	Klon 5	393-06	0,1 g
77 Tage	Klon 5	14-1-07	0,9 g
77 Tage	Klon 5	15-1-07	1,2 g
77 Tage	Klon 5	15-2-07	3,6 g
103 Tage	Klon 5	34-07	
103 Tage	Klon 5	35-07	
58 Tage	308 - Ausgangszelllinie	308-A-05	

3.1.2. Antikörper

3.1.2.1. Für die immunhistochemischen Analysen verwendete Antikörper

<i>Nachweis:</i>	<i>Antikörper:</i>	<i>Verdünnung:</i>	<i>Hersteller:</i>
ALDH-1	Monoclonal Mouse Anti-Human ALDH-1, Clone: 44	1 : 500	BD Biosciences- PharMingen, (California, USA)

EGFR	Monoclonal Mouse Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor, Clone: E30	1 : 20	Dako (Hamburg, Deutschland)
EMMPRIN	CD147-M6, Mouse Anti-Human CD147, Clone: HIM6	1 : 1000	BD Biosciences- PharMingen (California, USA)
EpCAM	Monoclonal Mouse Anti-Human NCL-ESA, Clone: VU-1D6	1 : 75	Novocastra (Wetzlar, Deutschland)
p53	Anti-p53 (Ab-6) (Pantropic), Human (Mouse)	1 : 2000	Calbiochem®, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
p63	Rabbit polyclonal to p63	1 : 100	Abcam (Cambridge, England)
Zytokeratin (pan-anti- Zytokeratin 34 β E12)	Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin HMW Hight Molecular Wight Clone: 34 β E12	1 : 100	Dako (Hamburg, Deutschland)

3.1.2.2. Verwendete Antikörper und Ribosonden für die nicht-radioaktiven RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierungen

<i>Antikörper:</i>	<i>Verdünnung:</i>	<i>Hersteller:</i>
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	1 : 5000	Boehringer/Roche (Mannheim, Deutschland)

Die markierten RNA-Sonden MMP 1, MMP 9, TIMP 3 und ADAM 17 für die nicht-radioaktive RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierung wurden im Institut für Tumorbologie an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf hergestellt. Die RNA-Markierung erfolgte durch *in vitro*-Transkription mit Hilfe der SP-6- oder T7-Polymerase unter Einbau von Digoxigenin-UTP.

Die Plasmide zur Herstellung dieser Ribosonden wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hermann Herbst (Berlin) [100] und Dr. J. Kornfeld/Dr. S. Riethdorf (Institut für Tumorbologie) zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Geräte und Materialien

Brutschrank B12	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Dampfkocher Decloaking Chamber	Biocare Medical, Concord, CA
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eismaschine FM 120 DE	Hoshizaki, Japan
Feinwaage LP 224S-0CE	Sartorius AG, Göttingen
Feuchte Kammern	Dako, Hamburg
Gefriertruhe -80°C Kryotec	Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg
Handschuhe Latex, Nitril	Hartmann, Heidenheim
Hybridisierungsöfen GFL 7601	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Inkubationsschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Kühlschrank 4-8°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer COMBIMAG NEO	IKA, Staufen
Mikrotom Leica SM 2000R	Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Mikroskop Motic B1	Motic, Wetzlar
Mikroskop DMLB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle Microwave 800	Severin, Sundern
Objektträger Superfrost-Plus	Menzel, Braunschweig
Ofen Tissue Drying Oven	Medite, Burgdorf
Pasteurpipetten	VWR International GmbH, Hannover
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
0.1-2.5, 0.5-10, 2-20, 20-200, 100-1000, 500-5000 µl	
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PP-Röhrchen und Tubes	
15, 50 ml, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Steri-Ofen +200°C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermorührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Thermoschüttler Certomat R	B.Braun Biotech International, Melsungen
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Tubes 0.5, 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Vortex-Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage BP 6100	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttler-Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
wasserfeste Stifte für Objektträgerbeschriftungen	
Multimark 1513 permanent	Farber-Castell, Stein
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Düsseldorf

3.1.4. Verwendete Reagenzien, Kits und Puffer für die immunhistochemischen Färbungen

<i>Reagenzien:</i>	<i>Hersteller:</i>
Aqua dest.	
Ethanol 100%, 96%, 80%	Walter CMP GmbH & Co.KG (Kiel, DE)
Eukitt	O. Kindler GmbH (Freiburg, DE)
Formamid	Fluka (München, DE)
HCl (1 N)	Merck (Darmstadt, DE)
HCl (2 N)	Merck (Darmstadt, DE)
HCl (37%)	Merck (Darmstadt, DE)
H ₂ O ₂ -Blocking Solution	Dako (Hamburg, DE)
Mayers Hämalaun	Merck (Darmstadt, DE)
Methanol	
NaOH (1 N)	Merck (Darmstadt, DE)
NaOH (2 N)	Merck (Darmstadt, DE)
NaCl	J.T. Baker (Griesheim, DE)
Proteinase K	Serva (Heidelberg, DE)
Tris (Trizma®Base)	Sigma (München, DE)
Trypsin-Tablets (1 mg)	Sigma (München, DE)
Tween-20	Sigma (München, DE)
Verdünnungsmedium (Antibody Diluent, Bestellnr.: S 2022)	Dako (Hamburg, DE)
Xylol C ₈ H ₁₀	Fluka (München, DE)
Zitratpuffer x 10 (ChemMate™Target Retrieval Solution)	Dako (Hamburg, DE)
Zitratpuffer	BioGenix
Zitratpuffer	Biocare Medical (Berlin, DE)

*Kits:**Hersteller:*

ChemMate™ Detektion Kit,
Peroxidase/DAB,
Bestellnr.: K 5001

Dako (Hamburg, DE)

- Lösung A: biotinylierter Sekundärantikörper
- Lösung B: Streptavidinperoxidase
- Lösung C: DAB + Chromogen
- Lösung D: HRP Substratpuffer

EnVision™ Detektion Kit,
Bestellnr.: K 5007

Dako (Hamburg, DE)

- Lösung A: HRP / Maus (Sekundärantikörper)
- Lösung B: Substratpuffer
- Lösung C: DAB + Chromogen

*Puffer:**Zusammensetzung:*

TBST-Puffer (10 x):

181,71 g Tris
262,98 g NaCl
15 g Tween-20
25% HCL (pH-Wert einstellen auf 7,6)
Aqua dest. (auf 3l auffüllen)

TEC-Puffer (20 x):

5 g Tris
10 g Titriplex III/EDTA
6,4 g Tri-Na-Citrat-2H₂O
pH-Wert einstellen auf 7,8
Aqua dest. (auf 1l auffüllen)

3.1.5. Verwendete Reagenzien und Puffer für die nicht-radioaktiven RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierungen

<i>Reagenzien:</i>	<i>Hersteller:</i>
Acetanhydrid	Merck (Darmstadt, DE)
Anti-Digoxigenin-AP (Sheep)	Roche (Mannheim, DE)
Aqua dest.	
BCIP/NBT	Roche (Mannheim, DE)
Denhardt`s	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
DEPC	Sigma (München, DE)
Dextransulfat	Sigma (München, DE)
DTT (1 M)	Sigma (München, DE)
EDTA	Sigma (München, DE)
Ethanol 100%, 96%, 80%	Walter CMP GmbH & Co.KG (Kiel, DE)
Eukitt	O. Kindler GmbH (Freiburg, DE)
Formamid	Fluka (München, DE)
Formamid (deionisiert)	Sigma (München, DE)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)
HCl (1 N)	Merck (Darmstadt, DE)
HCl (2 N)	Merck (Darmstadt, DE)
HCl (37%)	Merck (Darmstadt, DE)
Levamisol (400mg/ml)	Sigma (München, DE)
MgCl ₂	Fluka (München, DE)
NaCl	J.T. Baker (Griesheim, DE)
NaOH (1 N)	Merck (Darmstadt, DE)
NaOH (2 N)	Merck (Darmstadt, DE)
Nuclear Fast Red Counterstain	Vector (Lörrach, DE)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, DE)
Poly A	Roche (Mannheim, DE)
Polyvinylpyrrolidone	Sigma (München, DE)
Proteinase K	Serva (Heidelberg, DE)
RNase	Roche (Mannheim, DE)
RNaseZAP	Sigma (München, DE)

Schafserum	Sigma (München, DE)
SS-DNA Solution (10 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Triethanolamin	Fluka (München, DE)
Tris (Trizma®Base)	Sigma (München, DE)
TritonX-100	Sigma (München, DE)
t-RNA	Roche (Mannheim, DE)
Xylol C ₈ H ₁₀	Fluka (München, DE)

*Puffer und Lösungen:**Zusammensetzung:*

Acetylierungspuffer (0,1 M):	6,65 ml Triethanolamin 500 ml DEPC/H ₂ O mit 37% HCl auf pH-Wert 8 einstellen
DEPC/H ₂ O:	1l Aqua dest. 1 ml DEPC wenn DEPC aufgelöst ist autoklavieren
Detektionslösung:	10 ml Puffer 2 30 µl 0,3% TritonX-100 200 µl BCIP/NBT 16,3 µl Levamisol
DTT (1 M):	gebrauchsfertig von Sigma
20% Dextransulfat:	10 mg Dextransulfat 50 ml deion. Formamid
EDTA (0,5 M):	186,1 g EDTA DEPC/H ₂ O (auf 1l auffüllen) mit NaOH auf pH-Wert 8 einstellen autoklavieren
Formamid (deionisiert):	gebrauchsfertig von Sigma
Glycin/DEPC:	0,2 g Glycin 100 ml DEPC/H ₂ O
HCl (0,2 M):	20 ml HCl (2 M) DEPC/H ₂ O (auf 200 ml auffüllen)
Hybridisierungsmix:	20 mM Tris 0,3 M NaCl

	1 mM EDTA
	100 mM DTT
	10% Dextransulfat in 50% deion.
	Formamid
	1 % Denhardt`s
	100 µg/ml Poly A
	500 µg/ml SS-DNA
	500 µg/ml t-RNA
	DEPC/H ₂ O (auf 500 µl auffüllen)
	+ markierte Sonde (bei -80°C in der Gefriertruhe)
Hybridisierungspuffer:	0,3 M NaCl
	50% Formamid
	20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM EDTA
	10 mM DTT
	DEPC/H ₂ O (auf 200 ml auffüllen)
MgCl ₂ (3 M)	gebrauchsfertig von Fluka
NaCl (3 M):	175,3 g NaCl
	DEPC/H ₂ O (auf 1l auffüllen)
	autoklavieren
Nuclear Fast Red:	gebrauchsfertig von Vector
4% Paraformaldehyd:	6 g PFA
	PBS/DEPC (auf 200 ml auffüllen)
	auf 60°C erwärmen
	1 M NaOH dazugeben, bis sich PFA vollständig gelöst hat
	auf 4°C abkühlen
	mit 2N HCl auf pH-Wert 7,4 einstellen
	im Kühlschrank bei 4°C lagern
PBS/DEPC (10 x):	90 g NaCl
	14,33 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	2,67 g KH ₂ PO ₄
	DEPC/H ₂ O (auf 1l auffüllen)

Poly A (10 mg/ml):	Konzentration mit DEPC/H ₂ O einstellen
Prähybridisierungsmix:	20 mM Tris (pH 7,4) 0,3 M NaCl 1 mM EDTA 100 mM DTT 50% deion. Formamid 1% Denhardt`s 100 µg/ml Poly A 500 µg/ml SS-DNA 500 µg/ml t-RNA DEPC/H ₂ O (auf 2 ml auffüllen)
Proteinase K (10 mg/ml):	Konzentration mit DEPC/H ₂ O einstellen
Proteinase K-Puffer:	100 mM Tris (pH 7,4) 50 mM EDTA DEPC/H ₂ O (auf 400 ml auffüllen)
Puffer 1 (pH 7,5):	0,1 M Tris (pH 7,4) 0,15 M NaCl Aqua dest. (auf 1l auffüllen)
Puffer 2 (pH 9,5):	0,1 M Tris (pH 7,4) 0,1 M NaCl 50 mM MgCl Aqua dest. (auf 300 ml auffüllen)
RNase-Puffer:	0,5 M NaCl 10 mM Tris (pH 7,5) 1 mM EDTA Aqua dest. (auf 400 ml auffüllen)
Sheep-Anti-Dig-AP-Mix:	1 µl Sheep-Anti-Dig-AP 15 µl 0,3% TritonX-100 50 µl Schafsserum 5000 µl Puffer 1
SSC (20 x):	175,3 g NaCl 88,2 g Sodiumcitrat-Dihydrat DEPC/H ₂ O (auf 1l auffüllen) mit NaOH auf pH-Wert 7 einstellen

	autoklavieren
SS-DNA (20 mg/ml):	Konzentration mit DEPC/H ₂ O einstellen
Stopp-Puffer (pH 7,5):	10 mM Tris (pH 7,4) 1 mM EDTA Aqua dest. (auf 200 ml auffüllen)
Tris/HCL (1 M):	121,1 g Tris DEPC/H ₂ O (auf 1l auffüllen) mit 37% HCl auf pH-Wert 7,4 einstellen autoklavieren
t-RNA (20 mg/ml):	Konzentration mit DEPC/H ₂ O einstellen
0,3% TritonX-100:	600 µl TritonX-100 PBS/DEPC (auf 200 ml auffüllen)

3.2. Methoden

Zum Nachweis der Expression der einzelnen Faktoren wurden die RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierung sowie immunhistochemische Analysen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden dann mit den Ergebnissen des Tumorzellnachweises in Blut und Knochenmark verglichen.

3.2.1. Anfertigung der Paraffinschnitte

Die Tumoren standen mir als in Paraffin eingebettete Blöcke zur Verfügung. Von diesen Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt, die dann auf Objektträger (Superfrost-Plus, Menzel) aufgezogen wurden.

3.2.2. Immunhistochemische Analysen

Alle Tumoren wurden immunhistochemisch mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Zur Optimierung der immunhistochemischen Färbungen wurden verschiedene Ansätze, welche die Vorbehandlungen, die Konzentrationen und die Inkubationszeiten betreffen, verwendet:

<i>Antikörper:</i>	<i>Konzentration:</i>	<i>Vorbehandlung:</i>	<i>Methode:</i>	<i>Inkubationszeit des Primärantikörpers:</i>
34βE12	1:100	- Dampfkocher (120°C, 5 min.) - Zitratpuffer (Dako)	ChemMate™ Detektion Kit	über Nacht bei 4°C
ALDH-1	1:500	- Dampfkocher (120°C, 5 min.) - Zitratpuffer (Dako)	ChemMate™ Detektion Kit	über Nacht bei 4°C
p53	1:2000	- Mikrowelle (800 W, 20min.) - TEC-Puffer	ChemMate™ Detektion Kit	30 min. bei Raumtemperatur
EGFR	1:20	- Proteinase K-Verdau	EnVision™ Detektion Kit	über Nacht bei 4°C
EMMPRIN	1:1000	- Mikrowelle (800 W, 20min.) - Zitratpuffer (Dako)	EnVision™ Detektion Kit	30 min. bei Raumtemperatur
EpCAM	1:75	-Trypsin-Verdau	EnVision™ Detektion Kit	60 min. bei Raumtemperatur

p63	1:100	- Dampfkocher (120°C, 5 min.) - Zitratpuffer (BioGenix)	EnVision™ Detektion Kit	45 min. bei Raumtemperatur
-----	-------	--	----------------------------	-------------------------------

Für die immunhistochemischen Untersuchungen haben wir 2 verschiedene Detektionssysteme verwendet, die im Folgenden beschrieben werden:

ChemMate™ Detektion Kit

1. Entparaffinierung:
 - die Objektträger werden 1 Stunde bei 60°C gebacken
 - 2 x 10 min. in Xylol spülen
 - 2 x 1 min. in 100% Ethanol spülen
 - 2 x 1 min. in 96% Ethanol spülen
 - 2 x 1 min. in 80% Ethanol spülen
 - kurz in Aqua dest. spülen

2. Vorbehandlung:
 - 34ßE12, ALDH-1, p63:
bei 120°C für 5 Minuten im Dampfkocher behandeln, dafür Plastikbehältnisse verwenden, Zitratpuffer (Dako oder BioGenix) zu den Objektträgern geben, 120 ml Aqua dest. direkt in den Dampfkocher geben, Deckel des Dampfkochers fest verschließen und den Druckanstieg beobachten (muss Drücke über 20 psi erreichen)

 - p53, EMMPRIN:
Vorbehandlung in der Mikrowelle bei 800 W für 20 Minuten, dafür Plastikbehältnisse verwenden, bei p53 TEC-Puffer und bei EMMPRIN Zitratpuffer (Dako) zu den Objektträgern geben, in einem Extrabehälter 50% Puffer und 50% Aqua dest. mischen und ebenfalls in der Mikrowelle kochen lassen, bei Verdunstungen auf die Objektträger gießen

- EGFR:

2-3 Tropfen Proteinase K auf Objektträger geben und Inkubation für 6 Minuten in feuchter Kammer

- EpCAM:

Objektträger in feuchte Kammer legen, eine Trypsin-Tablette in 1 ml Aqua dest. lösen, auf die Objektträger verteilen, 10 Minuten bei 37°C inkubieren

3. 3 Minuten in 1 x TBST waschen

4. Primärantikörper:

Pro Objektträger werden 150 µl Lösung benötigt

- 34ßE12:

Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:100 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubieren.

- p53:

Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:2000 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

- ALDH-1:

Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:500 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubieren.

5. 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen

6. Detektion:

- Objektträger in feuchte Kammer legen

- 10 Minuten mit Lösung A inkubieren

- 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen
 - 5 Minuten H₂O₂-Blocking durchführen
 - 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen
 - 10 Minuten mit Lösung B inkubieren
 - 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen
 - 10 Minuten mit DAB (1:50 Verdünnung von Lösung C in Lösung D) inkubieren
 - kurz in Aqua dest. waschen
9. Gegenfärbung:
- Objektträger 2 Sekunden in Hämalaun tauchen
 - 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen
 - kurz in Aqua dest. spülen
10. Entwässern:
- Objektträger 2 x kurz mit 80% Ethanol spülen
 - Objektträger 2 x kurz mit 96% Ethanol spülen
 - Objektträger 2 x 2 min. mit 100% Ethanol spülen
 - Objektträger 2 x 2 min. mit Xylol spülen
11. Eindeckeln:
- 1 Tropfen Eukitt auf ein Deckglas geben
 - das Deckglas auf dem Objektträger anbringen
 - Luftbläschen vermeiden

EnVision™ Detektion Kit

1. Entparaffinierung:
 - siehe oben (ChemMate™ Detektion Kit)
2. Vorbehandlung:
 - siehe oben (ChemMate™ Detektion Kit)
3. 5 Minuten in Aqua dest. waschen

4. 3 Minuten in 1 x TBST waschen
5. 5 Minuten H₂O₂-Blocking durchführen
6. 3 Minuten in 1 x TBST waschen
7. Primärantikörper:
Pro Objektträger werden 150 µl Lösung benötigt
 - EMMPRIN:
Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:1000 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
 - EGFR:
Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:20 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, über Nacht im Kühlschrank bei +4°C inkubieren.
 - EpCAM:
Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:75 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
 - p63:
Objektträger in feuchte Kammer legen, den Antikörper 1:100 mit dem Verdünnungsmedium verdünnen, 150 µl Gemisch auf jeden Objektträger geben, 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen
9. Detektion:
 - Objektträger in feuchte Kammer legen
 - 10 Minuten mit Lösung A inkubieren
 - 3 x 3 Minuten in 1 x TBST waschen

- 10 Minuten mit DAB (1:50 Verdünnung von Lösung B in Lösung C) inkubieren
 - kurz in Aqua dest. waschen
9. Gegenfärbung:
- siehe oben (ChemMate™ Detektion Kit)
10. Entwässern:
- siehe oben (ChemMate™ Detektion Kit)
11. Eindeckeln:
- siehe oben (ChemMate™ Detektion Kit)

3.2.3. Nicht-radioaktive RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierungen

Mit Hilfe der RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierung ist es möglich, mRNA in Gewebeschnitten nachzuweisen. Um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten, müssen der Arbeitsplatz und alle benötigten Materialien stets vor Kontaminationen geschützt werden. Der Arbeitsplatz muss gründlich mit RNaseZAP (zerstört RNase) gesäubert werden. Bei jedem Arbeitsschritt müssen Handschuhe getragen werden.

Alle Glasbehälter werden bei 200°C für 4-5 Stunden gebacken. Alle weiteren Materialien, die verwendet werden, müssen ebenfalls steril sein.

Für alle Lösungen wird ausschließlich DEPC/H₂O verwendet.

Bei der RNA/RNA-*in situ*-Hybridisierung werden pro Tumor 2 Objektträger eingesetzt (Sense und Antisense).

3.2.3.1. Teil 1 (1. Tag)

1. Entparaffinierung:
- Objektträger 1 Stunde bei 60°C backen
(im RNase-freien Ofen)
 - Objektträger 2 x 10 min. in Xylol spülen
 - Objektträger 2 x 2 min. in 100% Ethanol spülen

- Objektträger 2 x 2 min. in 96% Ethanol spülen
 - Objektträger 2 x 2 min. in 80% Ethanol spülen
 - Objektträger 2 x 2 min. in 30% Ethanol spülen
 - Objektträger 5 min. in DEPC/H₂O spülen
2. 0,2 N HCl für 20 Minuten bei Raumtemperatur
 3. 0,3% TritonX für 15 Minuten bei Raumtemperatur
 4. Proteinase-K-Puffer für 30 Minuten bei 37°C im S chüttler-Wasserbad
 5. Proteinase-K-Puffer mit Proteinase K (5 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C im Schüttler-Wasserbad
 6. Abstoppen mit eiskaltem 0,2% Glycin für 1 Minute
 7. Postfixierung mit eiskalter 4% Paraformaldehydlösung für 5 Minuten
 8. DEPC/H₂O für 5 Minuten bei Raumtemperatur
 9. Äquilibrierung mit 0,1 M Acetylierungspuffer für 3 Minuten bei Raumtemperatur
 10. Acetylierung mit 0,1 M Acetylierungspuffer mit Acetanhydrid (1ml auf 200ml Acetylierungspuffer) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
 11. in 2 x SSC/DEPC für 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen
 12. Objektträger 1 Stunde im RNase-freien Ofen bei 50°C trocknen lassen
 13. Objektträger in feuchte Kammer sortieren
 14. 100 µl/Objektträger Prähybridisierungsmix direkt auf den Tumor geben und 2 Stunden im Hybridisierungssofen bei 52°C inkubieren

(wichtig: SS-DNA vor dem Gebrauch auf 95°C erwärmen und danach auf Eis legen)

16. 30 µl/Objektträger Hybridisierungsmix direkt auf den Tumor geben:
29 µl Hybridisierungsmix und 1-1,5 µl Sonde –
Achtung: den Hybridisierungsmix in verschiedene Tubes pipettieren und jeweils die spezifische Sonde dazu geben (Antisense/Sense)
17. Objektträger mit Deckgläsern abdecken und über Nacht im Hybridisierungssofen bei 52°C inkubieren
(Feuchte Kammern zum Schutz vor Austrocknung mit Plastikfolie verschließen)

3.2.3.2. Teil 2 (2. Tag)

1. Objektträger aus dem Hybridisierungssofen entnehmen und Deckgläser entfernen
2. in 2 x SSC/DEPC für 15 Minuten bei Raumtemperatur waschen
3. mit Hybridisierungspuffer 10 Minuten bei 60°C im Schüttler-Wasserbad waschen
4. RNase-Puffer mit RNase (100 µl RNase auf 200 ml RNase-Puffer) für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank

(ab hier keine RNase-freien Materialien bzw. DEPC/H₂O mehr benötigt!)

5. RNase-Puffer für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank
6. in 2 x SSC für 3 Minuten bei Raumtemperatur waschen
7. in 0,1 x SSC für 15 Minuten im Wasserbad bei 52°C waschen

8. in 0,1 x SSC für 10 Minuten bei Raumtemperatur äquilibrieren
9. Puffer 1 für 5 Minuten bei Raumtemperatur
10. Objektträger in feuchte Kammer sortieren
11. mit normalem Schafserum (20% in Puffer 1 verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur blocken
12. kurz in Puffer 1 waschen
13. mit Sheep-Anti-Dig-AP-Mix 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
14. 2 x 15 Minuten in Puffer 1 waschen
15. 1 x 15 Minuten in Puffer 2 waschen
16. Objektträger in feuchte Kammer sortieren
17. mit Detektionslösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren (unter Lichtschutz)

3.2.3.3. Teil 3 (3. Tag)

1. Objektträger herausnehmen und mikroskopisch die Signalintensität beurteilen → wenn ausreichend: abstoppen (siehe unten)
→ wenn nicht ausreichend: neue Detektionslösung ansetzen und damit wieder über Nacht inkubieren
2. mit Stopp-Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur abstoppen
3. gegenfärben mit Nuclear Fast Red (filtriert) für 10 Minuten bei Raumtemperatur

4. kurz in Aqua dest. waschen

5. Entwässerung durchführen:
 - die Objektträger 2 x kurz mit 80% Ethanol spülen
 - die Objektträger 2 x kurz mit 96% Ethanol spülen
 - die Objektträger 2 x 2 min. mit 100% Ethanol spülen
 - die Objektträger 2 x 2 min. mit Xylol spülen

6. Eindeckeln:
 - 1 Tropfen Eukitt auf ein Deckglas geben
 - das Deckglas auf dem Objektträger anbringen
 - Luftbläschen vermeiden

3.2.4. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). Die Berechnung möglicher Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde mit dem χ^2 -Test oder dem exakten Test nach Fisher durchgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte entweder mit dem U-Test nach Mann und Whitney oder dem T-Test. Zweiseitige p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Ergebnisse

4.1. Tumorentstehung

Die für die Tumorentwicklung benötigten Zeiten sind in den Tabellen 9 und 10 in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie aufgelistet. Diese wurden als die Zeit zwischen dem Tag der Xenografttransplantation der Tumorzellen in die SCID-Mäuse und dem Tag der Tumorentnahme berechnet. Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 entwickelten sich in den SCID-Mäusen nach durchschnittlich 42 Tagen und somit signifikant schneller als Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 nach durchschnittlich 72 Tagen (Tabellen 9 und 10, $p < 0,0001$).

Hinsichtlich der Morphologie der Tumoren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie. Es handelte sich jeweils um mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome (G2).

Tabelle 9: Dauer der Tumorentwicklung in den SCID-Mäusen (vom Tag der Xenograftimplantation bis zum Tag der Tumorentnahme) für die Zelllinie VU-SCC-OE-267

Klon:	Tumor:	Implantations-Datum:	Entnahme-Datum:	Tumorentwicklungsdauer:
1	380-06	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
1	387-1	25.10.2006	01.12.2006	37 Tage / 5,5 Wochen
1	387-2	25.10.2006	01.12.2006	37 Tage / 5,5 Wochen
1	387-3	25.10.2006	01.12.2006	37 Tage / 5,5 Wochen
1	390-06	25.10.2006	04.12.2006	40 Tage / 5,5 Wochen
2	382-06	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
2	389-1	25.10.2006	04.12.2006	40 Tage / 5,5 Wochen
2	389-2	25.10.2006	04.12.2006	40 Tage / 5,5 Wochen
2	389-3	25.10.2006	04.12.2006	40 Tage / 5,5 Wochen
2	391-06	25.10.2006	08.12.2006	44 Tage / 6,5 Wochen
3	358-1	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
3	358-2	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
3	358-3	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
3	358-4	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
3	358-5	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
4	359-06	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
4	378-1	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
4	378-2	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
4	388-06	25.10.2006	01.12.2006	37 Tage / 5,5 Wochen
5	360-1	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
5	360-2	25.10.2006	24.11.2006	30 Tage / 4,5 Wochen
5	379-1	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
5	379-2	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
5	379-3	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
267	2-1-07	25.10.2006	02.01.2007	69 Tage / 9,5 Wochen
267	19-0-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
267	19-1-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
267	19-2-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
267	19-3-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
267	19-4-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
267 AZ'	267-A-05	27.07.2005	07.09.2005	42 Tage / 6 Wochen

AZ': Ausgangszelllinie

Tabelle 10: Dauer der Tumorentwicklung in den SCID-Mäusen (vom Tag der Xenograftimplantation bis zum Tag der Tumorentnahme) für die Zelllinie 93VU120T-308

Klon:	Tumor:	Implantations-Datum:	Entnahme-Datum:	Tumorentwicklungsdauer:
1	381-06	25.10.2006	29.11.2006	35 Tage / 5 Wochen
1	392-1	25.10.2006	08.12.2006	44 Tage / 6,5 Wochen
1	392-2	25.10.2006	08.12.2006	44 Tage / 6,5 Wochen
1	433-06	25.10.2006	27.12.2006	63 Tage / 9 Wochen
2	20-2-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
2	25-1-07	25.10.2006	24.01.2007	91 Tage / 13 Wochen
2	85-1-07	25.10.2006	20.02.2007	118 Tage / 16,5 Wochen
3	394-06	25.10.2006	08.12.2006	44 Tage / 6,5 Wochen
3	432-06	25.10.2006	27.12.2006	63 Tage / 9 Wochen
4	1-1-07	25.10.2006	02.01.2007	69 Tage / 9,5 Wochen
4	1-2-07	25.10.2006	02.01.2007	69 Tage / 9,5 Wochen
4	20-1-07	25.10.2006	16.01.2007	73 Tage / 11,5 Wochen
4	26-1-07	25.10.2006	24.01.2007	91 Tage / 13 Wochen
4	26-2-07	25.10.2006	24.01.2007	91 Tage / 13 Wochen
5	393-06	25.10.2006	08.12.2006	44 Tage / 6,5 Wochen
5	14-1-07	25.10.2006	10.01.2007	77 Tage / 11 Wochen
5	15-1-07	25.10.2006	10.01.2007	77 Tage / 11 Wochen
5	15-2-07	25.10.2006	10.01.2007	77 Tage / 11 Wochen
5	34-07	25.10.2006	05.02.2007	103 Tage / 14,5 Wochen
5	35-07	25.10.2006	05.02.2007	103 Tage / 14,5 Wochen
308 AZ'	308-A-05	27.07.2005	23.09.2005	58 Tage / 9,5 Wochen

AZ': Ausgangszelllinie

Tabelle 11 : Mittelwerte der Tumorentstehungszeiten für die Klone der Zelllinien VU-SCC-OE-267 und 93VU120T-308

Zelllinie: VU-SCC-OE-267		Zelllinie: 93VU120T-308	
Klon 1	37,2 Tage	Klon 1	46,5 Tage
Klon 2	39,8 Tage	Klon 2	94 Tage
Klon 3	30 Tage	Klon 3	53,5 Tage
Klon 4	34,3 Tage	Klon 4	78,6 Tage
Klon 5	33 Tage	Klon 5	80,2 Tage
AZ	68 Tage	AZ	58 Tage

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

Die Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 entstanden in 30 bis 73 Tagen (4,5 bis 11,5 Wochen). Dabei entwickelten sich 24 von 31 (77%) Tumoren schon vor der 6. Woche nach Tumorzellimplantation, und nur 7/31 (23%) Tumoren formierten sich danach. Tumoren, die sich aus den Zelllinienklonen, also nach einer weiteren Passage in der SCID-Maus, entwickelt haben, benötigten signifikant weniger Zeit (30 bis 40 Tage) für ihre Entstehung als Tumoren, die sich aus der Ausgangszelllinie entwickelt haben (68 Tage, $p < 0,0001$).

Die Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 entstanden zwischen dem 35. und dem 118. Tag (5 bis 16,5 Wochen) nach der Tumorzellimplantation. Hier entstand lediglich ein Tumor vor der 6. Woche nach Tumorzellimplantation (5%), und alle weiteren Tumoren (20/21, 95%) bildeten sich danach. Auch bei dieser Zelllinie unterschieden sich die Tumorentwicklungszeiten in Abhängigkeit vom Zelllinienklon ($p = 0,035$), wobei sich Tumoren der Klone 1 und 3 am schnellsten (durchschnittlich 47 und 54 Tage) bildeten. Tumoren der Klone 2 und 5 benötigten dagegen eine signifikant längere Zeit mit durchschnittlich 94 bzw. 80 Tagen (Tabelle 11).

4.2. Auswertungsschema

Die immunhistochemisch und über RNA-*in situ*-Hybridisierung bearbeiteten Tumorschnittpräparate wurden mikroskopisch ausgewertet. Um die Tumoren untereinander vergleichen zu können, wurde das in Tabelle 12 dargestellte Auswertungsschema verwendet. Hierbei wurde die Intensität der Signale in die Stufen 1 bis 3 eingeteilt, während die Anzahl der positiven Zellen in die Gruppen 1 bis 4 eingestuft wurde (Remmele-Score, Remmele and Stegner, 1987 [138]).

Tabelle 12: Schema der mikroskopischen Auswertung

Auswertungsschema:				
1. Intensität:	0	1	2	3
	keine Färbung	schwach	mäßig	stark
2. Ausdehnung: (Anzahl positiver Zellen in %)	1	2	3	4
	<10%	≥10-50%	≥50-80%	≥80-100%

4.3. Anzahl der untersuchten Tumoren

Da nicht alle xenotransplantierten SCID-Mäuse Tumoren bildeten, variiert die Anzahl der verfügbaren Tumoren pro Klon der entsprechenden Zelllinien.

Die vorhandenen Tumoren jedes einzelnen Klons jeder der Zelllinien wurden im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 13).

Tabelle 13: Anzahl an Tumoren pro Zelllinienklon

	Zelllinie VU-SCC-OE-267:	Zelllinie 93VU120T-308:
Klon 1	5	4
Klon 2	5	3
Klon 3	5	2
Klon 4	4	5
Klon 5	5	6
Tumore der Ausgangszelllinien (AZ)	7	1
insgesamt	31	21

4.4. Auswertung aller Tumoren und Faktoren

4.4.1. Separate Auflistung der Intensität und des Anteils positiver Zellen für alle immunhistochemisch und über ISH untersuchten Faktoren

In Tabelle 14 und 15 wurden alle Ergebnisse der einzelnen Tumoren zusammengefasst. Dabei steht die erste Ziffer für die Intensität der Färbung (Stufen 0 – 3) und die zweite Ziffer für die Anzahl positiver Zellen (Stufen 1 – 4).

Tabelle 14: Auswertung der Tumorschnittpräparate der von der Zelllinie VU-SCC-OE-267 abstammenden Tumoren

267 Klon :	Nr:	MMP 1	MMP 9	Adam 17	TIMP 3	34ßE12	ALDH 1	EGFR	EpCAM	Emmprin	P53	P63
1	380-06	0	0	0		3/3	3/3	3/3	3/3	2/2		0
1	387-1	0	0	0		3/4	3/3	3/4	3/3-	2/3		3/3
1	387-2	0	2/1	2/1		2/3	3/4	3/4	3/3	3/4		3/4
1	387-3	0	0	1/2		3/3	3/3	2/3	2/3	2/2		3/3
1	390-06	0	2/2	0	3/4	3/4	3/4	3/3	3/3	2/2		3/3
2	382-06	0	0	1/2		3/3	2/3	3/3	3/3	2/2		2/3
2	389-1	0	3/3	0		3/3	2/3	2/3	3/3	2/3		3/3
2	389-2	0	1/1	2-3/1-2		3/4	3/3	3/3	3/3	3/2		3/3
2	389-3	0	0	0		3/3	3/4	3/4	3/3	2-3/3		3/3
2	391-06	0	3/2			3/3	3/3	3/4	3/3-	2/1		3/3
3	358-1	0	0	1/2		3/4	3/3	1/3	2/3	3/3	0	3/4
3	358-2	1/2	0	0		3/3	1/2	3/3	2/2	1/2		2/2
3	358-3	1/2	1/2	0		3/3	3/3	3/3	3/3	2/2		3/3
3	358-4	0	0	0	3/2	2/3	2/3	3/4	2/3	2/2		3/4
3	358-5	0	0	0		3/3	2/3	1/3	2/3	2/2		3/2
4	359-06	0	0	0		3/3	2/3	1/3	2/3	2/2		3/3
4	378-1	0	0	2/2		1/3	2/3	2/3	2/2	2/2		2/2
4	378-2	0	2/1	2/3		3/3	2/3	3/3	2/2	1/1		2/3
4	388-06	0	2/2	0		3/3	3/4	3/4	3/3	0		3/3
5	360-1	0	1/1	1/2		3/4	3/3	3/3	3/3	2/3		2/3
5	360-2	0	0	0		3/3	3/4	1/3	2-3/3	2/1		2/4
5	379-1	0	1/3	2/3		3/4	3/3	3/4	3/3	1/2		2/3
5	379-2	0	0	0		3/3	3/2	1/3	3/3	0		3/3
5	379-3	0	0	2/2		3/3	2/2	3/3	3/3	1/2		2/2
267	2-1-07	0	0	2/3		3/3	3/4	3/3	1/1	3/2		3/3
267	19-0-07	0	1/1	0	1/1	1-2/2-3	3/4	3/4	2/3	1/2		3/3
267	19-1-07	0	0	0		3/4	3/3	2/3	1-2/2	2/2		3/3
267	19-2-07	0	1-2/1	0		3/3	3/3	2/3	2/3	3/4		3/3
267	19-3-07	2/1	1/2	0	2/2	3/3	3/4	3/4	2/3	3/3		3/3
267	19-4-07	0	0			2/3	3/4	3/4	2/3	2/2		3/3
267 AZ'	267-A-05			1/2	3/3	2-3/3	3/3	3/3	3/3	3/2	0	3/3

AZ': Ausgangszelllinie

Leere Zellen: keine Analyse durchgeführt

Tabelle 15: Auswertung der Tumorschnittpräparate der von der Zelllinie 93VU120T-308 abstammenden Tumoren

308 Klon :	Nr:	MMP 1	MMP 9	Adam 17	TIMP 3	34ßE12	ALDH 1	EGFR	EpCAM	Emmprin	P53	P63
1	381-06	2/2	1/2	0		2/4	0	3/4	2/2	1/1		0
1	392-1		1/2	2/4		3/3	0	3/4	2/2			3/3
1	392-2	0	2/2	2-3/3		2/3	0	3/3	1/1	2/2		3/3
1	433-06	3/4	3/2-3	3/4		3/3	0	3/3	2/2	3/3		3/3
2	20-2-07	2/1	0	0	3/3	3/3	2/1	3/3	2/2	2/2		3/3
2	25-1-07	3/3	0	2/4		3/3	2/2	3/3	2/2	1-2/2		3/3
2	85-1-07	0	0	3/4		3/3	3/1	3/4	2/3	2/3		3/3
3	394-06	2/1	0	0	0	2/3	0	3/4	0	2/3		3/3
3	432-06	2/1	0	0		3/4	0	3/4	2/2	2/2		3/3
4	1-1-07	2/1	1/2	2/3		3/4	0	3/4	2/2	2/2		3/3
4	1-2-07	1/1	1/1	2/4		3/4	0	2/4	1/2	0		3/3
4	20-1-07	3/3	0	1/1	3/3	3/3	3/1	2/2	2/1	1/2		3/3
4	26-1-07	2/2	0	0	3/2	3/3	0	3/3	2/2	2/2	3/3	3/3
4	26-2-07	2/1	0	0		3/3	2/1	3/4	2/2	3/3		3/3
5	393-06	3/3	1/1	0		3/3	0	3/3	2/2	1/2		3/3
5	14-1-07	2/2	2/2	0		3/4	3/1	3/4	2/2	1/3		3/3
5	15-1-07	3/4	0	1/2		3/3	2/2	3/4	2/2-	1-2/2		3/3
5	15-2-07	3/4	0	2/3		2/3	2/1	3/4	2/2	3/2		3/3
5	34-07	2/1	0	3/4		3/3	3/1	3/4	2/2	3/2		3/3
5	35-07	2/1	0	1/2		3/4	1-2/1	3/4	2/2	2/2		3/3
308 AZ'	308-A-05			1/2	2/2	3/4	2/2	3/3	2/2	1/2	3/3	3/3

AZ': Ausgangszelllinie

Leere Zellen: keine Analyse durchgeführt

4.4.2. Auswertung der Immunfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen nach dem Remmele-Score

Die Werte für die Intensität und die Ausdehnung der spezifischen Signale wurden miteinander multipliziert. Diese Werte sind in Tabelle 16 und 17 dargestellt.

**Tabelle 16: Auswertung der einzelnen Faktoren nach dem Remmele-Score
(Zelllinie VU-SCC-OE-267)**

267 Klon:	Nr:	MMP 1	MMP 9	Adam 17	TIMP 3	34BE12	ALDH 1	EGFR	EpCAM	Emmprin	P53	P63
1	380-06	0	0	0		9	9	9	9	4		0
1	387-1	0	0	0		12	9	12	9	6		9
1	387-2	0	2	2		6	12	12	9	12		12
1	387-3	0	0	2		9	9	6	6	4		9
1	390-06	0	4	0	12	12	12	9	9	4		9
2	382-06	0	0	1		9	6	9	9	4		6
2	389-1	0	9	0		9	6	6	9	6		9
2	389-2	0	1	6		12	9	9	9	6		9
2	389-3	0	0	3		9	12	12	9	9		9
2	391-06	0	6			9	9	12	9	2		9
3	358-1	0	0	1		12	9	3	6	9	0	12
3	358-2	2	0	0		9	2	9	4	2		4
3	358-3	2	2	0		9	9	9	6	4		9
3	358-4	0	0	0	6	6	6	12	6	4		12
3	358-5	0	0	0		9	6	3	6	4		6
4	359-06	0	0	0		9	6	3	6	4		9
4	378-1	0	0	12		3	6	6	4	4		4
4	378-2	0	2	6		9	6	9	4	1		6
4	388-06	0	4	0		9	12	12	9	0		9
5	360-1	0	1	0		12	9	9	9	6		6
5	360-2	0	0	0		9	12	3	9	2		8
5	379-1	0	3	6		12	9	12	9	2		6
5	379-2	0	0	0		9	6	3	9	0		9
5	379-3	0	0	4		9	4	9	9	2		4
267	2-1-07	0	0	6		9	12	9	1	6		9
267	19-0-07	0	1	0	1	4	12	12	6	2		9
267	19-1-07	0	0	0		12	9	6	4	4		9
267	19-2-07	0	2			9	9	6	6	12		9
267	19-3-07	2	2	0	4	9	12	12	6	9		9
267	19-4-07	0	0			6	12	12	6	4		9
267 AZ'	267-A-05			2	9	9	9	9	9	6	0	9

AZ': Ausgangszelllinie

Leere Zellen: keine Analyse durchgeführt

**Tabelle 17: Auswertung der einzelnen Faktoren nach dem Remmele-Score
(Zelllinie 93VU120T-308)**

308 Klon:	Nr:	MMP 1	MMP 9	Adam 17	TIMP 3	34BE12	ALDH 1	EGFR	EpCAM	Emmprin	P53	P63
1	381-06	4	2	0		8	0	12	4	1		0
1	392-1		2	8		9	0	12	4			9
1	392-2	0	4	4		6	0	9	1	4		9
1	433-06	12	9	12		9	0	9	4	9		9
2	20-2-07.	2	0	0	9	9	2	9	4	4		9
2	25-1-07.	9	0	8		9	4	9	4	4		9
2	85-1-07	0	0	12		9	3	12	6	6		9
3	394-06	2	0	0	0	6	0	12	0	6		9
3	432-06	2	0	0		12	0	12	4	4		9
4	1-1-07	2	2	6		12	0	12	4	4		9
4	1-2-07	1	1	8		12	0	8	2	0		9
4	20-1-07	9	0	6	9	9	3	4	2	2		9
4	26-1-07	4	0	0	6	9	0	9	4	4	9	9
4	26-2-07	2	0	0		9	2	12	4	9		9
5	393-06	9	1	0		9	0	9	4	2		9
5	14-1-07	4	4	0		12	3	12	4	3		9
5	15-1-07	12	0	3		9	4	12	4	4		9
5	15-2-07	12	0	3		6	2	12	4	6		9
5	34-07	2	0	12		9	3	12	4	6		9
5	35-07	2	0	0		12	2	12	4	4		9
308 AZ'	308-A-05			2	4	12	4	9	4	2	9	9

AZ': Ausgangszelllinie

Leere Zellen: keine Analyse durchgeführt

4.4.2.1. MMP 1

Insgesamt 20 der untersuchten 49 Tumoren erwiesen sich als MMP 1-mRNA-positiv (20/49, 41%). Darunter befanden sich 3 Tumoren, die aus der Ausgangszelllinie VU-SCC-OE-267 hervorgegangen waren (3/30, 10%, Tabelle 18). Die Expression war deutlich auf die Tumorzellen begrenzt. Die meisten Tumoren dieser Zelllinie waren jedoch MMP 1-mRNA-negativ (Abbildung 6). Derivate der Zelllinie 93VU120T-308 wiesen hingegen in 17/19 Fällen eine MMP 1-mRNA-Expression auf (89 %). Der am stärksten exprimierende Klon dieser Zelllinie war der Klon Nummer 5. Mäßig und stark MMP 1-exprimierende

Tumoren fanden sich lediglich in der Gruppe der 93VU120T-308-Derivate (Abbildung 4 und 5). Sowohl die durchschnittlichen MMP 1-Score-Werte aller Tumoren (Tabellen 16 und 17, $p < 0,0001$) als auch die Anzahl der MMP 1-negativen sowie schwach bis stark MMP 1-positiven Tumoren (Tabelle 18, $p < 0,0001$) unterschieden sich signifikant zwischen Tumoren der beiden getesteten Zelllinien.

Tabelle 18: Anzahl MMP 1-mRNA-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	5	-	-	-	1	-	1	1
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	5	-	-	-	1	1	-	1
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	3	2	-	-	-	2	-	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	4	-	-	-	-	3	1	1
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	5	-	-	-	-	2	1	3
AZ VU-SCC-OE-267: 6 93VU120T-308: 0	5	1	-	-	-	-	-	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

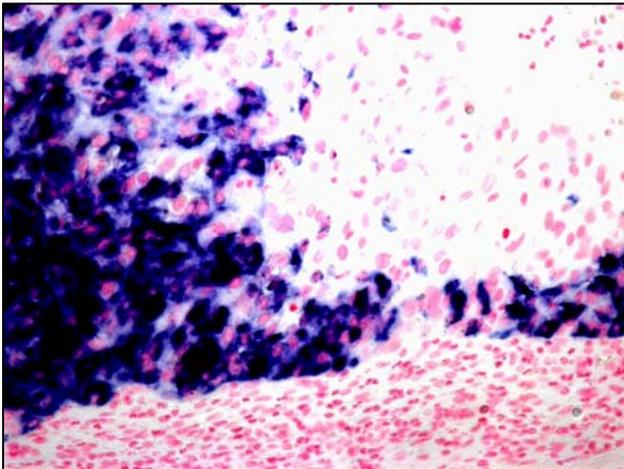


Abbildung 4:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 15-2-07 → MMP 1 Antisense

Starke Expression in den
Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

Abbildung 5:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 15-2-07 → MMP 1 Sense

Negativkontrolle: Keine
Hybridisierungs-spezifischen
Signale detektierbar
(200fache Vergrößerung)

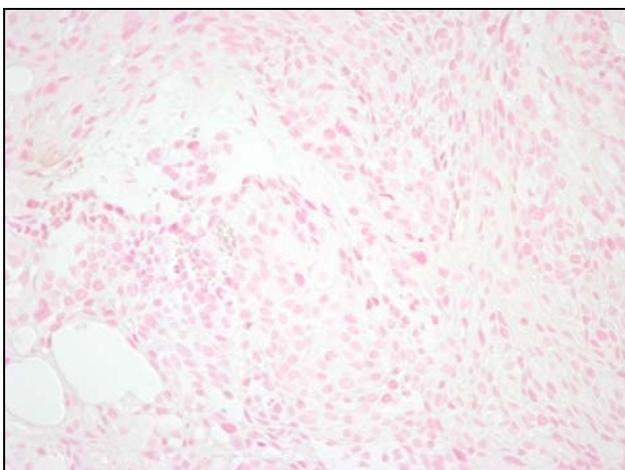
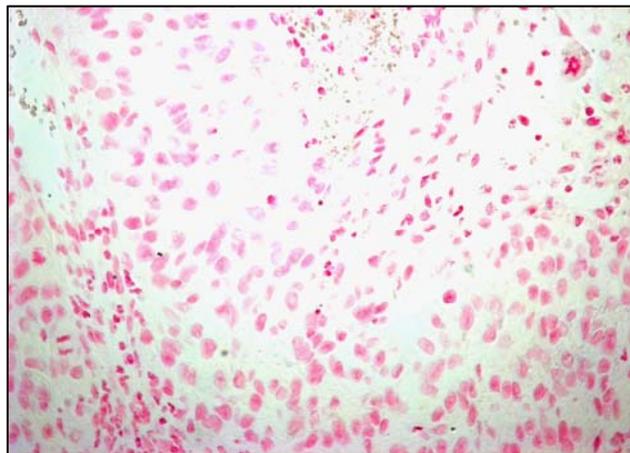


Abbildung 6:

VU-SCC-OE-267

Klon 4

Tumor 378-2 → MMP 1 Antisense

Keine Hybridisierungs-spezifischen
Signale detektierbar
(200fache Vergrößerung)

4.4.2.2. MMP 9

Rund 42% der 50 getesteten Tumoren waren MMP 9-positiv (21/50). Tumoren, die von der Zelllinie VU-SCC-OE-267 abstammten, waren in 43% der Fälle (13/30) MMP 9-mRNA-positiv. Der Klon 2 wies in dieser Gruppe die am stärksten exprimierenden MMP 9-positiven Tumoren auf (Tabelle 19, Abbildung 7). Von der Zelllinie 93VU120T-308-abstammende Tumoren waren in 40% der Fälle MMP 9-positiv (8/20, Abbildung 8). Die Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als statistisch signifikant.

Tabelle 19: Anzahl MMP 9-mRNA-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	3	1	1	-	-	2	1	1
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	2	1	1	1	3	-	-	-
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	4	1	-	-	2	-	-	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	2	1	1	-	3	2	-	-
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	3	1	1	-	4	1	1	-
AZ VU-SCC-OE-267: 6 93VU120T-308: 0	3	3	-	-	-	-	-	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

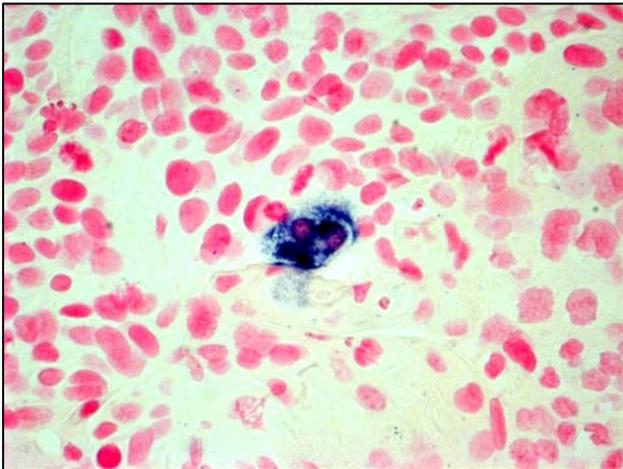


Abbildung 7:

VU-SCC-OE-267

Klon 2

Tumor 389-1 → MMP 9 Antisense

Gut abgrenzbare positive Bereiche
(200fache Vergrößerung)

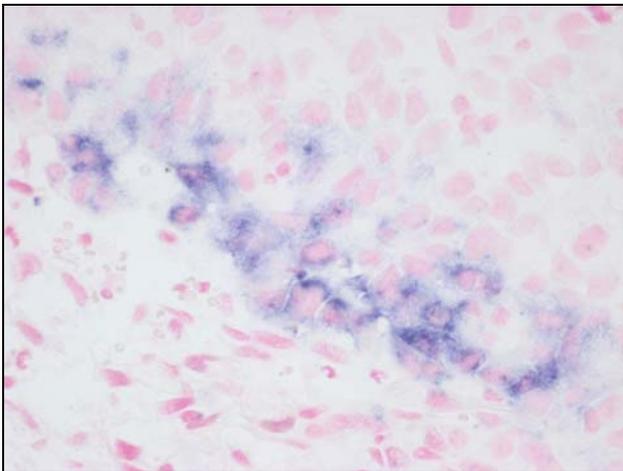


Abbildung 8:

93VU120T-308

Klon 1

Tumor 392-2 → MMP 9 Antisense

Tumorzellen an der Invasionsfront
zeigen Positivität
(200fache Vergrößerung)

4.4.2.3. ADAM 17

ADAM 17-mRNA war in Tumoren beider Zelllinien sowohl im Tumorzentrum als auch an der Invasionsfront sichtbar. Insgesamt waren 24 Tumore positiv, je 12 der Zelllinie VU-SCC-OE-267 (12/28, 43%) und 12 der Zelllinie 93VU120T-308 (12/21, 57%, Tabelle 20). Dabei waren 6 der 12 Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 stark positiv, wohingegen nur 1 Tumor der VU-SCC-OE-267-Tumoren eine starke Expression aufwies (Abbildung 9 und 10). Weder die durchschnittlichen ADAM 17-Score-Werte (Tabellen 16 und 17, $p=0,08$) noch die Anzahl der ADAM 17-negativen und schwach bis stark positiven Tumoren (Tabelle 20, $p=0,099$) unterschieden sich zwischen den Tumoren der beiden Zelllinien signifikant.

Tabelle 20: Anzahl ADAM 17-mRNA-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	3	2	-	-	1	-	1	2
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 3	1	1	2	-	1	-	-	2
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	4	1	-	-	2	-	-	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	2	-	1	1	2	-	2	1
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	3	-	2	-	3	-	2	1
AZ VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 1	3	1	1	-	-	1	-	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

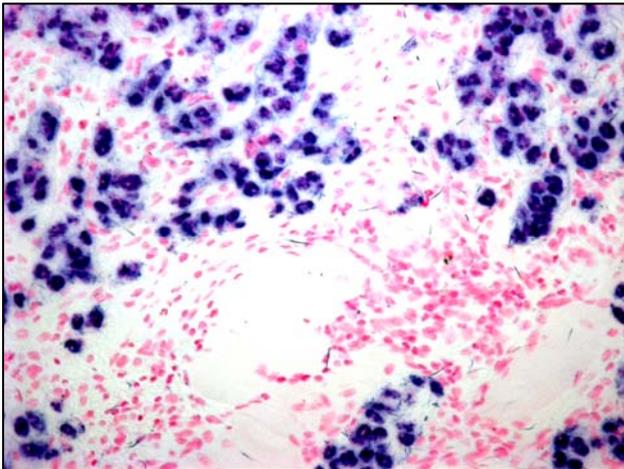


Abbildung 9:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → ADAM 17 Antisense

Starke Expression in den
Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

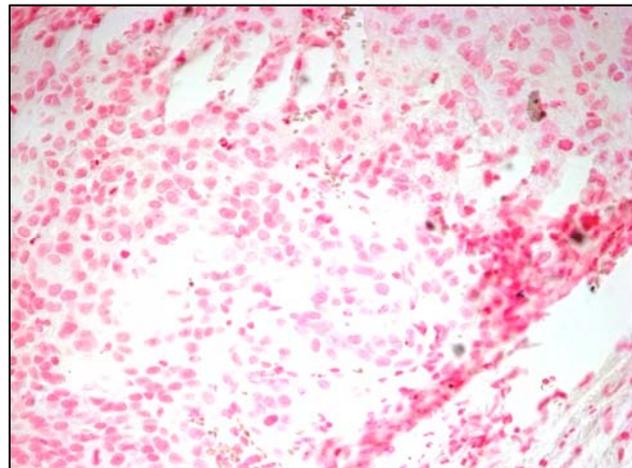
Abbildung 10:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → ADAM 17 Sense

Negativkontrolle: Keine
Hybridisierungs-spezifischen Signale
detektierbar
(200fache Vergrößerung)



4.4.2.4. TIMP 3

Fünf repräsentative Tumoren pro Zelllinie wurden auf TIMP 3-mRNA-Expression untersucht (Tabelle 21).

TIMP 3-mRNA konnte in Tumorzellen beider Zelllinien nachgewiesen werden, es ergaben sich jedoch weder eindeutige Unterschiede in der Intensität der Signale noch in deren Lokalisation innerhalb der Tumoren und zwischen den beiden Zelllinien.

Tabelle 21: Anzahl TIMP 3-mRNA-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 1 93VU120T-308: 0	-	-	-	1				
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 0 93VU120T-308: 1					-	-	-	1
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 1 93VU120T-308: 1	-	-	1	-	1	-	-	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 0 93VU120T-308: 2					-	-	1	1
AZ VU-SCC-OE-267: 3 93VU120T-308: 1	-	1	1	1	-	-	1	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

Leere Zellen: keine Analyse durchgeführt

4.4.2.5. ALDH-1

Die beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant in der ALDH-1-Expression (durchschnittliche Score-Werte, Tabellen 16 und 17: $p < 0,0001$; Anzahl negativer und schwach bis stark exprimierender Tumoren, Tabelle 22: $p < 0,0001$). Alle Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 wiesen mäßige bis starke Expression auf, die vorrangig im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte (31/31, 100%, Abbildung 11 und 12).

Die Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 waren dagegen nur zu 52% ALDH-1-positiv (11/21). Interessanterweise war die ALDH-1-Expression in diesen Tumoren hauptsächlich lediglich fokal nachzuweisen (Abbildung 13 und 14).

Tabelle 22: Anzahl ALDH-1-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	-	-	-	5	4	-	-	-
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	2	3	-	1	2	-
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	1	2	2	2	-	-	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	-	-	3	1	3	1	1	-
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	-	-	2	3	1	2	3	-
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	-	-	7	-	-	1	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

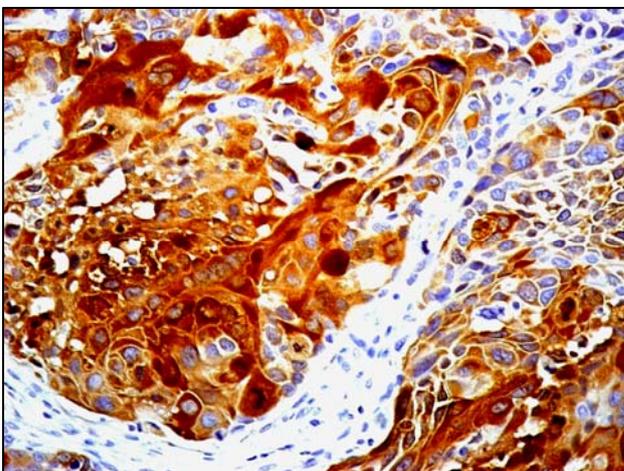


Abbildung 11:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-0-07 → ALDH-1

Starke diffuse zytoplasmatische
Färbung der Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

Abbildung 12:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-1-07 → ALDH-1

Sehr starke diffuse zytoplasmatische
Färbung der Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

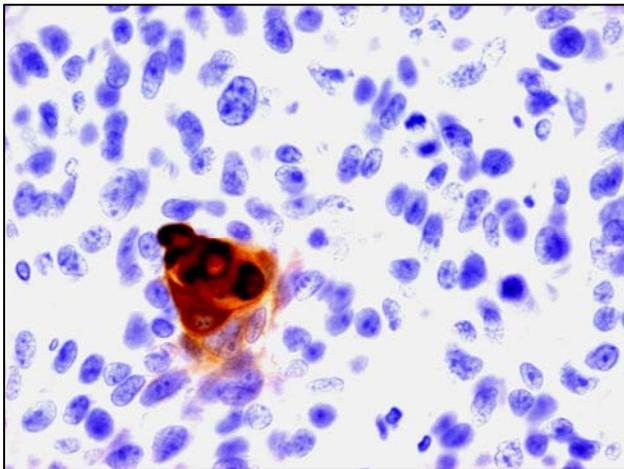
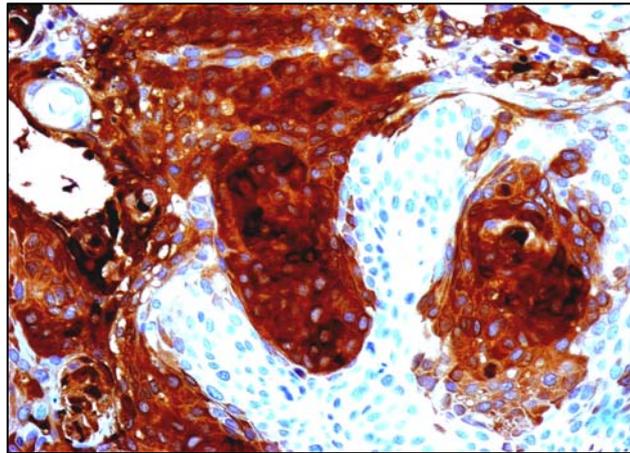


Abbildung 13:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → ALDH-1

Fokale zytoplasmatische
Immunfärbung in einem kleinen
Tumorzellnest
(300fache Vergrößerung)

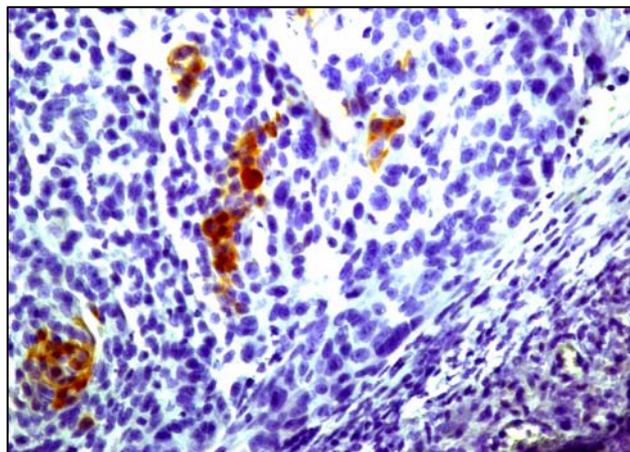
Abbildung 14:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 15-1-07 → ALDH-1

ALDH-1-Immunfärbung in einzelnen
Tumorzellherden
(200fache Vergrößerung)



4.4.2.6. EGFR

Alle Tumoren beider Zelllinien erwiesen sich als EGFR-positiv und zeigten mäßig bis starke membranöse Immunfärbung (100%, Abbildung 15). Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 wiesen im Vergleich mit Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 signifikant häufiger eine nur mäßige Intensität der EGFR-Immunfärbung auf (Tabelle 23, $p=0,034$), und auch die durchschnittlichen Score-Werte (Tabellen 16 und 17) lagen in Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 signifikant unter denen der Zelllinie 93VU120T-308 ($p=0,029$).

Tabelle 23: Anzahl EGFR-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	-	-	1	4	-	-	-	4
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	1	4	-	-	-	3
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	-	2	3	-	-	-	2
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	-	-	2	2	-	-	1	4
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	-	-	2	3	-	-	-	6
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	-	2	5	-	-	-	1

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

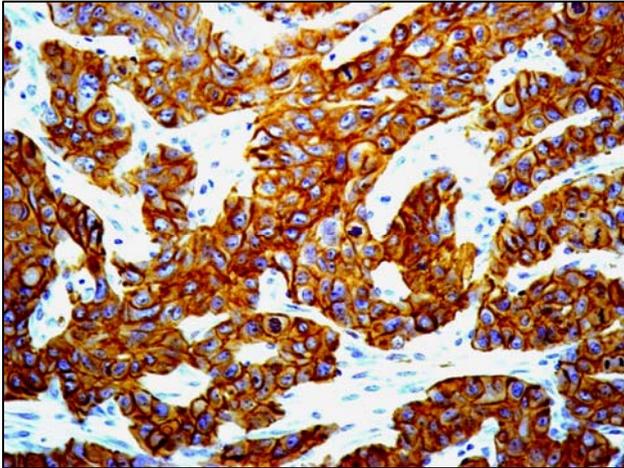


Abbildung 15:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → EGFR

Starke Membranfärbung der
Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

4.4.2.7. EMMPRIN

Die EMMPRIN-Expression war bei 48 von insgesamt 51 untersuchten Tumoren positiv (94%, Tabelle 24). Unter den von der Zelllinie VU-SCC-OE-267 abstammenden Tumoren erwiesen sich 29/31 (94%) als positiv und 2/31 (6%) als negativ. Von der Zelllinie 93VU120T-308 exprimierten 19/20 (95%) Tumoren EMMPRIN, wohingegen 1/20 (5%) Tumoren EMMPRIN-negativ war.

Die meisten Tumoren beider Zelllinien wiesen eine mäßige Expression von EMMPRIN auf, wobei sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien erkennen ließen (Abbildung 16).

Tabelle 24: Anzahl EMMPRIN-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	4	1	-	1	1	1
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	1	3	1	-	-	3	-
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	1	3	1	-	-	2	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	1	1	2	-	1	1	2	1
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	1	3	1	-	-	1	5	-
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	1	4	2	-	1	-	-

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

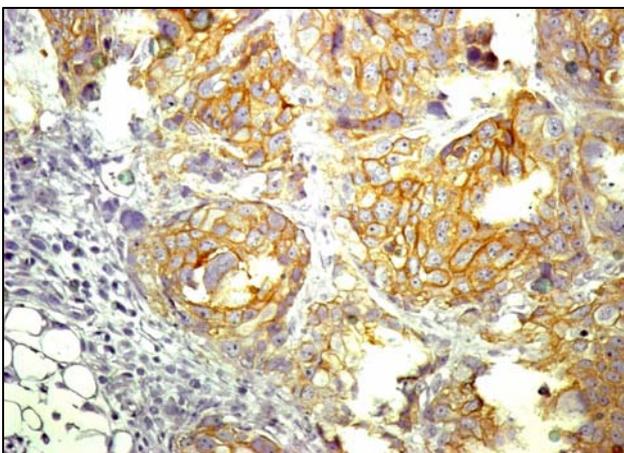


Abbildung 16:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-1-07 → EMMPRIN

Moderate Intensität der
Membranfärbung
(200fache Vergrößerung)

4.4.2.8. EpCAM

Bis auf einen Tumor der Zelllinie 93VU120T-308 erwiesen sich alle Tumoren beider Zelllinien als EpCAM-positiv (51/52, 98%, Tabelle 25). Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 mit 100% (31/31) positiven Tumoren zeigt vor allem starke membranöse Immunfärbung. Die Zelllinie 93VU120T-308 mit 95% (20/21) positiven Tumoren wies dagegen eher mäßige membranöse Immunfärbung auf (Abbildung 17). Starke Intensitäten der EpCAM-spezifischen Immunfärbungen wurden lediglich in Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 detektiert und sowohl die durchschnittlichen Score-Werte (Tabellen 16 und 17, $p < 0,0001$) als auch die Anzahl mäßig und stark immungefärbter Tumoren (Tabelle 25, $p < 0,0001$) unterschieden sich signifikant.

Tabelle 25: Anzahl EpCAM-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

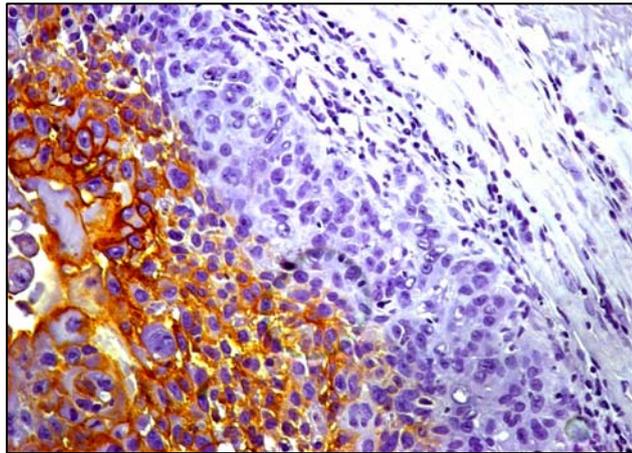
Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	-	-	1	4	-	1	3	-
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	-	5	-	-	3	-
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	-	5	-	1	-	1	-
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	-	-	3	1	-	2	3	-
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	-	-	-	5	-	-	6	-
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	1	5	1	-	-	1	-

Abbildung 17:**93VU120T-308**

Klon 5

Tumor 15-1-07 → EpCAM

Keine Expression an der
Invasionsfront, aber deutliche
Expression im Tumorzentrum
(200fache Vergrößerung)

**4.4.2.9. p53**

Im p53-Gen der Zelllinie 93VU120T-308 wurden Mutationen nachgewiesen und zwar in den Codons 161 und 176 des Exons 5. Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 war dagegen im p53-Gen (Exons 5 bis 8 analysiert) nicht mutiert. Der Nachweis des p53-Proteins wurde deshalb nur stichprobenartig durchgeführt. Dabei wurden die beiden Ausgangszelllinien und zu jeder Zelllinie ein weiterer Tumor kontrolliert.

Erwartungsgemäß zeigte der Tumor des Klons 4 der Zelllinie 93VU120T-308 und auch die Ausgangszelllinie eine sehr intensive nukleäre p53-Immunfärbung, die durch eine verlängerte Halbwertszeit des p53-Proteins bedingt ist (Abbildung 19). Der Klon 3-Tumor der Zelllinie VU-SCC-OE-267 und ebenfalls die Ausgangszelllinie zeigten dagegen keine nachweisbare Immunfärbung (keine verlängerte Halbwertszeit, deshalb nicht erfassbar, Abbildung 18).

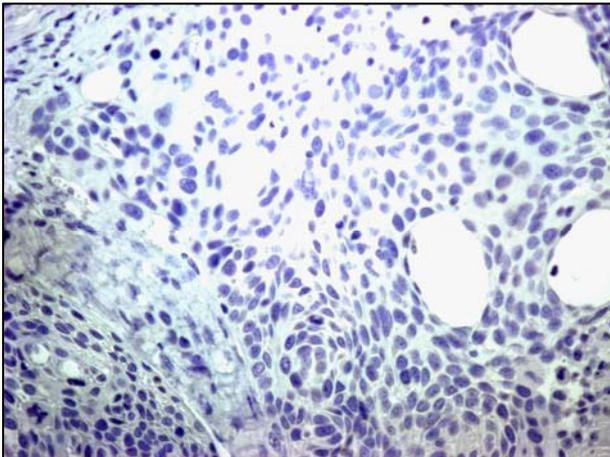


Abbildung 18:

VU-SCC-OE-267
Ausgangszelllinie
Tumor 267-A-05 → p53

Keine p53-spezifische
Immunreaktion in den Tumorzellen
(200fache Vergrößerung)

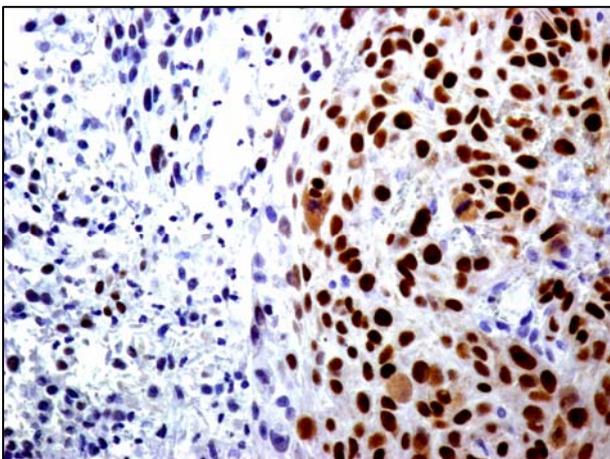


Abbildung 19:

93VU120T-308
Ausgangszelllinie
Tumor 308-A-05 → p53

Starke p53-spezifische
Immunreaktion in den
Tumorzellkernen aufgrund der
Mutationen in den Codons 161 und
176 des Exons 5 des p53-Gens
(200fache Vergrößerung)

4.4.2.10. p63

Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 wies in 30 von 31 Tumoren eine überwiegend mäßig bis starke p63-Expression auf (97%, Abbildung 20) und mit Ausnahme eines Tumors demonstrierten auch alle Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 eine starke Expression (20/21, 95%, Abbildung 21).

Hinsichtlich der zellulären Lokalisation der p63-Expression gab es jedoch eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Während die Zelllinie VU-SCC-OE-267 das p63-Protein zytoplasmatisch und nukleär exprimiert, zeigt die Zelllinie 93VU120T-308 ausschließlich eine nukleäre p63-Proteinexpression mit insgesamt signifikant häufiger starker Intensität (Tabelle 26, $p=0,019$).

Tabelle 26: Anzahl p63-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	1	-	-	4	1	-	-	3
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	1	4	-	-	-	3
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	-	2	3	-	-	-	2
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	-	-	2	2	-	-	-	5
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	-	-	3	2	-	-	-	6
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	-	-	7	-	-	-	1

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

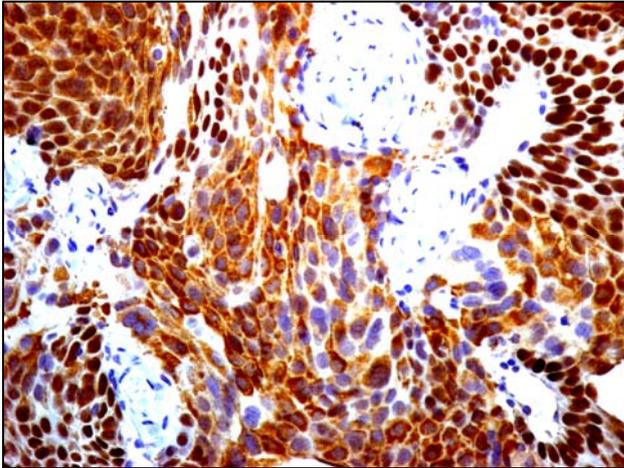


Abbildung 20:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 2-1-07 → p63

Starke nukleäre Immunfärbung, daneben auch Tumorzellen mit zytoplasmatischer Färbung ohne Kernfärbung. (200fache Vergrößerung)

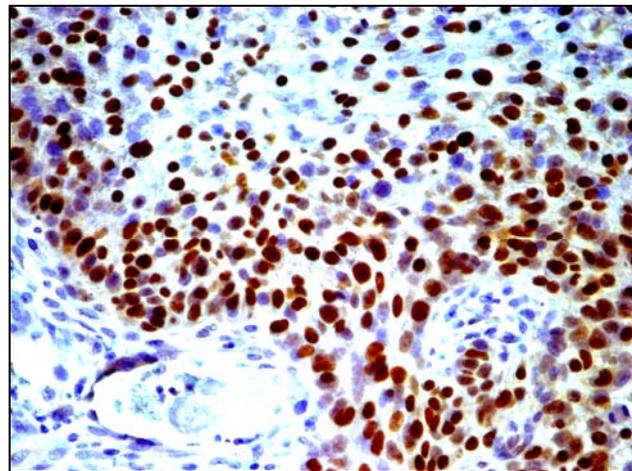
Abbildung 21:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → p63

Ausschließlich starke Kernfärbung nachweisbar (200fache Vergrößerung)



4.4.2.11. 34βE12

Alle getesteten Tumoren beider Zelllinien exprimierten Zytokeratine (52/52, 100%, Tabelle 27), die mit diesem Antikörper nachweisbar sind. Die Klone beider Zelllinien zeigten durchgehend eine mäßig bis starke Immunfärbung bei Einsatz des pan-anti-Zytokeratin-Antikörpers 34βE12. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klonen bzw. den Zelllinien (Abbildung 22).

Tabelle 27: Anzahl 34 β E12-positiver und -negativer Tumoren der verschiedenen Klone beider Zelllinien

Klon Tumoranzahl pro ZL	Zelllinie VU-SCC-OE-267:				Zelllinie 93VU120T-308:			
	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark	0 Keine Signale	1, 2 schwach	3, 4, 6 mäßig	8, 9, 12 stark
Klon 1 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 4	-	-	1	4	-	-	1	3
Klon 2 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 3	-	-	-	5	-	-	-	3
Klon 3 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 2	-	-	1	4	-	-	1	1
Klon 4 VU-SCC-OE-267: 4 93VU120T-308: 5	-	-	1	3	-	-	-	5
Klon 5 VU-SCC-OE-267: 5 93VU120T-308: 6	-	-	-	5	-	-	1	5
AZ VU-SCC-OE-267: 7 93VU120T-308: 1	-	-	2	5	-	-	-	1

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

ZL: Zelllinie

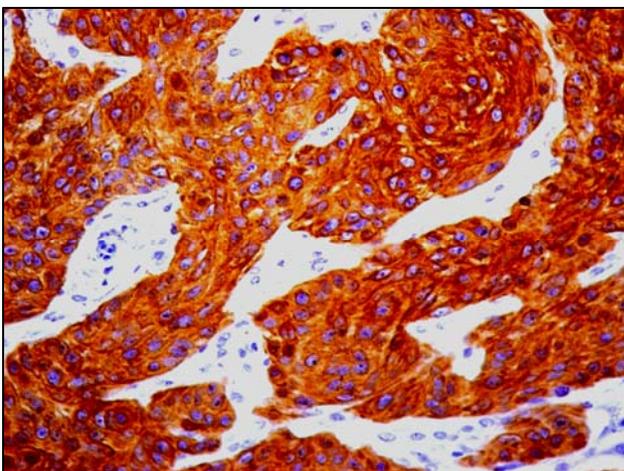


Abbildung 22:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 34-07 → 34 β E12

Sehr starke homogene
zytoplasmatische Zytokeratin-
Expression
(200fache Vergrößerung)

4.5. Vergleich der einzelnen untersuchten Faktoren innerhalb der Klone einer Zelllinie

4.5.1. Zelllinie VU-SCC-OE-267

Tabelle 28: Zelllinie VU-SCC-OE-267 - Vergleich aller Faktoren und Klone (durchschnittliche Scorewerte)

VU-SCC-OE-267:	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	AZ
MMP 1	0	0	0,8	0	0	0
MMP 9	1,2	3,2	0,4	1,5	0,8	0,8
ADAM 17	0,8	2,5	0,2	4,5	2	1,3
TIMP 3	12	n.g.	6	n.g.	n.g.	4,7
ALDH-1	10,2	8,4	6,4	7,5	8	10,7
EGFR	9,6	9,6	7,2	7,5	7,2	9,4
EMMPRIN	6	5,4	4,6	2,2	2,4	6,1
EpCAM	8,4	9	5,6	5,8	9	5,4
p53	n.g.	n.g.	0	n.g.	n.g.	0
p63	7,8	8,4	8,6	7	6,6	9
34βE12	9,6	9,6	9	7,5	10,2	8,3

n.g.: nicht getestet

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

Betrachtet man die Expression der einzelnen Faktoren in den Tumoren in Abhängigkeit vom Zelllinienklon innerhalb der VU-SCC-OE-267-Derivate und im Vergleich zur Ausgangszelllinie (Tabelle 28), erwiesen sich die Unterschiede lediglich für EpCAM als statistisch signifikant ($p=0,002$). Sowohl die Ausgangszelllinie als auch die Klone 3 und 4 zeichneten sich durch eine geringere EpCAM-Expression aus als die Klone 1, 2 und 5. Alle anderen durchschnittlichen Score-Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Klonen.

4.5.2. Zelllinie 93VU120T-308

**Tabelle 29: Zelllinie 93VU120T-308 - Vergleich aller Faktoren und Klone
(durchschnittliche Scorewerte)**

93VU120T-308:	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	AZ
MMP 1	5,3	3,7	2	3,6	6,8	n.g.
MMP 9	4,2	0	0	0,6	0,8	n.g.
ADAM 17	6	6,7	0	4	3	2
TIMP 3	n.g.	9	0	7,5	n.g.	4
ALDH-1	0	3	0	1	2,3	4
EGFR	10,5	10	12	9	11,5	9
EMMPRIN	4,7	4,7	5	3,8	4,2	2
EpCAM	3,2	4,7	2	3,2	4	4
p53	n.g.	n.g.	n.g.	9	n.g.	9
p63	6,8	9	9	9	9	9
34βE12	8	9	9	10,2	9,5	12

n.g.: nicht getestet

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

Die einzelnen Klone unterschieden sich lediglich hinsichtlich ihrer MMP 9- ($p=0,031$) und ALDH-1-Expression ($p=0,03$). Tumoren des Zelllinienklons 1 zeigten die höchste MMP 9-Expression und alle Tumoren der Klone 1 und 3 fielen durch fehlende ALDH-1-Expression auf. Alle anderen untersuchten Faktoren (Tabelle 29) unterschieden sich in den Tumoren nicht signifikant in Abhängigkeit vom Zelllinienklon.

4.6. Vergleich der beiden Zelllinien

Tabelle 30 fasst die Ergebnisse aller Faktoren in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie noch einmal zusammen. Die in dieser Tabelle beschriebenen Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant (siehe 4.4.2.1. bis 4.4.2.11.).

Tabelle 30: Die untersuchten Zelllinien im Vergleich

Faktoren:	Zelllinie VU-SCC-OE-267:	Zelllinie 93VU120T-308:
MMP 1	Fast ausschließlich negativ	Erhöhte Werte hinsichtlich Positivitätsrate und Intensität
MMP 9	Keine signifikanten Unterschiede	
ADAM 17	Keine signifikanten Unterschiede	
TIMP 3	Keine signifikanten Unterschiede	
ALDH-1	viele Tumoren, mäßige bis starke diffuse zytoplasmatische Immunfärbung	wenige Tumoren, schwach bis mäßige fokale zytoplasmatische Immunfärbung
EGFR	Mäßige bis starke Immunfärbung	Fast ausschließlich starke Immunfärbung
EMMPRIN	Keine signifikanten Unterschiede	
EpCAM	Überwiegend mäßige bis starke membranöse Immunfärbung	Schwache bis mäßige membranöse Immunfärbung
p53	Keine Mutationen	Mutationen in den Codons 161 und 176 (Exon 5)
p63	Mäßige bis starke zytoplasmatische und nukleäre Färbung	lediglich nukleäre Färbung, aber insgesamt mit stärkerer Intensität
34βE12	Keine signifikanten Unterschiede	

Hinsichtlich der Expression der mit dem pan-anti-Zytokeratin-Antikörper 34βE12 detektierbaren Zytokeratine konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Dieser Antikörper kann somit in den Tumor-tragenden SCID-Mäusen für die Untersuchung auf DTC und CTC eingesetzt werden. Das trifft auch auf die Expression von EpCAM und EGFR zu, obwohl es hier Unterschiede in der Intensität der Immunfärbung zwischen den Tumoren der beiden Zelllinien gibt.

In SCID-Mäusen, die von der Zelllinie 93VU120T-308 abstammende Tumoren tragen, kann der immunhistochemische Nachweis der p53-Expression zur Erhöhung der Spezifität der DTC/CTC-Detektion eingesetzt werden.

Die Expression von MMP 1-mRNA als potenzieller Invasionsmarker ist fast ausschließlich in Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 detektierbar. Für die Expression von MMP 9, ADAM 17, TIMP 3 und EMMPRIN konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Alle potenziellen Tumorstammzellmarker wurden in den Tumoren in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie differenziell exprimiert. In Tumoren der Ausgangszelllinie 93VU120T-308 konnte lediglich fokal ALDH-1-Immunfärbung nachgewiesen werden. Dagegen erwies sich die starke diffuse zytoplasmatische ALDH-1-Immunfärbung als typisch für Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267.

Die p63-Expression lag in Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 ausschließlich nukleär vor, wohingegen Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 zusätzlich zytoplasmatische Lokalisation der Immunfärbung aufwiesen.

Eine insgesamt schwächere Intensität der EpCAM-Expression war in Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 zu beobachten.

4.7. Korrelation der einzelnen Faktoren zum Nachweis zirkulierender und disseminierter Tumorzellen

Zum Auffinden von eventuell in der Blutbahn zirkulierenden (CTC) bzw. disseminierten Tumorzellen (DTC) wurden im Institut für Tumorbologie Blut- und Knochenmarkanalysen der SCID-Mäuse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden für vergleichende Analysen mit den in der vorliegenden Arbeit analysierten Faktoren zur Verfügung gestellt. Für den Nachweis der Tumorzellen wurde der pan-anti-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 [141] verwendet. Insgesamt konnten potenzielle Tumorzellen in 4 Mäusen detektiert werden (Tabelle 31, Abbildung 23-27), davon in 3 Mäusen im Knochenmark. Lediglich eine Maus hatte eine fragliche CTC im Blut.

Tabelle 31: Nachweis disseminierter und zirkulierender Tumorzellen in den Tumor-tragenden SCID-Mäusen

Zelllinie:	Klon:	Tumor:	Knochenmark:	Blut:
VU-SCC-OE-267	AZ	19-1-07	>20 DTC/ 1x10 ⁶ MNC	
VU-SCC-OE-267	AZ	19-4-07		1 CTC/ 5x10 ⁵ WBC
93VU120T-308	1	392-2-06	2 DTC/ 2x10 ⁶ MNC	
93VU120T-308	5	393-06	1 DTC/ 2x10 ⁶ MNC	

MNC: Mononuclear cells

WBC: White blood cells

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

Bei zwei Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 konnten potenzielle disseminierte bzw. zirkulierende Tumorzellen im Knochenmark und im Blut der SCID-Mäuse detektiert werden. Der Tumor 19-1-07 wies mit mehr als 20 DTC/1x10⁶ MNC die höchste Anzahl an DTC im Knochenmark auf (Abbildung 23, 24 und 25). Der Tumor 19-4-07 wies keine Tumorzellen im Knochenmark auf, zeigte aber eine Tumorzelle im Blut. Dieser Tumor war der einzige Tumor beider Zelllinien, bei dem eine potenzielle CTC nachgewiesen werden konnte (Abbildung 26).

Auch zwei Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 waren potenziell DTC-positiv. Der Tumor 392-2-06 wies 2 DTC im Knochenmark auf. Bei dem Tumor 393-06 konnte eine Tumorzelle im Knochenmark detektiert werden (Abbildung 27).

Abbildung 23:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-1-07 → DTC im Knochenmark

Zytokeratin-positive Zelle (rot),
Kerngegenfärbung: blau
(400fache Vergrößerung)

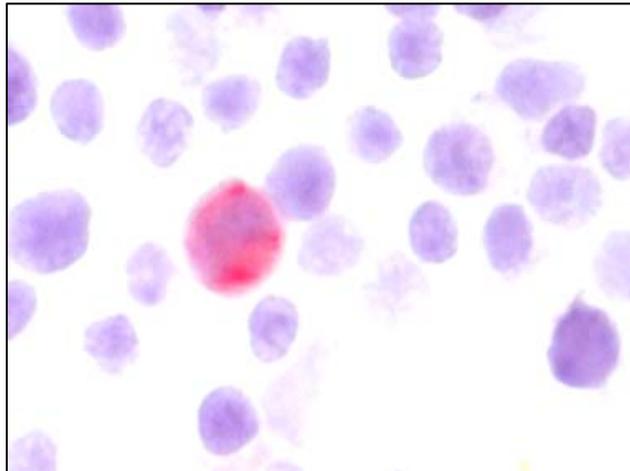


Abbildung 24:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-1-07 → DTC im Knochenmark

Zytokeratin-positive Zelle (rot),
Kerngegenfärbung: blau
(400fache Vergrößerung)

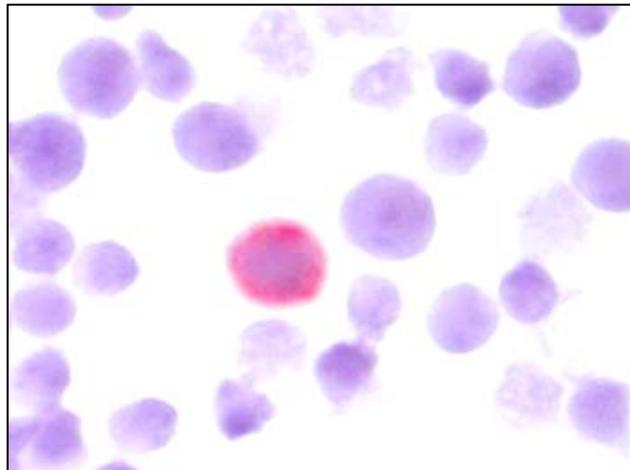


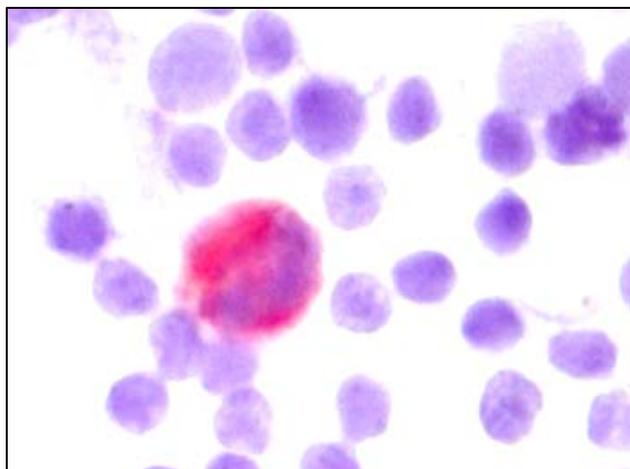
Abbildung 25:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-1-07 → DTC im Knochenmark

Zytokeratin-positive Zelle (rot),
Kerngegenfärbung: blau
(400fache Vergrößerung)



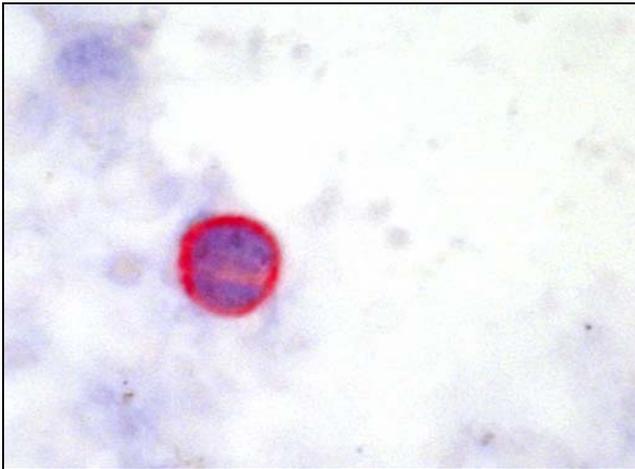


Abbildung 26:

VU-SCC-OE-267

Klon AZ

Tumor 19-4-07 → CTC im Blut

Zytokeratin-positive Zelle (rot),
Kerngegenfärbung: blau
(400fache Vergrößerung)

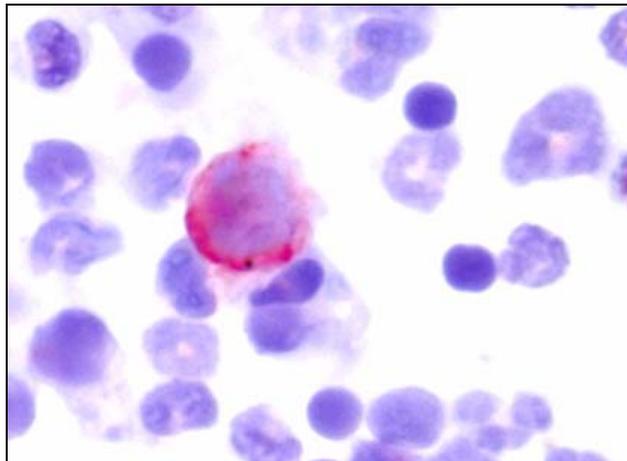
Abbildung 27:

93VU120T-308

Klon 5

Tumor 393-06 → DTC im
Knochenmark

Zytokeratin-positive Zelle (rot),
Kerngegenfärbung: blau
(400fache Vergrößerung)



4.8. Nähere Charakterisierung der CTC-/DTC-positiven Tumoren

Tabelle 32: Score-Werte der CTC-/DTC-positiven Tumoren für alle untersuchten Faktoren und die Tumorentwicklungszeiten

ZL / Klon	267 / AZ	267 / AZ	308 / 1	308 / 5
Tumor:	19-1-07	19-4-07	392-2	393-06
MMP 1	0	0	0	9
MMP 9	0	0	4	1
ADAM 17	0	n.g.	4	0
TIMP 3	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
ALDH-1	9	12	0	0
EGFR	6	12	9	9
EMMPRIN	4	4	4	2
EpCAM	4	6	1	4
p53	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
p63	9	9	9	9
34βE12	12	6	6	9
Tumorentwicklungs- dauer	73 Tage	73 Tage	44 Tage	44 Tage

ZL: Zelllinie

AZ: Tumoren der Ausgangszelllinien

n.g.: nicht getestet

Der Tumor 19-1-07 mit der höchsten Anzahl an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist ein Tumor, der aus der Ausgangszelllinie für VU-SCC-OE-267 hervorgegangen ist (Klon AZ). Mit 73 Tagen war die Entwicklungsdauer leicht verlängert in Bezug auf den Mittelwert der Tumoren dieses Klons (68 Tage, siehe dazu Tabelle 11, Seite 56). Die Score-Werte der untersuchten Faktoren lagen nahe den durchschnittlichen Score-Werten des Klons, aus dem der Tumor hervorgegangen ist (Tabelle 32 und 28). Leicht unter dem durchschnittlichen Wert rangierte der EpCAM-Wert. Dieser Tumor zeigt eine nur mäßige Expression von EGFR, wobei durchschnittlich starke Expressionen für diesen Klon nachgewiesen werden konnten. Jedoch gibt es keine signifikanten Unterschiede zu den weiteren Tumoren desselben Klons.

Der Tumor 19-4-07 geht aus derselben Zelllinie und demselben Klon hervor wie der Tumor 19-1-07. Auch dieser Tumor wies keine Besonderheiten gegenüber den anderen Tumoren seiner Zelllinie und seines Klons auf. Die Tumorentwicklungsdauer war mit 73 Tagen ebenfalls leicht verlängert. Alle Score-Werte waren durchschnittlich, nur die ALDH-1- und die EGFR-Werte lagen über den durchschnittlichen Score-Werten und den dazugehörigen Werten des Tumors 19-1-07.

Der Tumor 392-2-06 des Klons 1 der Zelllinie 93VU120T-308 hat eine Tumorentstehungszeit von 44 Tagen, die dem Durchschnitt dieses Klons sehr nahe kommt (durchschnittlich 46,5 Tage). Auffällig ist, dass dieser Tumor keine MMP 1-Expression aufweist. Die zwei weiteren Tumoren seines Klons waren dagegen mäßig bis stark MMP 1-positiv. Weiterhin fällt auf, dass alle Tumoren dieses Klons ALDH-1-negativ waren, aber die höchste MMP 9-Expression aufwiesen. Auch diese Eigenschaften erwiesen sich als nicht tumor-, sondern eher klonspezifisch. Weiterhin fällt auf, dass die EpCAM-Expression nur schwach nachzuweisen ist, wobei durchschnittlich für diesen Klon mäßige Expressionen nachgewiesen werden konnten. Der p63-Nachweis dagegen fiel überdurchschnittlich stark aus.

Der Tumor 393-06 des Klons 5 derselben Zelllinie zeichnete sich durch ein fast doppelt so schnelles Wachstum in nur 44 Tagen (Durchschnitt 80,2 Tage) gegenüber den weiteren Tumoren seines Klons aus. Die MMP 1-Expression war hier gegenüber dem Durchschnitt seines Klons und dem vorher genannten Tumor überdurchschnittlich stark nachzuweisen. Auch bei diesem Tumor fehlte die bei seinem Klon allerdings nachweisbare ALDH-1-Expression. Etwas unter den durchschnittlichen Werten lagen die Score-Werte für EGFR und EMMPRIN.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden subkutan xenotransplantierte SCID-Maustumoren untersucht, die aus humanen Zelllinien oraler Plattenepithelkarzinome entstanden sind. Dabei standen vor allem Analysen des Invasions- und Metastasierungsverhaltens sowie die Untersuchung der Tumoren auf potenzielle Tumorstammzelleigenschaften im Mittelpunkt unseres Interesses. Die Expression dieser Faktoren sollte dann mit dem Nachweis der Tumorzell dissemination ins Knochenmark und Blut assoziiert werden.

Dafür wurden je 5 aus Einzelzellen vermehrte Zellklone aus zwei humanen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien in jeweils bis zu 7 SCID-Mäuse implantiert. Die in den SCID-Mäusen entstandenen 52 Tumoren (in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet) wurden mit Hilfe der nichtradioaktiven *in situ*-Hybridisierung auf die mRNA-Expression tumorassoziierter Gene (MMP 1, MMP 9, TIMP 3 und ADAM 17) und mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen auf die Proteinexpression von sieben weiteren Faktoren (Zytokeratin 34 β E12, EpCAM, EMMPRIN, EGFR, ALDH -1, p53 und p63) untersucht.

5.1. Charakterisierung und Detektion der Tumorzellen

Zur Charakterisierung und Detektion der zirkulierenden (CTC) und disseminierten Tumorzellen (DTC) wurden hier die Expressionsnachweise von Zytokeratinen, EpCAM, EGFR und p53 herangezogen. Eine frühe Tumorzell dissemination kann auch mit den modernsten hochauflösenden bildgebenden Verfahren gegenwärtig noch nicht nachgewiesen werden. Bei Tumorpatienten ohne nachweisbare manifeste Metastasen können jedoch durch geeignete Methoden zirkulierende Tumorzellen (CTC) im Blut und disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (DTC) detektiert werden [148]. Derartige Methoden erlauben die Charakterisierung dieser Zellen auf Einzelzellebene, wodurch neue Wege in der Analyse früher Metastasierungsgeschehen eröffnet werden [149]. Dabei scheint das Knochenmark ein Organ zu sein, in das Karzinomzellen sehr häufig disseminieren können. Diese DTC können dann, auch nach Behandlung des

Primärtumors und nach langer nicht proliferierender Phase, der sogenannten dormanten Phase, für die Bildung von Rezidiven verantwortlich sein. In verschiedenen Tumorentitäten wurde der DTC-Nachweis im Knochenmark bereits als ein Prognosefaktor deklariert, so auch vor allem beim Mammakarzinom [148]. In einer kürzlich erschienenen Publikation von Pantel et al. 2009 [150] wird die Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im Blut vor und ebenfalls nach der Tumortherapie auch beim Prostatakarzinom als ein prädiktiver Faktor für die Gesamtüberlebensrate der betroffenen Patienten beschrieben. Die Detektion von CTC und DTC erlangte in den letzten Jahren in wissenschaftlichen Analysen immer größere Bedeutung, besonders im Hinblick auf die Entwicklung neuer Anti-Tumor-Therapieansätze, die auf die Beseitigung dieser Zellen gerichtet sind.

Gath et al. 1995 [143] stellten schon 1995 fest, dass die hämatogene Disseminierung von Tumorzellen bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mit einer höheren Frequenz auftritt, als durch das klinisch-pathologische Staging angenommen wurde. Dafür wurde das Vorkommen von DTC im Knochenmark bei 31 Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen mit dem sensitiven anti-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (Pantel et al. 1994 [141]) analysiert. In 32,3% der Fälle (10 Patienten) wurden disseminierte Tumorzellen mit einer Dichte von 1-207 pro 1×10^6 MNC (mononucleäre Zellen) vorgefunden. Dabei handelte es sich meistens um vereinzelte Tumorzellen. In 2 Fällen (6,5%) konnten mehr als nur eine disseminierte Tumorzelle nachgewiesen werden. Viele weitere Studien untersuchten die klinische Relevanz des Auftretens von disseminierten Tumorzellen in Blut und Knochenmark bei verschiedenen Tumorentitäten, so auch bei oralen Plattenepithelkarzinomen. Wollenberg et al. 2004 [151] untersuchten hierzu 176 Knochenmarkaspirate von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region auf das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen. In 30,7% der Fälle wurden DTC im Knochenmark detektiert und es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem DTC-Nachweis und der Rezidiventstehung nachgewiesen werden.

Bisher gibt es nur wenige tumorzellspezifische Marker, die zum Nachweis der minimalen Resterkrankung (MRD, minimal residual disease) in Tumorpatienten eingesetzt werden können. Deshalb werden vor allem gewebe- und organspezifische Marker angewendet, wobei der Einsatz von anti-Zytokeratin-

Antikörpern zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und in Lymphknoten sowie von zirkulierenden Tumorzellen im Blut nach wie vor die Methode der Wahl darstellt. Zytokeratin-positive epitheliale Zellen kommen normalerweise in diesen Kompartimenten nicht vor, so dass epitheliale Tumorzellen (Karzinomzellen) auch in einer außerordentlich geringen Anzahl (1×10^{-6}) von den umgebenden Knochenmark-, Lymphknoten- und Blutzellen unterschieden werden können. Der Nachweis der Zytokeratinexpression als „Tumorzellmarker“ hat jedoch auch Nachteile. So können bestimmte Leukozyten unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu einer schwachen illegitimen Zytokeratinexpression angeregt werden [144]. Auf der anderen Seite ist aber auch gezeigt worden, dass Karzinomzellen im Zuge der epithelialen-mesenchymalen Transition, die sie befähigt, in das Bindegewebe einzuwandern und sich in entfernten Organen anzusiedeln, ihre Zytokeratinexpression herunterregulieren können [147]. Aus diesem Grunde werden pan-anti-Zytokeratin-Antikörper eingesetzt, die gegen verschiedene Zytokeratine gerichtet sind. Für diese Analytik stehen mehrere Antikörper zur Verfügung. Für den Nachweis von Mammakarzinomzellen haben sich beispielsweise die Antikörper A45-B/B3 sowie AE1/AE3 durchgesetzt [143, 144, 145, 146]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein weiterer pan-anti-Zytokeratin-Antikörper (34 β E12 [107]) getestet, der ein etwas anderes Zytokeratin-Nachweisspektrum besitzt, als die zuvor genannten Antikörper und mit dessen Hilfe die Xenotransplantat-Tumoren auf ihre Zytokeratin-Expressionsmuster untersucht wurden. Darüber hinaus wurde die Expression des epithelspezifischen Adhäsionsmoleküls EpCAM analysiert, da auch EpCAM als Marker für die Detektion disseminierter und zirkulierender Tumorzellen eingesetzt wird [17]. Da sich Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sehr häufig durch eine Überexpression von EGFR sowie in ca. der Hälfte der Fälle durch Mutationen im p53-Gen auszeichnen, sollte die Expression dieser Faktoren analysiert werden, um zusätzliche Eigenschaften dieser Tumoren zum Tumorzellnachweis ausnutzen zu können.

5.1.1. 34 β E12

Zytokeratine, die das Zytoskelett der Epithelzellen formen, kommen in allen Zellen epithelialen Ursprungs vor. Dementsprechend werden sie auch in Tumorzellen exprimiert, die aus dem Epithel hervorgegangen sind (Karzinomzellen). In vielen Studien wurde der Zytokeratinnachweis als eine geeignete Methode zum Auffinden von CTC/DTC beschrieben. Braun und Pantel 1998 beschreiben z.B., dass mit monoklonalen Antikörpern gegen epitheliale Zytokeratine oder andere tumorassoziierte Zellmembranglykoproteine einzelne Tumorzellen in Knochenmarkspalten detektiert werden können [108]. Prospektive Studien haben ergeben, dass die Anwesenheit derartig detektierter Zellen eine prognostische Relevanz für die metastasefreie Zeit und das Gesamtüberleben der Patienten hat. Der pan-anti-Zytokeratin-Antikörper 34 β E12 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen verschiedene Zytokeratine gerichtet ist, und zwar vorrangig gegen die hochmolekularen Zytokeratine 5, 6, 10 und 14 [45, 46]. Dieser Antikörper erwies sich in vielen Tumorentitäten als ein geeigneter Marker für Zytokeratine, so auch beim Mammakarzinom, weshalb er immer häufiger zur Analyse von Karzinomzellen herangezogen wird [107].

Braun und Pantel [109] beschrieben bereits 1999 prospektive klinische Studien, in der durch anti-Zytokeratin-Antikörper-basierte Immunoassays Patientenkollektive mit einer schlechten klinischen Prognose hinsichtlich der frühen Metastasenbildung und kürzere Überlebensrate identifiziert werden konnten. Diese Aussage trifft für Patienten mit unterschiedlichen Karzinomentitäten zu, wie z.B. epithelialen Neoplasien der Brust, des Dickdarms, des Rektums, des Magens, des Ösophagus, der Prostata, der Niere, der Harnblase und der Lunge (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) [109]. In der vorliegenden Arbeit wurden alle in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen und experimentell in den SCID-Mäusen entstandenen Tumoren auf ihr Zytokeratinexpressionsmuster untersucht. In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde bei allen Tumoren eine starke Zytokeratinproduktion nachgewiesen. Da es sich durchgehend um Plattenepithelkarzinome handelt, war dieses Ergebnis erwartungsgemäß. Allerdings sind hier nicht nur die nachweisbare Expression dieser Proteine, sondern auch die Intensität der

Immunfärbung und mögliche Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien von großer Bedeutung. Die Analysen verdeutlichen, dass alle Tumoren nahezu durchgehend starke Intensitäten der Immunreaktionen aufweisen. Die verschiedenen Klone einer Zelllinie, aber auch die verschiedenen Zelllinien im Vergleich zeigten keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Zytokeratin-Expressionsrate (Tabelle 27, Seite 80).

5.1.2. EGFR

Der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) ist ein Wachstumsfaktorrezeptor auf der Oberfläche epithelialer Zellen. Er ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor und gehört zur ErbB-Familie. Dieser Transmembranrezeptor besteht aus drei Domänen, einem intrazellulären Teil mit Tyrosinkinase-Funktion, einem transmembranären Teil und einem extrazellulären Teil mit Kinase-Funktion. Wenn spezifische Liganden an den Rezeptor binden, wird das Signal durch Signaltransduktion fortgeleitet und die Zelle leitet zellwachstumsfördernde und antiapoptotische Maßnahmen ein. Liganden dieses Rezeptors sind u.a. der epidermal growth factor (EGF) und der transforming growth factor (TGF- α). Sehr früh schon wurde festgestellt, dass dieser Wachstumsrezeptor in humanen Tumoren, insbesondere auch bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, überexprimiert bzw. verändert vorgefunden wird. Bis zu 90% dieser Plattenepithelkarzinome weisen diese Überexpression auf. Dies führt zu einer ungewollten Überstimulation in den Zellen und begünstigt Tumorgenese, Invasion, Metastasierung und Angiogenese [128]. Die EGFR-Expression wird seither als eine frühe neoplastische Veränderung betrachtet. Diese Erkenntnis führte dazu, dass die EGFR-Blockade durch geeignete Antikörper als eine geeignete Möglichkeit in der Tumorthherapie angesehen wurde. Die Inhibition des EGF-Rezeptors mit Antikörpern zeigte in Studien eine tatsächliche Inhibition der Invasion und Metastasierung (mit weiteren Wirkungen auf Angiogenese und das Immunsystem) [89]. Deshalb ist EGFR in der Chemotherapie stets interessant, und neue Therapiemöglichkeiten können und werden in klinischen Studien erprobt. Sheikh Ali et al. 2008 [129] analysierten in einer Studie die Mutationen im EGFR-Gen an 12 Plattenepithelkarzinom-Zelllinien und 91 Tumoren der

Kopf-Hals-Region. An weiteren 65 Tumoren dieser Entität wurden die EGFR-Proteinexpressionen analysiert. Lediglich eine stille Mutation im EGFR-Gen im Exon 21 konnte in einer der untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Es wurden keine weiteren Mutationen gefunden. Im Gegensatz dazu konnten hohe Expressionsraten von EGFR in den Tumoren detektiert werden. Alle untersuchten Tumoren wiesen EGFR-Expression auf. In 21 Tumoren (32%) wurde EGFR schwach exprimiert, in 27 Tumoren (42%) wurde eine mäßige und in 17 Tumoren (26%) eine starke Expression festgestellt. Somit wurde eine Überexpression (mäßig-stark) in 44 Tumoren (68%) vorgefunden. Die EGFR-Überexpression korrelierte signifikant mit schlechtem Differenzierungs- und positivem Lymphknotenstatus. Eine kürzlich publizierte Studie von Farhadieh et al. 2009 [130] stellt einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und der Entstehung von Zweittumoren im Aerodigestivtrakt auf. An einem Patientenkollektiv von 106 primären laryngealen Plattenepithelkarzinomen wurde u.a. die EGFR-Expression geprüft und 82 Fälle (77%) wiesen eine EGFR-Positivität auf. Anhand dieser Ergebnisse stellt die EGFR-Proteinexpression einen prädiktiven Faktor für die Entstehung von Zweittumoren derselben Entität dar. Außerdem wurde eine negative Korrelation zum tumorfreien Überleben und der Gesamtüberlebensrate festgestellt.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinome erwiesen sich ebenfalls als EGFR-positiv (52/52, siehe Tabelle 23, Seite 72). Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 wies hierbei signifikant häufiger mäßige Intensitäten der Immunreaktionen auf als die Zelllinie 93VU120T-308, die ausgenommen eines Tumors stets stark immunreagierte.

5.1.3. p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Protein mit besonderen Eigenschaften. Es ist ein Schlüsselprotein im Zellzyklus und kontrolliert Zellwachstum und Zellteilung. Mutationen im p53-Gen sind ein wesentlicher Schritt in der Tumorgenese. Es ist ein nukleäres Protein, welches im Normalgewebe schwach oder gar nicht sichtbar ist. In Tumorgewebe allerdings wird das Protein z.B. durch Punktmutation funktionsuntüchtig und dadurch kommt es zur Akkumulation und seine Halbwertszeit wird verlängert. Deshalb reichert es sich

im Zellkern an und kann sichtbar gemacht werden [14, 110, 111]. Es können auch Mutationen auftreten, bei denen die p53-Synthese nahezu oder sogar vollständig zum Erliegen kommt, wobei allerdings ersteres häufiger der Fall ist. Das p53-Protein ist ein gut charakterisiertes Protein, welches in vielen Tumoren verändert vorkommt, so auch in oralen Plattenepithelkarzinomen (siehe 2.2.3., Seite 13). Szymańska et al. 2003 [142] schreiben, dass die p53-Mutationen eine Prädominanz für vereinzelte missense-Mutationen von über 200 Codons zeigen. In vielen Tumorentitäten konnten organspezifische p53-Genmutationen identifiziert werden, so auch bei Zigarettenrauch-assoziierten Tumoren, wie Lungenkarzinomen und oralen Plattenepithelkarzinomen. Auch in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und dem hepatozellulären Karzinom konnten bestimmte Mutationsraster in Regionen mit hoher und niedriger Ereigniswahrscheinlichkeit ausgemacht werden. Dies deutet auf einen Lokus-spezifischen Risikofaktor hin [142]. Schaaij-Visser et al. 2009 [112] beschreiben, dass sich Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches aus genetisch veränderten Mukosazellen formen, welche für einen veränderten p53-Pathway charakteristisch sind. Dies bleibt klinisch zunächst meist symptomfrei, weshalb sich die Patienten häufig erst im fortgeschrittenen Stadium mit invasiven Tumoren vorstellen. In einer Studie an 724 Patienten mit primären Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen haben De Paula et al. 2009 [113] das klinische Profil und das immunhistochemische Expressionsmuster des p53-Proteins analysiert. Statistisch wurde ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der positiven Familienanamnese wie auch der anatomischen Größe der Neoplasien festgestellt. Eine p53-Expression wurde in 71,1 % der Fälle vorgefunden, mit einer erhöhten Expression v.a. in Läsionen von jungen Patienten.

Bei einer der untersuchten Zelllinien der vorliegenden Arbeit war das p53-Gen ebenfalls mutiert. Die Zelllinie 93VU120T-308 hatte Mutationen in den Codons 161 und 176 des Exons 5. Die zweite Zelllinie wies dagegen keine p53-Genmutationen auf (VU-SCC-OE-267). Wie in 4.4.2.9. aufgeführt, sind alle getesteten Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 stark p53-positiv (siehe Abbildung 19, Seite 77) und alle Tumore der Zelllinie VU-SCC-OE-267 p53-negativ (siehe Abbildung 18, Seite 77).

5.1.4. EpCAM

EpCAM ist ein Transmembran-Glykoprotein und gehört zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle. Neben der Adhäsionsfunktion hat EpCAM Einfluss auf wichtige zellzyklusmodulierende Mechanismen, wie Zellwachstum und Proliferation [114]. Physiologischerweise kommt EpCAM in epithelialen Geweben in variablen Mengen vor. Wesentlich veränderte Expressionsmuster findet man allerdings in schnell proliferierenden und epithelialen Neoplasien. Hier wird EpCAM typischerweise überexprimiert [17]. Deshalb wurde EpCAM bekannt als ein Karzinommarker. Auch bei oralen Plattenepithelkarzinomen trifft man häufig auf erhöhte EpCAM-Werte. Wie Balzer et al. 1999 beschreiben, haben veränderte EpCAM-vermittelte Adhäsionen einen negativen regulatorischen Effekt auf Adhäsionsvorgänge, die durch andere Cadherine vermittelt werden, weshalb EpCAM einen Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum von epithelialen Zellen haben könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in vivo Expression von EpCAM mit einer erhöhten epithelialen Proliferation und negativer Differenzierung einhergeht [116]. Litvinov et al. 1997 [115] beschrieben darüber hinaus, dass erhöhte Expressionen von EpCAM in Cadherin-positiven Zellen zur Abnahme von Adhäsionsverbindungen führen. Die Überexpression von EpCAM hat zwar keinen Einfluss auf die Cadherinexpression an sich, sie beeinflusst aber die Wechselwirkung von Cadherinen mit dem Zytoskelett (durch Substanzverluste in den Cadherinmolekülen). Die Fähigkeit von EpCAM, die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Interaktion zu beeinflussen, wobei der Verlust dieser Interaktion eine übermäßige Proliferation begünstigt, verdeutlicht die Eigenschaften dieses Moleküls in epithelialen Zellen proliferationsanregend zu wirken und da eine übermäßige Proliferation stets die Basis für eine mögliche tumoröse Entartung darstellt, ebenfalls dessen Rolle in der Tumorentwicklung. Auch in weiteren Studien konnte schon gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von EpCAM mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht [114, 115]. Beispielsweise wurde festgestellt, dass eine Überexpression von EpCAM in Brust- und Ovarialkarzinomen mit einer Abnahme der Überlebensrate korreliert [17].

In den immunhistochemischen Analysen der vorliegenden Arbeit konnten in den meisten Tumoren hohe EpCAM-Expressionsraten ermittelt werden. Beide Zelllinien waren EpCAM-positiv. Lediglich ein Tumor der Zelllinie 93VU120T-308 (Klon 3/Tumor 394-06) war negativ für EpCAM. Die übrigen Tumoren dieser Zelllinie zeigten überwiegend mäßige, die Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 mäßig bis starke EpCAM-Expressionen.

5.2. Invasion und Metastasierung

Einzelne Karzinomzellen besitzen die Fähigkeit, sich vom Primärtumorverband zu lösen, die Basalmembran zu durchwachsen und umgebendes Bindegewebe zu infiltrieren. Welche Eigenschaften bestimmte Zellen darüber hinaus befähigen, Blut- und Lymphgefäße zu invadieren, um darüber in entfernte Organe zu gelangen, dort zu überleben und als Metastase anzuwachsen, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. In der vorliegenden Arbeit sollten nun die in den SCID-Mäusen gebildeten Xenografttumoren auf bekannte Invasionsfaktoren untersucht werden. Dazu gehören die Matrixmetalloproteasen 1 und 9, ADAM 17, der MMP-Inhibitor TIMP 3 und der Induktor der MMP-Expression EMMPRIN.

5.2.1. Matrixmetalloproteasen

Als Matrixmetalloproteasen wird eine große Gruppe von matrixabbauenden Enzymen zusammengefasst. Schon mehr als 25 solcher Enzyme wurden beschrieben, die weiter unterteilt werden in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Metalloelastasen, je nachdem welche Strukturen der Extrazellulärmatrix sie abbauen. Durch die Regulierung des Auf- und Abbaus der Extrazellulärmatrix während verschiedener Erkrankungen wurde das Augenmerk schon früh auf die MMPs gerichtet. Sie spielen eine entscheidende Rolle in normalem und pathologischem Gewebe, z.B. in der Embryogenese, Wundheilung, bei Entzündungen, Arthritis, kardiovaskulären Erkrankungen, Atemwegserkrankungen und ebenfalls bei Tumoren [119].

In verschiedenen Arbeiten konnte demonstriert werden, dass die Überexpression von Matrixmetalloproteasen einen Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten von Plattenepithelkarzinomen hat. So zeigten Hashimoto et al. bereits 2004 [120] einen Zusammenhang zwischen der MMP 1-Überexpression und den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. Dazu wurden Untersuchungen an DNA-Proben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region durchgeführt, die aus Blutproben extrahiert wurden. Dabei war die MMP 1-Expression bei Karzinompatienten (n = 140) gegenüber geeigneten Kontrollgruppen (alters- und geschlechtsgerecht, n = 223) durch Promotorpolymorphismen signifikant erhöht. Es wurden auch MMP 3-Promotorpolymorphismen untersucht, wobei aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Karzinompatienten und ihren Kontrollgruppen gefunden werden konnten. Franchi et al. 2002 [121] zeigten ebenfalls nach Untersuchungen von u.a. MMP 1, MMP 2 und MMP 9, dass MMP 1 bei 74,5 % der untersuchten Tumoren überexprimiert vorlag. Auch die MMP 2- und MMP 9-Werte waren erhöht, jedoch geringfügiger als die MMP 1-Werte. Zudem wurde eine starke Korrelation zwischen dem Vorliegen einer p53-Mutation und der MMP 9-Überexpression beschrieben. P53-Gendefekte und abnorme Expressionsmuster des p53-Proteins, die in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs häufig detektiert werden, gehen möglicherweise mit einer verstärkten Angiogenese und invasivem Wachstum, sowie der Förderung der Matrixmetalloprotease-Überexpression einher, welches insgesamt eine Progression des Tumorgeschehens fördert. Bei den p53-Analysen konnten bei 25 Tumorproben (58%) p53-Genmutationen aufgedeckt werden. Dabei wurden 11 der Mutationen (44%) auf dem Exon 8 identifiziert. Weitere 7 Mutationen (28%) konnten auf das Exon 5, 5 Mutationen (20%) auf Exon 6 und 2 Mutationen (8%) auf Exon 7 zurückgeführt werden. Der häufigste Mutationstyp bei diesen Analysen war die Transition von G:C zu A:T und die Transversion G:C zu T:A. Brummer et al. 1999 [122] führten Untersuchungen an einer Reihe von gesunden und tumortragenden Brustdrüsengewebe durch. Dabei beobachteten sie eine allmähliche Zunahme in der MMP-Expression (MMP 1 und MMP 2) in Sequenz nicht-invasiver prämaligener Tumovorläufer zu invasiven Tumoren. In letzteren konzentrierte sich die Matrixmetalloprotease-Expression hauptsächlich an der Invasionsfront

der Tumoren. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die erhöhte MMP-Expression für die Degradation der Extrazellulärmatrix und damit für die Ausbreitung des Tumors eine wichtige Rolle spielt. Dies verdeutlicht den genannten Zusammenhang zwischen der Tumorentstehung bzw. dem malignen Entarten von Tumoren und den Matrixmetalloproteasen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionen von MMP 1- und MMP 9-mRNA über RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung untersucht. Eine MMP 1-Überexpression konnte in Tumoren, die von der Zelllinie VU-SCC-OE-267 abstammten, in 3 von 30 (10%) Fällen nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich jedoch durchgehend um eine schwache Intensität der MMP-spezifischen Hybridisierungssignale. Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 wiesen in 17 von 19 (89%) Fällen eine MMP 1-Überexpression auf. Die Signalstärke reicht hier allerdings von schwach bis stark. Die Expression von MMP 9 konnte ebenfalls in Tumoren beider Zelllinien nachgewiesen werden. Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 erwiesen sich in 13 von 30 (43%) Fällen als MMP 9-positiv und die Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 in 40% (8/20) der Fälle. Der Klon 2 der Zelllinie VU-SCC-OE-267 und der Klon 1 der Zelllinie 93VU120T-308 exprimierten MMP 9 am stärksten. In Anlehnung an die Ergebnisse von Franchi et al. 2002 [121] werden Matrixmetalloproteasen (hier MMP 1) in Tumoren der Zelllinie vermehrt exprimiert, in der auch Mutationen im p53-Gen gefunden worden sind, und zwar in der Zelllinie 93VU120T-308. Demnach könnte tatsächlich eine Korrelation zwischen einer p53-Mutation und der MMP 9-Überexpression vorliegen. Die insgesamt in Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 höhere Expression von MMP-mRNA könnte mit einer höheren Invasivität dieser Zelllinie assoziiert sein.

5.2.2. ADAM 17

ADAM steht für a disintegrin and metalloproteases. ADAM-Proteasen bilden eine Familie von zellmembranständigen Proteasen. Sie besitzen wie die MMPs ein Zinkatom in ihrem aktiven Zentrum, weshalb sie in eine gemeinsame Superfamilie eingeordnet werden. Diese Proteasen sind dazu befähigt, extrazelluläre Anteile von membranständigen Proteinen abzuspalten, welche dadurch aktiviert werden und ihrerseits weitere Signalkaskaden aktivieren.

Dieser Prozess wird als Shedding bezeichnet, weshalb diese Proteingruppe auch als Sheddase bekannt ist. Es wurden schon viele ADAMs beschrieben, darunter auch ADAM 17, welches durch seine Fähigkeit, den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) von der Zelloberfläche abzuspalten, in den Vordergrund tritt. Wegen dieser Eigenschaft von ADAM 17 findet auch synonym der Name TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme) Verwendung. An der Zellmembran (und einigen Membranen intrazellulär) wird die inaktive Form des TNF- α (pro-TNF- α), das als Zytokin eine sehr wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielt, gespalten und freigesetzt. Dadurch geht der Tumornekrosefaktor- α in seine aktive Form über und führt seinerseits dann zu entzündungsaktiven Prozessen. Viele weitere Proteine werden durch ADAM 17 prozessiert, z.B. der epidermal growth factor (EGF) und der transforming growth factor- α (TGF- α), wodurch dann biologisch wichtige Liganden freigesetzt werden. ADAM 17 wird als ein Faktor diskutiert, der die Tumorentstehung und Metastasierung beeinflusst [123]. Die Expression von ADAM 17 wurde u.a. in Mamma-Karzinomen untersucht. McGowan et al. 2008 [124] zeigen anhand von Untersuchungen an insgesamt 293 invasiven Mamma-Karzinomen, dass die ADAM 17-Expression in fortgeschrittenen Tumoren gegenüber frühen Tumoren signifikant erhöht ist. Patienten mit ADAM 17-Überexpression hatten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Gesamtüberlebensrate gegenüber Patienten mit weniger starker ADAM 17-Expression. Auch in vielen weiteren Tumorentitäten wurde ADAM 17 analysiert. Nakagawa et al. 2009 [125] zeigten zum Beispiel, dass in gastrointestinalen Stromatumoren ADAM 17 ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Es wurden insgesamt 89 Tumoren dieser Entität untersucht und es wurde dabei festgestellt, dass ADAM 9 in 91%, ADAM 10 in 64%, ADAM 17 in 82%, MMP 2 in 82% und MMP 14 in 73% der Fälle überexprimiert werden. In Tumoren mit ADAM 17-Überexpression wurde EGFR koexprimiert vorgefunden, da EGFR durch ADAM 17-gesteuertes Shedding von EGF aktiviert werden kann. Bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region wurde ADAM 17 noch wenig untersucht. Takamune et al. 2007 [126] konnten jedoch an 50 oralen Plattenepithelkarzinomen demonstrieren, dass die ADAM 17-Expression in 87% der Fälle (in Kombination mit CD44) erhöht vorlag. Die ADAM 17-Expression korrelierte zudem signifikant mit der Lymphknotenmetastasierung und der lokalen Rezidivierung.

In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomen konnte ebenfalls eine ADAM 17-Expression verzeichnet werden. Insgesamt waren 49% der Tumoren ADAM 17-mRNA-positiv. Von der Zelllinie VU-SCC-OE-267 abstammende Tumoren waren in 12 von insgesamt 28 Fällen (43%) ADAM 17-positiv. Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 erwiesen sich in 12 von insgesamt 21 Tumoren (57%) als ADAM 17-positiv. Die von dieser Zelllinie abstammenden Tumoren wiesen neben höherer Frequenz der ADAM 17-Positivität auch eine etwas stärkere Intensität der Hybridisierungssignale auf. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien detektiert werden. Dennoch ist insgesamt festzuhalten, dass eine ADAM 17-Expression in nahezu der Hälfte aller untersuchter Tumoren vorliegt. Ob ADAM 17-überexprimierende Tumoren aggressiver sind als ADAM 17-negative Tumoren und ob diese Eigenschaft mit schnellerem Wachstum und Metastasierung einhergeht, muss in Folgeexperimenten geprüft werden.

5.2.3. TIMP 3

Die Aktivität der Matrixmetalloproteasen steht unter der Kontrolle verschiedener Faktoren (siehe Kapitel 2.3.1., Seite 19). Wichtig ist auf der einen Seite die Regulation auf der transkriptionellen Ebene. Stimulatoren sind u.a. EGF (epidermal growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor). Ebenso wie die Synthese kann auch die katalytische Aktivität der MMPs reguliert werden. Diese Funktion übernehmen die tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP) [21]. In gesundem Gewebe besteht eine Balance zwischen der MMP- und der TIMP-Aktivität, d.h. zwischen dem Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix. Ist dieses Gleichgewicht gestört, können Gewebsveränderungen auftreten. Liegt das Gleichgewicht auf Seiten der MMPs, so werden die Tumorgenese, das Tumorwachstum sowie die Metastasierung begünstigt. Ist allerdings die TIMP-Expression stärker, geht dies mit einer Hemmung dieser Tumoreigenschaften einher [47]. Mutationen der TIMP-Gene wurden in bestimmten Erkrankungen nachgewiesen. So wurde z.B. ein TIMP 1-Genpolymorphismus in Asthma-Patientinnen australischer Herkunft gefunden. Genpolymorphismen bei TIMP 3 wurden mit vielen weiteren Krankheiten in Verbindung gebracht, u.a. mit verschiedenen Lungenfunktionsstörungen und Maculadegenerationen, die bis

zur Erblindung führen können [47]. Ninomiya et al. 2008 [127] untersuchten die prognostische Signifikanz von Promotormethylierungen im TIMP-Gen (hier TIMP 3) bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Die Analysen wurden mit einer methylierungsspezifischen PCR durchgeführt. Eine Hypermethylierung wurde in 9 von 51 Fällen gefunden (18%) und war assoziiert mit einem reduzierten tumorfreien Überleben und ebenfalls mit einer reduzierten Gesamtüberlebensrate. Die MMP-Expression war in diesen Tumoren signifikant erhöht, wohingegen die TIMP 3-Expression gegenüber dem Normalgewebe signifikant erniedrigt vorlag. Es konnte demonstriert werden, dass die Promotorhypermethylierung der TIMP-Gene mit niedrigeren Expressionsraten von TIMP, das prognostisch mit einem schwereren Verlauf mit höheren Rezidiv- und niedrigeren Überlebensraten korreliert, assoziiert ist. In Tumoren können die TIMPs ähnlich wie die MMPs überexprimiert vorliegen. Hier ist der MMP/TIMP-Quotient ausschlaggebend, anhand dessen festgestellt werden kann, ob das Gleichgewicht auf Seiten der TIMPs oder der MMPs liegt [47].

Die TIMP-Expressionen der in der vorliegenden Arbeit analysierten Tumoren wurde stichprobenartig an 10 Fällen, 5 der Zelllinie VU-SCC-OE-267 und 5 der Zelllinie 93VU120T-308, analysiert. Mit Ausnahme eines Tumors der Zelllinie 93VU120T-308 waren alle getesteten Tumoren positiv für TIMP. Wie auch bei anderen Tumoren werden hier also MMPs und ebenfalls TIMPs (TIMP 3) überexprimiert. Interessant hierbei wäre die Aktivität der TIMPs, ob die TIMPs durch genetische oder epigenetische Ursachen fehlerhaft und eingeschränkt funktionstüchtig exprimiert werden oder ob sie als Reaktion auf die gesteigerte MMP-Expression überexprimiert werden.

5.2.4. EMMPRIN

Der „extracellular matrix metalloprotease inducer“ EMMPRIN ist ein Protein, welches die Matrixmetalloproteasen aktivieren kann. EMMPRIN, auch bekannt als TCSF (tumor collagenase stimulatory factor), CD 147 oder Basigin, gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und befindet sich an der Zelloberfläche von Karzinomzellen vieler verschiedener Tumorentitäten. Dort stimuliert es in den angrenzenden Stromazellen (peritumorale Fibroblasten) die Synthese von verschiedenen Matrixmetalloproteasen, welche die Extrazellulärmatrix

degradieren können und somit der Karzinomzelle zur Invasion verhelfen [84]. Insofern spielt EMMPRIN eine besondere Rolle in der Karzinomentstehung bzw. bei der Invasion von Tumorzellen. Reimers et al. 2004 [84] zeigten den potenziellen Einfluss von EMMPRIN auf die Tumorprogression. Dafür wurden immunhistochemische Untersuchungen an 2222 humanen Mammakarzinomen durchgeführt und die Ergebnisse dann mit klinisch-pathologischen Parametern verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die EMMPRIN-Expression signifikant mit einer Vielzahl von histopathologischen Risikofaktoren, wie u.a. Tumorstadium, Tumorgröße, negativem Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-Status und der Gesamtüberlebensrate korreliert. Außerdem konnte eine Expression von EMMPRIN in 90% der Fälle auch in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der Karzinompatienten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass EMMPRIN die Tumorprogression positiv beeinflussen kann [84]. Riethdorf et al. 2006 [86] untersuchten die EMMPRIN-Expressionsmuster in Tumor- und Normalgewebe. Dabei wurden an Mikroarrays mit 2348 und 608 Gewebeprobe von 129 verschiedenen Tumortypen und 76 verschiedenen Normalgeweben Untersuchungen durchgeführt. EMMPRIN-Expression wurde in 112 von 129 Tumorentitäten festgestellt, wobei maligne Tumoren öfter Positivität aufwiesen als benigne Tumoren. Weiterhin wurde eine Heterogenität in der EMMPRIN-Expression zwischen den getesteten Tumorentitäten nachgewiesen. Hohe EMMPRIN-Expressionen wurden u.a. in Plattenepithelkarzinomen und in Adenokarzinomen des Pankreas und der Mamma gefunden. Es konnten jedoch auch EMMPRIN-Expressionen in einigen wenigen Zellen des Normalgewebes nachgewiesen werden. Zu diesen Zellen zählen u.a. proliferations- und differenzierungsaktive Epithelzellen sowie Keimzellen und Endothelzellen des Gehirns [86]. Auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs konnten erhöhte EMMPRIN-Expressionen nachgewiesen werden. So verdeutlicht eine kürzlich publizierte Studie von Cao et al. 2009 [131], dass auch in Plattenepithelkarzinomen der Zunge EMMPRIN-mRNA überexprimiert wird, vor allem in der Zellmembran der hochmalignen Karzinome. Darüber hinaus zeigten Newman et al. 2008 [132] anhand von xenotransplantierten SCID-Mäusen, dass das Tumorstadium bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs positiv mit erhöhten

EMMPRIN-Werten assoziiert ist und die erhöhten EMMPRIN-Werte wiederum negativ mit dem durchschnittlichen Überleben der SCID-Mäuse korrelieren.

Die EMMPRIN-Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren erwiesen sich ebenfalls als stark positiv. Tumoren beider untersuchter Zelllinien hatten über 90% nachweisbare EMMPRIN-Expression. Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 waren zu 94% (29/31) und Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 zu 95% (19/20) EMMPRIN-positiv. Die Intensitäten der Immunfärbungen reichten dabei von schwach bis stark, wobei durchschnittlich eine mäßige Expression zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis verdeutlicht erneut den Zusammenhang zwischen der EMMPRIN-Überexpression und der Karzinogenese bzw. Tumorprogression.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die MMP 1- und MMP 9-mRNA, in den Tumoren der zwei untersuchten Zelllinien differenziell exprimiert werden, wobei sich dieser Unterschied jedoch nur für MMP 1 als statistisch signifikant erwies. Die Expression von ADAM 17-mRNA und auch EMMPRIN erwiesen sich im Gegensatz dazu als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Tumoren der beiden Zelllinien.

5.3. Stammzellmarker

Embryonale Stammzellen haben die Eigenschaft, sich erneuern und in verschiedene Gewebe differenzieren zu können. In adultem Gewebe erhalten die Organe einen gewissen Anteil dieser Stammzellen zu ihrer Regeneration. Im Tumorgewebe kommen viele verschiedene Zellen vor, darunter Tumorzellen, Stromazellen, infiltrierende Abwehrzellen und ebenfalls möglicherweise Tumor-Stammzellen. Diese potenziellen Stammzellen des Tumors werden vor allem für die Entstehung von Rezidiven und Metastasen verantwortlich gemacht. Auch die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zeigen einen hohen Anteil an sich selbst regenerierenden Zellen [106, 133]. Prince et al. 2008 [133] schreiben, dass diese so genannten Stammzellen für die ungenügenden Erfolge der Chemotherapie bei den Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen, durch die oben genannte Rezidivneigung,

verantwortlich sind. Weiter wurde geschrieben, dass diese Stammzellen einen bestimmten Phänotyp besitzen und durch ihre Oberflächenmarker identifiziert werden können. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde schon zur Identifikation vieler Stammzelllinien untersucht, u.a. bei embryonalen, mesenchymalen und epithelialen Stammzellen, bei endothelialen Progenitorzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen können aber üblicherweise nicht durch nur einen einzigen Stammzellmarker identifiziert werden, da es partielle Überlappungen zwischen den verschiedenen Stammzelllinien gibt [139]. Zu den klassischen Stammzellmarkern, wie z.B. CD 34, CD45 und CD133 reihen sich nun immer mehr (potenzielle) Stammzellmarker hinzu. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Marker getestet, die als Tumorstammzellmarker dieser Tumorentität diskutiert werden. Diese sind ALDH-1, p63 und EpCAM.

5.3.1. ALDH-1

ALDH-1 gilt schon seit längerer Zeit als Stammzellmarker [93]. Sehr gut erforscht wurde die ALDH-1-Expression vor allem beim Mammakarzinom. Der Nachweis der erhöhten ALDH-1-Expression erwies sich als ungünstiger Faktor für die betroffenen Patienten. Ginestier et al. [92] zeigten 2007, dass humane Epithelzellen des Brustgewebes mit hoher ALDH-1-Aktivität Stammzeleigenschaften besitzen. Diese Zellen bilden eine Subpopulation mit breiter Entdifferenzierungs- und Wachstumsspanne. Weiterhin konnte in dieser Arbeit an einer Serie von 577 Mammakarzinomen demonstriert werden, dass die Überexpression von ALDH-1 mit einer schlechten Prognose der Patientinnen assoziiert war. Auch in anderen Tumorentitäten gilt ALDH-1 als Stammzellmarker, u.a. bei Kolon-, Lungen- (nicht-kleinzellig) und Ovarialkarzinomen. Huang et al. 2009 [134] wiesen nach, dass sich wenige ALDH-1-positive Zellen basal in den Kolonkrypten befinden. In mutiertem Gewebe steigt jedoch die Anzahl dieser ALDH-1-positiven Zellen an und sie verteilen sich vermehrt über die Krypten. In ihren Versuchen mit xenotransplantierten SCID-Mäusen konnten sie die tumorfördernde Wirkung einer ALDH-1-Überexpression demonstrieren. Bisher liegen nur wenige Literaturdaten zu Tumorstammzellmarkern bei Plattenepithelkarzinomen der

Kopf-Hals-Region vor. Eine kürzlich publizierte Studie von Chen et al. 2009 [135] zeigt jedoch, dass ALDH-1-positive Zellen von Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen Tumorentstehung begünstigen und diese häufig gegen Strahlentherapie resistent sind. Somit liegt die Vermutung nahe, dass ALDH-1-positive Tumorzellen auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region Stammzellcharakter besitzen.

Die ALDH-1-Expressionsmuster der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren erwiesen sich als unterschiedlich in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie. Alle Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 waren ALDH-1-positiv (siehe 4.4.2.5, Seite 69). Eine mäßig bis starke diffuse zytoplasmatische Expression von ALDH-1 konnte in diesen Tumoren nachgewiesen werden. Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 wiesen dagegen nur in ca. 52% (11/21) der Fälle ALDH-1-Positivität auf. Die restlichen Tumoren (48%, 10/21) erwiesen sich dagegen als ALDH-1-negativ (siehe Tabelle 22, Seite 70). Die ALDH-1-exprimierenden Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 zeigten gegenüber denen der Zelllinie VU-SCC-OE-267 eine schwächere Intensität der Immunreaktion, die hauptsächlich fokal nachzuweisen war. Die auffälligen Unterschiede in der Intensität und Lokalisation des Enzyms in den Tumorzellen bilden ein Unterscheidungskriterium der zwei untersuchten Zelllinien.

5.3.2. p63

Das p63-Protein ist in einen komplexen Regelkreislauf geschaltet. Durch seine zellzyklusregulierende Funktion gehört es zu den wichtigen Tumorsuppressorproteinen. Wie von Trink et al. 2007 [98] beschrieben, spielt das p63-Protein eine größere Rolle in der Entstehung von Tumoren, als zunächst angenommen wurde. Durch die Fähigkeit, die Aktivität einer Vielzahl von Genen zu kontrollieren, wird die These gestützt, dass p63 an der Kontrolle der Gewebsdifferenzierung, der Zelladhäsion und der Tumorgenese, am Zellzyklusarrest, an der Apoptose und weiteren zellulären Funktionen beteiligt ist. Thurfjell et al. [136] zeigten 2005, dass eine Amplifikation der chromosomalen Region 3q21-29, auf der das p63-Gen lokalisiert ist, eine prognostische Signifikanz für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs besitzt. Dieses Gen kodiert für sechs verschiedene p63-Proteine,

welche sich in ihren Funktionsbereichen unterscheiden. Einige von ihnen haben große funktionelle Ähnlichkeit mit dem Tumorsuppressorprotein p53, andere wiederum wirken oppositionell. Gendefekte gehen mit Veränderungen in der oralen Mukosa, den Zähnen, der Speicheldrüsen und der Haut einher. Durch Analyse des p63-Proteins und der p63-mRNA-Expression wurde festgestellt, dass sich die Expression von p63 in den Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen von denen der gesunden oralen Mukosa unterscheidet. In diesen Tumoren wird p63 überexprimiert, wie sonst lediglich in den Basalzellen des Plattenepithels beobachtet. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen legen die These nahe, dass die p63-Expression in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen einen Einfluss auf die Tumorzelldifferenzierung hat. Sniezek et al. 2004 [137] zeigte zudem, welche Isoformen des p63-Proteins in dieser Tumorkategorie vermehrt exprimiert werden. Alle Unterformen der p63-Isoform $\Delta Np63$ kommen bei diesen Tumoren vor, vor allem aber wurde $\Delta Np63$ -alpha überexprimiert vorgefunden. Interessanterweise wird $\Delta Np63$ -alpha aber in prä-apoptotischen Zellen unterexprimiert. Dies stärkt die Annahme, dass $\Delta Np63$ -alpha im oralen Epithel eine Unterdrückung der Differenzierung und der Apoptose hervorruft und dadurch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen einnimmt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die zwei untersuchten Zelllinien hier eine p63-Überexpression vorweisen. Bei Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 waren 30 von 31 getesteten Tumoren mäßig bis stark p63-positiv (97%). Wie in der Abbildung 20 auf Seite 79 zu sehen ist, liegt das p63-Protein in den Tumorzellen zytoplasmatisch und nukleär vor. In den Tumoren der zweiten Zelllinie (93VU120T-308) wird p63 ebenfalls überexprimiert. Hier konnte in 95% der Fälle eine p63-Überexpression festgestellt werden (20/21 getesteten Tumoren). Bei den Tumoren dieser Zelllinie konnte jedoch keine zytoplasmatische p63-Expression detektiert werden. Alle p63-positiven Tumoren dieser Zelllinie zeichneten sich durch das ausschließliche Vorliegen von nukleärem p63 aus (siehe Abbildung 21, Seite 79). Narahashi et al 2006 [140] untersuchten die p63-Expression und vor allem ihre genaue Lokalisation in den Zellen an 92 Adenokarzinomen der Lunge. Zusätzlich zur nukleären Lokalisation des Proteins konnte eine p63-Expression bei über 50% der neoplastischen Zellen ebenfalls im Zytoplasma detektiert

werden. Die nukleäre Lokalisation von p63 korrelierte hierbei mit einer nukleären Akkumulation von p53 ($P=0,012$), hatte aber keinen Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate der betroffenen Patienten. Die Lokalisation im Zytoplasma allerdings korrelierte mit einer verkürzten Lebenserwartung der Patienten ($P=0,049$) und stellt somit einen ungünstigen prognostischen Faktor bei Adenokarzinomen der Lunge dar.

Die Zelllinie VU-SCC-OE-267 der vorliegenden Arbeit wies, wie oben beschrieben, neben einer nukleären p63-Expression ebenfalls eine zytoplasmatische p63-Expression auf. Den Untersuchungen von Narahashi et al. 2006 [140] entsprechend fiel diese Zelllinie durch ein schnelleres Tumorstadium in den xenotransplantierten SCID-Mäusen in durchschnittlich nur 40,4 Tagen auf. Ebenfalls geht der Tumor mit der höchsten nachgewiesenen Anzahl an DTC von dieser Zelllinie einher. Bestätigend fällt weiterhin auf, dass in der zweiten Zelllinie (93VU120T-308) ebenfalls eine p53-Mutation und eine nukleäre Akkumulation des p53-Proteins nachzuweisen ist. Die durchschnittliche Tumorentwicklungszeit beträgt hier 68,4 Tage und ist damit weitaus langsamer als die der Zelllinie VU-SCC-OE-267.

5.3.3. EpCAM

Verschiedene Tumortypen wurden bereits auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen mit verschiedenen Markern untersucht. Marhaba et al. 2008 [117] berichteten, dass u.a. CD24, CD44, CD133, CD166, EpCAM und einige Integrine zu den Stammzellmarkern gezählt werden können. Diese konnten bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden [117, 118] (siehe 5.1.4., Seite 97).

Alle drei getesteten Stammzellmarker (ALDH-1, p63 und EpCAM) waren in Tumoren der zwei untersuchten Zelllinien VU-SCC-OE-267 und 93VU120T-308 nachweisbar. EpCAM war mit Ausnahme eines Tumors der Zelllinie 93VU120T-308 bei allen Tumoren beider Zelllinien positiv. Bei fast allen Tumoren war auch p63 nachweisbar. Der ALDH-1-Nachweis war bei den Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 zu 100% positiv, wohingegen die Zelllinie 93VU120T-308 lediglich in 52% der Fälle Positivität vorwies. Die Tumoren beider untersuchten Zelllinien

zeigten signifikante Unterschiede in ihren Expressionsmustern bei allen der getesteten Stammzellmarker.

5.4. Weitere hervorstechende Eigenschaften

Es konnten einige Tumoren und Klone der untersuchten Zelllinien ermittelt werden, die sich durch besonders starke Expressionsraten von den anderen Tumoren bzw. Klonen derselben Zelllinie unterschieden. Unter der Zelllinie VU-SCC-OE-267 fiel z.B. der Klon 2 durch seinen Tumor 389-1 auf, der als einziger Tumor eine starke MMP 9-Expression aufwies, obwohl alle weiteren Tumoren dieser Zelllinie MMP 9 im Durchschnitt nur schwach bis höchstens mäßig exprimierten. Weiter fiel auf, dass der einzig stark exprimierende Tumor für ADAM 17 dieser Zelllinie der Klon 4 ist (Tumor 378-1). Bei der Zelllinie 93VU120T-308 zeigte der Klon 5 im Gegensatz zu den anderen Tumoren dieser Zelllinie vergleichsweise häufig MMP 1-Positivität (6/6 Tumoren) und das zu 50% mit starker Intensität. Auch Klon 1 und 3 dieser Zelllinie nehmen eine Sonderstellung ein, da Klon 1 der einzige Klon dieser Zelllinie mit kompletter ADAM 17-Negativität ist und Klon 3 der einzige Klon, der zu 100% MMP 9-Positivität zeigt.

Die Tumorentwicklungszeiten erwiesen sich ebenfalls als unterschiedlich zwischen den untersuchten Zelllinien. Diese waren bei der Zelllinie VU-SCC-OE-267 mit durchschnittlich 40,4 Tagen kürzer als bei der Zelllinie 93VU120T-308 mit durchschnittlich 68,4 Tagen. Neben dem schnelleren Wachstum zeigte die Zelllinie VU-SCC-OE-267 auch weitgehend größere Tumoren bei der Tumorentnahme als die Zelllinie 93VU120T-308, denn über die Hälfte der Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267 wogen bei der Entnahme mehr als 1 Gramm (52%), wobei nur ein Viertel der Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 diese Masse erreicht hatte (4/16, 25%).

Die zwei untersuchten Zelllinien oraler Plattenepithelkarzinome mit jeweils 5 Zellklonen und 5 Tumoren jedes Klons führten in lediglich 4/52 tumortragenden SCID-Mäusen zu disseminierten bzw. zirkulierenden Tumorzellen in den Blut- oder Knochenmarkspalten. Dabei trugen zwei der 4 Mäuse Tumoren, die aus

der Zelllinie VU-SCC-OE-267 hervorgegangen waren und zwei weitere Mäuse Tumoren, die von der Zelllinie 93VU120T-308 abstammten. Die Knochenmarksprobe der Maus mit dem Tumor 19-1-07 (VU-SCC-OE-267) wies mit mehr als 20 die höchste Anzahl an nachweisbaren DTC auf. Eine weitere Maus mit einem Tumor dieser Zelllinie (19-4-07) hatte keine nachweisbaren Tumorzellen in den Knochenmarksproben, aber eine CTC konnte in der Blutprobe ermittelt werden (siehe Tabelle 31, Seite 85).

Insgesamt 3 DTC wurden in den Knochenmarksproben von 2 Mäusen mit Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 detektiert, zwei DTC im Tumor 392-2-06 und eine DTC im Tumor 393-06. Ob die Zelllinie, die etwas schneller zur Tumorentstehung nach subkutaner Implantation führte, tatsächlich auch häufiger Tumorzell dissemination verursacht, muss in Folgeexperimenten getestet werden.

Trotz der Unterschiede in den oben genannten Faktoren können keine Tumoren oder Klone der beiden Zelllinien als ganz besonders auffällig bezeichnet werden. Um Zelllinien zu etablieren, die stets zu einer Tumorgenese führen und mit einer hohen Rate an zirkulierenden bzw. disseminierten Tumorzellen assoziiert sind, wären weitere wiederholte Versuche mit ganz bestimmten Zelllinienklonen erforderlich. Dafür geeignete Klone wären beispielsweise diejenigen der Zelllinie 93VU120T-308, die zu ALDH-1-positiven Tumoren geführt haben. Hier könnten Tumorzellen des Klons 5, die die höchste Anzahl an ALDH-1-Positivität aufwiesen, erneut in SCID-Mäuse implantiert werden. Die entstehenden Tumoren könnten dann homogenisiert und ALDH-1-positive Zellen über FACS-Analysen heraussortiert werden. Erneute SCID-Maus-Passagen dieser ALDH-1-positiven im Vergleich zu ALDH-1-negativen Tumoren sollten dann auf Tumorigenität und Mikrometastasierung in Blut, Knochenmark und Lungen der Mäuse untersucht werden.

Auch könnten die CTC/DTC durch Einzelzellanalysen näher charakterisiert und ihre Expressionsmuster mit denen der Primärtumoren verglichen werden. Derartige Einzelzellanalysen sind im Institut für Tumorbioogie bereits etabliert worden. Ob CTC/DTC sich in den hier untersuchten und weiteren Faktoren von den Tumoren ihres Klons, ihrer Ursprungszelllinie und der zweiten Zelllinie unterscheiden und durch welche Veränderungen nur diese Tumoren zur

Tumorzell dissemination befähigt sind, könnte somit analysiert werden. Hierfür könnten weitere Untersuchungen am Tumor 19-1-07 (oder weiteren Tumoren seines Klons, da auch der Tumor 19-4-07 eine CTC vorwies) herangezogen werden. Obwohl sich dieser Tumor nicht signifikant von den weiteren Tumoren seines Klons (AZ) unterscheidet, wies er die höchste Rate an DTC im Knochenmark auf.

Die in dieser Arbeit beschriebenen DTC/CTC wurden durch Immunzytochemie mit Hilfe des pan-anti-Zytokeratin-Antikörpers A45-B/B3 (Pantel et al. 1994 [141]) detektiert. Der in der vorliegenden Arbeit getestete pan-anti-Zytokeratin-Antikörper 34 β E12 [107] erwies sich bei allen getesteten Tumoren als hervorragend geeignet, Tumorzellen im Primärtumor homogen immunzytochemisch anzufärben. Dieser Antikörper wurde bereits in einer vorherigen Dissertation [152] erfolgreich für den Nachweis von DTC und Mikrometastasen in Lymphknoten von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen eingesetzt. Da der Antikörper A45-B/B3 bevorzugt gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist [145, 146, 147] und 34 β E12 bevorzugt die Zytokeratine 4, 6 und 14 (und weitere) darstellt [45, 46], könnte eine Kopplung dieser beiden Antikörper eine häufigere Detektion Zytokeratin-positiver Zellen in Blut und Knochenmark ermöglichen. In Bezug auf die hier untersuchten Zelllinien wäre auch eine weitere Kopplung mit dem p53-Proteinnachweis eine geeignete Möglichkeit, bei weiteren Untersuchungen die CTC bzw. DTC, die aus Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 hervorgehen, nachzuweisen. Da der Zytokeratinnachweis ein gewebespezifischer Marker ist, würde eine Kopplung mit einem hier zelllinienspezifischen Marker die Suche nach möglichen CTC/DTC spezifizieren.

Zusammenfassung

Zur Gruppe der Tumoren der Kopf-Hals-Region gehören biologisch ähnliche Neoplasien des oralen, nasalen, paranasalen, pharyngealen und laryngealen Raumes. Die Mehrheit dieser Tumoren stellen mit über 90% Plattenepithelkarzinome dar. Weltweit bilden die Plattenepithelkarzinome dieser Region mit ca. 5 bis 10% die fünfthäufigste Karzinomkrankung. An der insgesamt eher schlechten Prognose dieser Tumoren hat sich in den letzten Jahren wenig geändert. Wichtigster Prognosefaktor der oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinome ist nach wie vor die lokoregionale Lymphknotenmetastasierung. Ob auch die Tumorzell dissemination in das Knochenmark oder Blut prognostische Relevanz besitzt, wird gegenwärtig in verschiedenen Forschungsprojekten analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden an 52 in SCID-Mäusen subkutan entstandenen Tumoren aus 2 oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien humaner Herkunft insgesamt 11 Faktoren untersucht. Dabei stand die Charakterisierung der Tumorzellen im Hinblick auf Invasions- und Metastasierungs-relevante Parameter sowie potenzielle Tumorstammzellmarker im Zentrum des Interesses. Es sollte untersucht werden, ob und welche Unterschiede es zwischen Tumoren, die aus den verschiedenen Tumorzelllinien bzw. aus verschiedenen Zellklonen einer Zelllinie hervorgegangen sind, gibt. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand dabei darin zu untersuchen, ob die Expression der oben genannten Faktoren mit der Fähigkeit der Tumoren, Tumorzellen ins Knochenmark oder Blut zu disseminieren, assoziiert ist. Um diese Ziele zu erreichen, wurden immunhistochemische Verfahren und die RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung angewendet.

Dabei konnten Unterschiede sowohl zwischen den Tumoren in Abhängigkeit von den Ausgangszelllinien als auch vom jeweiligen Zellklon innerhalb einer Zelllinie nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass tumorassoziierte Proteasen, wie Matrixmetalloproteasen (hier MMP 1 und 9) und ADAM (hier ADAM 17) differenziell in den Maustumoren exprimiert werden können. Hinsichtlich der Expression des Matrixmetalloprotease-Inhibitors TIMP 3 sowie des MMP-Induktors EMMPRIN konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren in

Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie bzw. vom Zelllinienklon detektiert werden. Auch in Bezug auf die Zytokeratinexpression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Tumoren. Fast alle Tumoren waren durch eine mäßige bis starke homogene Zytokeratin-Immunfärbung gekennzeichnet, so dass der eingesetzte pan-anti-Zytokeratin-Antikörper 34ßE12 für die Detektion von Tumorzellen im Knochenmark oder Blut mit Hilfe immunzytochemischer Methoden als aussichtsreich angesehen werden kann. Als unterschiedlich erwiesen sich die Tumoren dagegen bezüglich ihres p53-Statuses in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie. Lediglich die Zelllinie 93VU120T-308 wies p53-Genmutationen auf, und zwar in den Codons 161 und 176 des Exons 5. Tumoren, die von dieser Zelllinie abstammten, zeichneten sich aufgrund dieser Mutationen durch eine starke nukleäre p53-Immunreaktion aus. Ebenso konnte der Nachweis einer differenziellen Expression der Tumorstammzellmarker p63 und ALDH-1 sowie der EGFR- und EpCAM-Expression in den Tumoren in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie erbracht werden. Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 exprimierten EGFR und p63 häufiger mit starker Intensität als Tumoren der Zelllinie VU-SCC-OE-267. Dagegen war die Expression des Epithelzellmarkers EpCAM in einigen Tumoren der Zelllinie 93VU120T-308 herabreguliert, und die Expression von ALDH-1 wurde in Tumoren dieser Zelllinie ausschließlich in kleinen Foci detektiert.

Lediglich in insgesamt 4 der 52 tumortragenden SCID-Mäuse konnten zirkulierende oder disseminierte Tumorzellen detektiert werden. Obwohl die Tumoren, aus denen die CTC bzw. DTC hervorgingen, keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Faktoren zu weiteren Tumoren ihres Klons bzw. ihrer Zelllinie aufwiesen, sind für die SCID-Maus mit den meisten DTC im Knochenmark eine starke ALDH-1- und p63-Expression sowie eine nur mäßige Intensität der EGFR- und EpCAM-Expression hervorzuheben.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass uns Zelllinienklone zur Verfügung stehen, die mit hoher Frequenz in SCID-Mäusen zur Tumorbildung befähigt sind. Weitere Analysen müssen nun zeigen, unter welchen Bedingungen diese Tumoren verstärkt zur Tumorzelldisseminierung neigen. Auch die Xenotransplantation von Zellen, die aus den Ausgangszelllinien oder aus den in den SCID-Mäusen gebildeten Tumoren entsprechend der

Expression von Tumorstammzellmarkern herausortiert werden, und die nachfolgende Analyse der Tumorentstehung und Metastasierung können als interessante Ansatzpunkte für Folgeexperimente angesehen werden. Neben der Analyse von Knochenmark- und Blutproben sollten auch andere Organe, wie beispielsweise Lungen und Leber auf eine potenzielle Mikrometastasierung analysiert werden. Darüber hinaus könnten die Zelllinien experimentell dahingehend manipuliert werden, dass sie die aussichtsreichsten Kandidatengene vermehrt oder vermindert exprimieren, um einen potenziellen Einfluss einer veränderten Expression auf die Tumorzell dissemination zu testen. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Ursachen der minimalen Tumorerkrankung in Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- [1] Deutsche Krebsgesellschaft e.V.: Kopf-Hals-Tumoren-Überblick; http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_kopf_hals_tumor_definition,108162.html
- [2] Werner JA (2002): Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, Onkologie und Differentialdiagnostik. 1. Aufl. Springer-Verlag
- [3] Universität Ulm: Fachinformation, PET-Onkologie, Kopf-Hals Tumore; http://www.uni-ulm.de/klinik/radklinik/rad3/fachinformation/PETOnkologie/p_kopfhals.htm
- [4] Wittekind C, Weber A, Weidenbach H (2001): Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Der Onkologe* 7:498-504
- [5] Wollenberg B, Zimmermann F (2003): Kopf-Hals-Malignome. 1. Aufl. Zuckschwerdt
- [6] Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (2006): Kompendium Internistische Onkologie. 4. Aufl. Springer-Verlag
- [7] RT Answers: www.rtanswers.org/treatment/disease/head_neck.htm
- [8] Boenninghaus HG, Lenarz T (2007): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 4. Aufl. Springer-Verlag
- [9] UICC (Wittekind C, Wagner G) (1997): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5. Aufl. Springer-Verlag
- [10] UICC (Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F) (2002): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Aufl. Springer-Verlag
- [11] UICC (Wittekind C, Hermanek) (2003): Residualtumor-(R-) Klassifikation. Springer-Verlag
- [12] Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW (1991): Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117(6):601-5
- [13] AWMF online: http://www.rnk-berlin.de/rnkweb/chirurgie/cco/fortbildung/klinikmanual/leitlinienbasierte_therapieempfehlungen_maligner_erkrankungen/leitlinien_dkg/cho_tmst.htm

-
- [14] Partridge M, Costea DE, Huang X (2007): The changing face of p53 in head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36(12):1123-38
- [15] Jeltsch A (2002): Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* 3(4):274-93
- [16] Hallstrom TC, Nevins JR (2009): Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* 8(4):532-5
- [17] Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC (2007): Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171(2):386-95
- [18] Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT (2004): The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 51(2):445-57
- [19] Petruzzelli L, Takami M, Humes HD (1999): Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106(4):467-76
- [20] Baeuerle PA, Gires O (2007): EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96(3):417-23
- [21] Rosenthal EL, Matrisian LM (2006): Matrix Metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 28(7):639-48
- [22] Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997): General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80(8 Suppl):1529-37
- [23] Freije JM, Balbin M, Pendas AM, Sanchez LM Puente XS, Lopez-Otin C (2003): Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 532:91-107
- [24] World intellectual property organisation: (WO/1995/025171) DNA sequences for matrix metalloproteases, their production and use; <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=DE1995000357&DISPLAY=DESC>
- [25] Matrisian LM, Sledge GW, Mohla S (2003): Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res* 63(19):6105-9
- [26] Overall CM, Lopez-Otin C (2002): Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2(9):657-72

- [27] Mueller MM, Fusenig NE (2002): Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 70(9-10):486-97
- [28] Birkedal-Hansen H (1995): Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7(5):728-35
- [29] Ala-aho R, et al. (2004): Targeted inhibition of human collagenase-3 (MMP-13) expression inhibits squamous cell carcinoma growth in vivo. *Oncogene* 23(30):5111-23
- [30] O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA (2001): Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(7):813-20
- [31] Patel BP, et al. (2005): Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 90(2):81-8
- [32] Arenas-Huertero FJ, et al. (1999): Matrix metalloproteinases expressed in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation with clinicopathologic features and neo-adjuvant chemotherapy response. *J Exp Clin Cancer Res* 18(3):279-84
- [33] Stamenkovic I (2000): Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10(6):415-33 Review
- [34] Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2(3):161-74
- [35] Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM (2001): Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia* 3(6):459-68
- [36] DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, et al. (2004): Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164(4):1131-9
- [37] Cunha GR, Matrisian LM (2002): It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation* 70(9-10):469-72
- [38] Lynch CC, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70(9-10):561-73
- [39] Coussens LM, et al. (2000): MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103(3):481-90

- [40] Kurahara S, et al. (1999): Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21(7):627-38
- [41] Wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Matrix_metalloproteinase
- [42] Rosenthal EL, et al. (2004): Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(8):943-7
- [43] Rosenthal EL, et al. (1999): Role of membrane type 1-matrix metalloproteinase and gelatinase A in head and neck squamous cell carcinoma invasion in vitro. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121(4):337-43
- [44] Tokumaru Y, et al. (2000): Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 150(1):15-21
- [45] German medical science: <http://www.egms.de/pdf/journals/cpo/2006-2/cpo000169.pdf>
- [46] Biologe Dr.Hartmut Schultheiß e.K.:
<http://www.biologo.de/standard/66/BioPrime/CK534.html>
- [47] Verstappen J, Von den Hoff JW (2006): Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 85(12):1074-84
- [48] Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E (2004): TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3):187-98
- [49] Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006): Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25(1):99-113
- [50] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions; *Eur J Cell Biol.* 74(2):111-22
- [51] Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K (1999): Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 878:73-91
- [52] Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975): Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64(1):232-40

- [53] Rowe TF, King LA, MacDonald PC, Casey ML (1997): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 176(4):915-21
- [54] Oelmann E, Herbst H, Zühlsdorf M, Albrecht O, Nolte A, Schmitzmann C, Manzke O, Diehl V, Stein H, Berdel WE (2002): Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells *Blood* 99(1):258-67
- [55] Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R (2004): Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 279(10):8592-601
- [56] Xu YP, Zhao XQ, Sommer K, Moubayed P (2003): Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci* 4(4):491-501
- [57] Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A (1994): Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 107 (Pt 9):2373-9
- [58] Handsley MM, Edwards DR (2005): Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 115(6):849-60 Review
- [59] Larsen MB, Stephens RW, Brünner N, Nielsen HJ, Engelholm LH, Christensen IJ, Stetler-Stevenson WG, Høyer-Hansen G (2005): Quantification of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in plasma from healthy donors and cancer patients. *Scand J Immunol* 61(5):449-60
- [60] Takamune Y, Ikebe T, Nagano O, Nakayama H, Ota K, Obayashi T, Saya H, Shinohara M (2007): ADAM-17 associated with CD44 cleavage and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 450(2):169-77
- [61] Takamune Y, Ikebe T, Nagano O, Shinohara M (2008): Involvement of NF-kappaB-mediated maturation of ADAM-17 in the invasion of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 365(2):393-8

- [62] Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL, Stambrook P, Li YQ, Stetler-Stevenson WG (2000): MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. *Oral Dis* 6(6):376-82
- [63] Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008): The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29(5):258-89
- [64] Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D (2006): (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78(1):24-46
- [65] Bridges LC, Bowditch RD (2005): ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr Pharm Des* 11(7):837-47
- [66] Duffy MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, O'Shea CM (2003): The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost* 89(4):622-31
- [67] Schlöndorff J, Blobel CP (1999): Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3603-17
- [68] Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Gonçalves A, Dubreuil P, Lopez M (2005): Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280(20):19543-50
- [69] Black RA (2002): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34(1):1-5 Review
- [70] Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB (1996): Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res* 6(9):791-806
- [71] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33

- [72] Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385(6618):733-6
- [73] Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, Reddy P, Wolfson MF, Rauch CT, Castner BJ, Davis R, Clarke HR, Petersen M, Fitzner JN, Cerretti DP, March CJ, Paxton RJ, Black RA, Bode W (1998): Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3408-12
- [74] Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, Amin AR (1998): TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol* 160(9):4570-9
- [75] Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998): Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393(6683):382-6
- [76] Hirohata S, Seldin MF, Apte SS (1998): Chromosomal assignment of two ADAM genes, TACE (ADAM17) and MLTNB (ADAM19), to human chromosomes 2 and 5, respectively, and of Mltnb to mouse chromosome 11. *Genomics* 54(1):178-9
- [77] Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP (1999): Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274(19):13613-8
- [78] Cerretti DP, Poindexter K, Castner BJ, Means G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Black RA, Nelson N (1999): Characterization of the cDNA and gene for mouse tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25. *Cytokine* 11(8):541-51

- [79] Nelson KK, Schlöndorff J, Blobel CP (1999): Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta. *Biochem J* 343 Pt 3:673-80
- [80] Kärkkäinen I, Rybnikova E, Pelto-Huikko M, Huovila AP (2000): Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 15(6):547-60
- [81] Lee MH, Verma V, Maskos K, Nath D, Knäuper V, Dodds P, Amour A, Murphy G (2002): Engineering N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 to be a better inhibitor against tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Biochem J* 364(Pt 1):227-34
- [82] Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, Moyer M, Patel I, Waitt GM, Becherer JD, Moss ML, Milla ME (2002): The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 41(30):9462-9
- [83] Rosenthal EL, Vidrine DM, Zhang W (2006): Extracellular matrix metalloprotease inducer stimulates fibroblast-mediated tumor growth in vivo. *Laryngoscope* 116(7):1086-92
- [84] Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Jänicke F, Sauter G, Pantel K (2004): Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10(10):3422-8
- [85] Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S (2005): EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87(3-4):361-8
- [86] Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K (2006): High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119(8):1800-10
- [87] Mendelsohn J, Baselga J (2006): Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 33(4):369-85
- [88] Mendelsohn J, Baselga J (2000): The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19(56):6550-65

-
- [89] Mendelsohn J (2001): The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8(1):3-9
- [90] Tellmed.ch:
http://www.tellmed.ch/include_php/previewdoc.php?file_id=1498
- [91] Sreerama L, Sladek NE (1997): Cellular levels of class 1 and class 3 aldehyde dehydrogenases and certain other drug-metabolizing enzymes in human breast malignancies. *Clin Cancer Res* 3(11):1901-14
- [92] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007): ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1(5):555-67
- [93] Douville J, Beaulieu R, Balicki D (2008): ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* 2008 – E-published vorab
- [94] Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr (1997): p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389(6647):191-4
- [95] Kaelin WG Jr (1999): The p53 gene family. *Oncogene* 18(53):7701-5
Review
- [96] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90(4):809-19
- [97] Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH (2004): p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 279(9):8076-83
- [98] Trink B, Osada M, Ratovitski E, Sidransky D (2007): p63 transcriptional regulation of epithelial integrity and cancer. *Cell Cycle* 6(3):240-5

- [99] Welters MJ, Fichtinger-Schepman AM, Baan RA, Hermsen MA, van der Vijgh WJ, Cloos J, Braakhuis BJ (1997): Relationship between the parameters cellular differentiation, doubling time and platinum accumulation and cisplatin sensitivity in a panel of head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* 71(3):410-5
- [100] Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Löning T, Herbst H (1999): Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 435(6):566-73
- [101] Lordick F, Krauß J, Jäger D (2008): Tumor markers and biomarkers in squamous cell cancer of the head and neck. *HNO* 56(9):881-5
- [102] Thariat J, Yildirim G, Mason KA et al. (2007): Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma. *Int J Clin Oncol* 12:99-110
- [103] Dassonville O, Formento JL, Francoual M et al. (1993): Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 11:1873-1878
- [104] Gupta AK, McKenna WG, Weber CN et al. (2002): Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 8:885-892
- [105] IMBA – Institute of Molecular Biotechnology:
http://www.imba.oeaw.ac.at/fileadmin/imba/Documents/Press_Releases/JK_Cell0306_dt_final.pdf
- [106] Riethdorf S, Wikman H, Pantel K (2008): Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 123(9):1991-2006
- [107] Di F, Wong NL (2004): The diagnostic value of 34 betaE 12 in differential diagnosis of benign and malignant mammary lesions. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 33(1):31-5
- [108] Braun S, Pantel K (1998): Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treat* 52(1-3):201-16
- [109] Braun S, Pantel K (1999): Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med Oncol* 16(3):154-65

- [110] Stiewe T (2007): The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 7(3):165-8
- [111] Ferbeyre G, Lowe SW (2002): Ageing: The price of tumour suppression?. *Nature* 415(6867):26-7
- [112] Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Jansen JW, O'Flaherty MC, Smeets SJ, Heck AJ, Slijper M (2009): Comparative proteome analysis to explore p53 pathway disruption in head and neck carcinogenesis. *J Proteomics* 72(5):803-14
- [113] De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, Silveira AC, Santos FB, Haikal DS, Guimarães AL, Gomez RS (2009): Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization *Oral Oncol* [Epub ahead of print]
- [114] Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV (2003): The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163(6):2139-48
- [115] Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO (1997): Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139(5):1337-48
- [116] Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77(10):699-712
- [117] Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M (2008): CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 8(8):784-804
- [118] Ailles L, Prince M (2009): Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol* 568:175-93
- [119] Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003): Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2):269-85
- [120] Hashimoto T, Uchida K, Okayama N, Imae Y, Suehiro Y, Hamanaka Y, Ueyama Y, Shinozaki F, Yamashita H, Hinoda Y (2004): Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1 promoter polymorphism with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 211(1):19-24

- [121] Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O (2002): Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 95(9):1902-10
- [122] Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Löning T, Herbst H (1999): Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 435(6):566-73
- [123] Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM (2009): Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res* 15(4):1140-4
- [124] McGowan PM, McKiernan E, Bolster F, Ryan BM, Hill AD, McDermott EW, Evoy D, O'Higgins N, Crown J, Duffy MJ (2008): ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 19(6):1075-81
- [125] Nakagawa M, Nabeshima K, Asano S, Hamasaki M, Uesugi N, Tani H, Yamashita Y, Iwasaki H (2009): Up-regulated expression of ADAM17 in gastrointestinal stromal tumors: coexpression with EGFR and EGFR ligands. *Cancer Sci* 100(4):654-62
- [126] Takamune Y, Ikebe T, Nagano O, Nakayama H, Ota K, Obayashi T, Saya H, Shinohara M (2007): ADAM-17 associated with CD44 cleavage and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 450(2):169-77
- [127] Ninomiya I, Kawakami K, Fushida S, Fujimura T, Funaki H, Takamura H, Kitagawa H, Nakagawara H, Tajima H, Kayahara M, Ohta T (2008): Quantitative detection of TIMP-3 promoter hypermethylation and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 20(6):1489-95
- [128] Kalyankrishna S, Grandis JR (2006): Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24(17):2666-72

- [129] Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N (2008): Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 99(8):1589-94
- [130] Farhadieh RD, Salardini A, Gordon Rees CG, Russell PJ, Yang JL, Smees R (2009): Protein Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Index Tumors Correlates with Diagnosis of Second Primary Tumors of the Upper Aerodigestive Tract. *Ann Surg Oncol* 16(10):2888-94
- [131] Cao Z, Xiang J, Li C (2009): Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38(8):880-5
- [132] Newman JR, Bohannon IA, Zhang W, Skipper JB, Grizzle WE, Rosenthal EL (2008): Modulation of tumor cell growth in vivo by extracellular matrix metalloprotease inducer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134(11):1218-24
- [133] Prince ME, Ailles LE (2008): Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol* 26(17):2871-5
- [134] Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM (2009): Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69(8):3382-9
- [135] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL (2009): Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 385(3):307-13
- [136] Thurfjell N, Coates PJ, Boldrup L, Lindgren B, Bäcklund B, Uusitalo T, Mahani D, Dabelsteen E, Dahlqvist A, Sjöström B, Roos G, Vojtesek B, Nenutil R, Nylander K (2005): Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol* 62:49-57

- [137] Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA (2004): Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 114(12):2063-72
- [138] Remmele W, Stegner HE (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987 8(3):138-40
- [139] Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J (2010): Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 77(1):6-10
- [140] Narahashi T, Niki T, Wang T, Goto A, Matsubara D, Funata N, Fukayama M (2006): Cytoplasmic localization of p63 is associated with poor patient survival in lung adenocarcinoma. *Histopathology* 49(4):349-57
- [141] Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G (1994): Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3(3):165-73
- [142] Szymańska K, Hainaut P (2003): TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol* 50(1):231-8
- [143] Gath HJ, Heissler E, Hell B, Bier J, Riethmüller G, Pantel K (1995): 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(5):351-5
- [144] Riethdorf S, Pantel K (2009): Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark - Detektionsmethoden, Charakterisierung und klinische Relevanz. Zeller, zur Hausen. *Onkologie*. 26. Erg. Lfg. 9/09. Allgemeine Tumordiagnostik, 2009; 1-38
- [145] Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K (2005): 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):3678-85
- [146] Braun S, Pantel K (1999): Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med Oncol* 16(3):154-65

- [147] Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K (2004): Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(8):2670-4
- [148] Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S (2009): Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6(6):339-51
- [149] Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008): Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8(5):329-40
- [150] Pantel K, Riethdorf S (2009): Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival? *Nat Rev Clin Oncol* 6(4):190-1
- [151] Wollenberg B, Walz A, Kolbow K, Pauli C, Chaubal S, Andratschke M (2004): Clinical relevance of circulating tumour cells in the bone marrow of patients with SCCHN. *Onkologie* 27(4):358-62
- [152] Franziska Gärtner (2008): Nachweis von Mikrometastasen in lokoregionären Lymphknoten von Patienten mit oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Med. Dissertation. Universität Hamburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Entstehung meiner Doktorarbeit Hilfestellung geleistet haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel danke ich herzlich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Tumorbiologie und für die Überlassung des Themas.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Sabine Riethdorf für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die ständige Bereitschaft für Gespräche, für die Hilfestellung und für das Vertrauen, welches sie mir entgegenbrachte. Auch danke ich ihr sehr für die fachliche Durchsicht der Dissertation sowie für die wertvollen Hinweise und Anregungen. Vielen Dank für die tolle Betreuung.

Ein großer Dank geht auch an Frau Malgorzata Stoupiec. Ich danke ihr für die tolle Einarbeitung in die Laborarbeit, die stetige Offenheit für Fragen und Hilfeleistung jeglicher Art. Außerdem danke ich ihr für die ständige Motivation, für die höchstmögliche Herzlichkeit und eine exzellente Betreuung während der Durchführung der kompletten Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich recht herzlich bei Oliver Mauermann, Antje Andreas, Cornelia Coith, Roswitha Pakusa, Josefine Tadewaldt, Susann Schirmer, Christin Beneken, Kai Bartkowiak und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie für das außerordentlich angenehme Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft, die Motivation und Unterstützung. Auch für ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie für ihre nette Gesellschaft bei jeglichen Gesprächen danke ich ihnen.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Institut für Tumorbiologie. Ich bin sehr glücklich und dankbar, meine Doktorarbeit in diesem Institut durchgeführt haben zu dürfen.

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name	Nurşen Kurt
Geburtsdatum / Ort	13.04.1984 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1990 - 2000	Gesamtschule Wilhelmsburg in Hamburg
2000 - 2003	Gesamtschule Kirchdorf in Hamburg
2003 - 2010	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
03/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2009 - 2010	Praktisches Jahr
02/2009 - 06/2009	PJ-Tertial Chirurgie: AK Altona in Hamburg
06/2009 - 10/2009	PJ-Tertial Innere Medizin: Istanbul University – Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Türkei
10/2009 - 01/2010	PJ-Tertial Wahlfach: Pädiatrie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
04/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Hammerexamen) und Approbation als Ärztin

Famulaturen

07/2007	Herzchirurgie im AK St. Georg, Hamburg
08/2007	Gastroenterologie im AK Harburg, Hamburg
03/2008	Innere Medizin im Andrews Memorial Hospital, Kingston, Jamaika
07/2008	Pädiatrie im Oshakati State Hospital, Oshakati, Namibia

Wissenschaftliche Ausbildung

01/2008 - 12/2010	Promotionsarbeit: „Phänotypische Charakterisierung von SCID-Maus-Xenograft-Tumoren aus Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region“
	Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Pantel Institut für Tumorbologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Hamburg, den 01.07.2010

Nurşen Kurt